



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Patología

**Evaluación de Biopolímeros como Superficie de
Regeneración de Tejidos Dérmico y Cardíaco**

Tesis Doctoral

Delia Castellano Izquierdo

Dirigida por:

Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis

Dra. Amparo Ruiz Saurí

JUNIO 2018

Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis, Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia; Dra. Amparo Ruiz Saurí, profesora del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "Evaluación de Biopolímeros como Superficie de Regeneración de Tejido Dérmico y Cardíaco", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Delia Castellano Izquierdo, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado de Medicina de la Universitat de València.

Y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 15 de Mayo de 2018.

Handwritten signature of Pilar Sepúlveda Sanchis in blue ink, underlined.

Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis

Handwritten signature of Amparo Ruiz Saurí in blue ink.

Dra. Amparo Ruiz Saurí

Cuando el objetivo te parezca imposible, no cambies de objetivo;
busca un nuevo camino para llegar a él.
Confucio, maestro y filósofo Chino

AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que han contribuido de una manera u otra a realizar este trabajo durante estos años.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a las directoras de esta tesis, la Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis y la Dra. Amparo Ruiz Saurí. Ambas personas excelentes en su profesión, perseverantes y de gran corazón, sois todo un ejemplo a seguir. Gracias Pilar por darme la oportunidad de hacer la tesis y por la confianza que tuviste en mí desde el principio. Gracias por ser exigente cuando es necesario y comprensiva en los malos momentos, porque tu gente siempre es lo primero, aunque tengas mil proyectos que escribir o estés en algún congreso en la otra punta del mundo. Es un placer formar parte de tu equipo. Gracias Amparo por acogerme siempre, unas veces como colaboradora y otras como doctoranda. Siempre es fácil contigo.

Gracias a AITEX por proporcionar los biomateriales protagonistas de esta tesis. En especial a María Blanes y Bruno Marco, el trabajo multidisciplinar llevado a cabo con ellos durante este tiempo ha sido un gran aprendizaje para mí a nivel profesional y un placer a nivel personal.

Gracias a los doctores Ander Izeta, Vicente Mirabet, Álvaro Meana y Sara Llames por darme luz en el fascinante mundo del cultivo de piel. Gracias al Dr. Felipe Prósper y la Dra. Beatriz Pelacho por dar nivel a nuestra investigación en cada una de las colaboraciones realizadas. Gracias al equipo de la UPV, la Dra. Amparo Ribes, el Dr. José Badía y el Dr. Óscar Gil. Espero que los últimos trabajos realizados sean los primeros de otros muchos.

Gracias a la Dra. M^a Dolores Pérez del Caz, Lola, y al Dr. Julián Safont por abrirme las puertas de la Unidad de Quemados del Hospital La Fe de Valencia y hacerme sentir como en casa.

Gracias a la “gente del labo” por hacer del día a día en el laboratorio un lugar donde prima el compañerismo y el buen rollo. A los de siempre María, “Marieta” para mí, Sandra y Hernán. A los nuevos, también conocidos como “los niños” Marta y Rafa, qué buenos fichajes sois. A Akaitz, por hacerme ver el “Drop the Mic” que hay en mí, el final de la tesis no hubiera sido el mismo sin ti. A Rosa, no

conozco a ninguna persona que ponga a tanta gente firme con tanta gracia como tú. A mis compañeras de laboratorio/amigas Imelda y Marina. Lo que Ana Botella unió que no lo separe nadie. ¿Para cuándo un Yecla 33?. A Amparo Henández por cuidarnos tanto a todos y tener siempre la puerta abierta para cualquier cosa, repito para cualquier cosa. A Pili Marín por esas fotos maravillosas que ensalzan nuestro trabajo y por los buenos ratos que pasamos en el confocal.

En cuanto a los que siento más cerca, quiero dar las gracias a Carlos también conocido como el Dr. Litos, o primosoma o como mi primo segundo por parte de padre. Ejemplo de vocación, entusiasta de la vida y buena persona. A Ana, que tiene el título de prima por herencia pero se ha ganado mi cariño por méritos propios. A Juan Carlos Micó que no Mico, que pasó de ser mi profesor de matemáticas a ser profesor y consejero de la vida. A mis amigas guerreras Izaskun, Inma y Mari Paz. Cómo me gustáis chicas. Os llevo siempre en mi corazón y no os dejaré ir.

A mi familia, tías, primas, etc. Siempre os siento cercanas aunque estéis lejos. A mi otra familia Charo y Pedro, siempre estáis cuando se os necesita, gracias.

A mis padres, por inculcarme el amor a la cultura y al estudio, por protegerme, por cuidarme y por quererme tantísimo. Es un lujo poder contar con un lugar cuando todo se tambalea, donde reponerse y volver a la carga con energía. Ese lugar no es un lugar físico sino un lugar que habéis creado los dos llamado familia, el cual siempre me espera y al que amo. A mi hermana Laura, que aunque es la pequeña menudas lecciones me da de la vida. Siempre juntas con nuestras frases de “Alicia en el país de las maravillas” bajo el brazo. Os quiero muchísimo.

Para el final, la mejor parte, Raúl. Pobre de aquel que no crea en el amor a primera vista a cualquier edad, en cualquier momento, en cualquier lugar. Conocerme fue como llegar a casa. Juntos hemos logrado hacer dos grandes imposibles, posibles. Te quiero.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	11
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN.....	19
1. Introducción a los biomateriales y sus aplicaciones en la reparación tisular	21
1.1. Propiedades y clasificación de los biomateriales	22
1.2. Método de fabricación de los biomateriales: la electrohilatura	23
1.3. Descripción de los biomateriales utilizados	24
2. El infarto agudo de miocardio	30
2.1. Estructura y función del corazón	30
2.1.1. Anatomía del corazón	30
2.1.2. Histología del corazón	31
2.2. Fisiopatología del infarto de miocardio	32
2.3. Tratamiento del infarto de miocardio	40
2.3.1. Tratamiento convencional	40
2.3.2. La terapia celular	42
2.3.3. La ingeniería tisular y los biomateriales en la terapia celular	45
3. Las quemaduras	51
3.1. Estructura y función de la piel	51
3.2. Clasificación y fisiopatología de las quemaduras	54
3.2.1. Clasificación de las quemaduras	54
3.2.2. Fisiopatología de las quemaduras	56
3.3. Tratamiento de las quemaduras	59

3.3.1.	La problemática del gran quemado.....	59
3.3.2.	Tipos de sustitutos cutáneos: temporales y definitivos	60
OBJETIVOS		63
MATERIAL Y MÉTODOS.....		67
1.	Biomateriales	69
1.1.	Método de la electrohilatura	70
1.2.	Tratamientos posteriores a la obtención del biomaterial.....	72
2.	Líneas celulares	73
2.1.	Células mesenquimales de pulpa dentaria humana.....	73
2.2.	Línea celular HL-1.....	73
2.3.	Células 3T3-Swiss	74
2.4.	Fibroblastos y queratinocitos dérmicos humanos.....	74
2.5.	Leucocitos.....	75
2.6.	Células endoteliales del cordón umbilical humano	75
2.7.	Fibroblastos cardíacos de rata.....	75
3.	Técnicas <i>ex vivo</i>	76
3.1.	Aislamiento, cultivo y expansión de fibroblastos y queratinocitos dérmicos humanos.....	76
3.1.1.	Parada del ciclo celular de células 3T3-Swiss mediante tratamiento con mitomicina C para su uso como capa nutricia.....	76
3.1.2.	Aislamiento y expansión de fibroblastos y queratinocitos humanos a partir de biopsia de piel.....	77
3.2.	Obtención de un equivalente dérmico con un biomaterial en su base	78
3.3.	Aislamiento de leucocitos a partir de sangre total	79
4.	Técnicas <i>in vitro</i>	79
4.1.	Cultivos celulares	79
4.1.1.	Descongelación de células	80
4.1.2.	Tripsinización	80
4.1.3.	Congelación de células.....	81

4.2.	Recuento celular con cámara de Bürker	81
4.3.	Preparación y siembra de células sobre biomateriales.....	82
4.4.	Técnicas de estudio de la viabilidad celular.....	83
4.4.1.	Viabilidad celular mediante MTT	83
4.4.2.	Viabilidad celular mediante reactivo de cck-8.....	85
4.5.	Test pirógeno	85
4.6.	Técnicas histológicas.....	86
4.6.1.	Obtención y fijación de tejidos.....	86
4.6.2.	Seccionamiento de las muestras de tejido	89
4.6.2.1.	Inclusión en parafina y seccionamiento con micrótopo	89
4.6.2.2.	Crioseccionamiento	90
4.6.3.	Desparafinación e hidratación de las muestras.....	90
4.6.4.	Tinciones	91
4.6.4.1.	Tricrómico de Masson	91
4.6.4.2.	Hematoxilina-Eosina	92
4.6.5.	Inmunohistoquímica.....	93
4.6.5.1.	Técnica de inmunofluorescencia	94
4.6.5.2.	Técnica de inmunoperoxidasa	95
4.6.6.	Técnicas de imagen.....	96
4.6.6.1.	Microscopia de campo claro	96
4.6.6.2.	Microscopia de fluorescencia.....	96
4.6.6.3.	Microscopia confocal.....	97
4.6.6.4.	Microscopia electrónica de trasmisión.....	97
4.6.7.	Análisis histológico	98
4.6.7.1.	Cuantificación del tamaño de infarto	98
4.6.7.2.	Cuantificación del grado de inflamación tisular	98

4.6.7.3. Cuantificación del grado de revascularización tisular o análisis de la neovascularización	99
4.6.7.4. Cuantificación de macrófagos inflamatorios M1/M2 ..	99
4.6.7.5. Análisis morfométrico de los equivalentes dérmicos injertados.....	100
4.7. Técnicas bioquímicas y moleculares	101
4.7.1. Extracción de ARN.....	101
4.7.1.1. Extracción de ARN a partir de cultivo celular	101
4.7.1.2. Extracción de ARN a partir de tejido.....	101
4.7.2. Cuantificación de ARN	101
4.7.3. PCR cuantitativa (qPCR).....	102
4.7.3.1. Transcripción inversa.....	102
4.7.3.2. Amplificación del ADNc	102
5. Técnicas <i>in vivo</i>	104
5.1. Animales.....	104
5.2. Procedimientos quirúrgicos.....	104
5.2.1. Anestesia y analgesia	104
5.2.2. El modelo experimental de infarto de miocardio en rata	105
5.2.3. Implante del biomaterial sobre el tejido cardíaco.....	106
5.2.4. Modelo subdérmico en rata	107
5.2.5. Modelo xenotrasplante en ratón	107
5.3. Análisis ecocardiográfico	109
6. Análisis estadístico.....	110
RESULTADOS	113
1. Caracterización de biomateriales para el estudio	115
1.1. Evaluación de la biocompatibilidad celular, de la hidrofobicidad y del comportamiento mecánico	115
1.1.1. Biocompatibilidad celular	115
1.1.2. Hidrofobicidad.....	116

1.1.3. Comportamiento mecánico.....	116
1.2. Ensayos de adhesión y proliferación celular.....	117
1.3. Estudio inflamatorio <i>in vitro</i>	119
2. Caracterización de la biocompatibilidad de los biomateriales a nivel cardíaco.....	121
2.1. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales <i>in vitro</i>	121
2.2. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales <i>in vivo</i>	122
2.2.1. Análisis de la adhesión y reabsorción de los biomateriales en el corazón <i>in vivo</i>	123
2.2.2. Análisis histopatológico de los biomateriales en corazón <i>in vivo</i>	124
2.2.3. Análisis de la respuesta inflamatoria de los biomateriales <i>in vivo</i> . Cuantificación de macrófagos con perfil M1 y M2	126
2.3. Estudio angiogénico de los biomateriales	128
2.4. Estudio de la remodelación y la función cardiaca	130
3. Caracterización de los biomateriales a nivel dérmico.....	133
3.1. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales <i>in vitro</i>	133
3.2. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales <i>in vivo</i>	134
3.2.1. Análisis de la reabsorción y estudio histopatológico de los biomateriales implantados a nivel subdérmico en ratas sanas	134
3.2.2. Análisis de la respuesta inflamatoria de los biomateriales. Cuantificación de macrófagos con perfil M1 y M2	136
3.3. Estudio de los equivalentes dérmicos con biomaterial en su base	138
3.3.1. Generación de un equivalente dérmico con propiedades mecánicas.....	139
3.3.2. Evaluación de los equivalentes dérmicos con biomaterial en su base	141
3.4. Evaluación de los equivalentes dérmicos injertados en ratones inmunodeprimidos	142
3.4.1. Evaluación macroscópica.....	142

3.4.2. Evaluación microscópica.....	144
3.4.3. Estudio de la viabilidad del injerto del equivalente dérmico con biomaterial. Proliferación de queratinocitos.....	148
3.4.4. Estudio angiogénico del injerto del equivalente dérmico con biomaterial.....	149
DISCUSIÓN.....	151
1. Los biomateriales y su compatibilidad a nivel celular	154
2. Los biomateriales y su biocompatibilidad con el tejido cardíaco	156
3. Los biomateriales y su biocompatibilidad con el tejido dérmico.....	161
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA.....	171
PUBLICACIONES.....	193
ANEXOS	197

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ACDAI	Arteria Coronaria Descendente Anterior Izquierda
ACT- β	Actina β
ADAI	Arteria descendente anterior izquierda
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADSC	Células madre derivadas de adipositos (<i>Adipose-derived stem cells</i>)
Ala	Alanina
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>adenosine-5',-triphosphate</i>)
BM	Biomaterial
BrdU	Bromodeoxiuridina
CCK-8	Kit-8 de Conteo Celular (<i>Cell Counting Kit-8</i>)
CEEA	Comité de Ética de Experimentación Animal
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
CK	Citoqueratina (<i>Citokeratine</i>)
COL	Colágeno
CPA	Cambio Porcentual de Área
CSC	Células madre cardíacas (<i>Cardiac Stem Cells</i>)
cTn	Troponinas cardíacas
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI	4',6 diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DAV	Dispositivos de Asistencia Ventricular
DE	Desviación Estándar
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS

DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVI_d	Diámetro del Ventrículo Izquierdo en diástole
DVI_s	Diámetro del Ventrículo Izquierdo en sístole
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ED	Equivalente Dérmico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EPA	Engrosamiento de la Pared Anterior
ESB	Sociedad Europea de Biomateriales (<i>European Society for Biomaterials</i>)
FA	Fracción de Acortamiento
FBS	Suero Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gly	Glicina
GPAd	Grosor Pared de la Anterior en diástole
GPAs	Grosor Pared de la Anterior en sistóle
GPPd	Grosor Pared de la Posterior en diástole
GPPs	Grosor Pared de la Posterior en sístole
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)
HSC	Célula madre hematopoyética (<i>Hematopoietic Stem Cells</i>)
IAM	Infarto agudo de miocardio
IFN-γ	Interferón ganma
IISLaFe	Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
IL	Interleucina

IM	Infarto de miocardio
ITS	Insulina Transferrina Selenio
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas (<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>)
kV	kilovoltio
MCP-1	Proteína quimio atrayente de monocitos (<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>)
MD	Matriderm
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular (<i>Matrix Metalloproteinase</i>)
MSC	Células mesenquimales (<i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NGS	Normal Goat Serum
OCT	Optimal Cutting Temperatura
PA	Poliamida
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCL	Policaprolactona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
P/E	Penicilina/Estreptomicina
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PGA	Ácido poliglicólico (<i>Polyglycolic Acid</i>)
PHA	Polihidroxiacanoatos
PHB	Polihidroxi butirato
PHV	Polihidroxi valerato
PLA	Ácido poliláctico (<i>Polylactic Acid</i>)
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico (<i>Polylactic-co-glycolic acid</i>)
qPCR	PCR cuantitativa (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS

rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Instituto Roswell (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SCF	Factor de células madre (<i>Stem Cell Factor</i>)
SCT	Superficie Corporal Total
SDF-1	Factor-1 derivado del estroma (<i>Stromal Derived Factor-1</i>)
SEM	Error estándar (<i>Standar Error of the Mean</i>)
Ser	Serina
SVF	Fracción estromal vascular (<i>Stromal Vascular Fraction</i>)
TA	Temperatura Ambiente
T/E	Tripsina/EDTA
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante-beta 1 (<i>Transforming Growth Factor-β1</i>)
THF	Tetrahydrofurano
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteasas (<i>Tissue Inhibitor of metalloproteinase</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa (<i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>)
VI	Ventrículo izquierdo
w/t	Peso total (<i>weight/total</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Síntesis de la policaprolactona (PCL).	25
Figura 2. Síntesis del ácido poliláctico (PLA).	26
Figura 3. Síntesis del ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA).	27
Figura 4. Estructura química del polihidroxibutirato (PHB).	28
Figura 5. Estructura química de la poliamida (PA).	28
Figura 6. Estructura primaria de la fibroína.	29
Figura 7. Anatomía del corazón.	31
Figura 8. Depósito de una placa de ateroma con posterior formación de un trombo en la arteria coronaria.	33
Figura 9. Esquema del marco temporal de la reperfusión precoz y tardía del miocardio en el territorio de una arteria coronaria ocluida.	34
Figura 10. Cicatrización tras un IM. Tres fases solapadas: inflamatoria, proliferativa y de cicatrización.	36
Figura 11. Características microscópicas del infarto de miocardio.	38
Figura 12. Distensión sistólica en una zona isquémica del miocardio.	39
Figura 13. Microfotografía de una porción de la piel.	51
Figura 14. Tipos de quemaduras según el grado de profundidad de la herida. ...	55
Figura 15. Cálculo de la superficie corporal quemada.	56
Figura 16. Áreas de afectación cutánea tras una quemadura.	57
Tabla 1. Clasificación de los biomateriales según su naturaleza.	23
Tabla 2. Tipos de células madre derivadas de tejidos adultos usadas en estudios de terapia celular cardíaca.	43

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 17. Imagen representativa del aspecto macroscópico de los biomateriales utilizados.	69
Figura 18. Método de la electrohilatura.	71
Figura 19. Equipo de electrohilatura NS LAB de producción semi-industrial sobre anchos de 400 mm.	72
Figura 20. Técnica de recuento celular con cámara de Bürker.	82
Figura 21. Reacción de MTT.	83
Figura 22. Reacción de MTT en los biomateriales.	84
Figura 23. Imágenes del corazón durante la realización de los procesos quirúrgicos.	106
Figura 24. Implante del biomaterial a nivel subdérmico en la zona dorsal de ratas Wistar.	107
Figura 25. Procedimiento del modelo de xenotrasplante en ratón.	108
Figura 26. Parámetros ecocardiográficos.	110
Tabla 3: Condiciones de electrohilado para la fabricación de los diferentes biomateriales.	70
Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados.	94
Tabla 5: Resumen de las características principales de los cebadores utilizados en la qPCR.	103
Tabla 6: Anestesia y analgesia de los animales: productos y dosis administradas.	106

RESULTADOS

Figura 27. Imagen representativa del aspecto que muestran las células adheridas a un BM biocompatible (A) y a uno que no lo es (B).116

Figura 28. Biomateriales embebidos en el medio de cultivo.116

Figura 29. Imágenes representativas de biomateriales quebradizos.117

Figura 30. Adhesión de los BM a nivel celular.118

Figura 31. Imágenes de células de pulpa dentaria-GFP creciendo en los biomateriales a lo largo del tiempo.119

Figura 32. Cuantificación de los niveles de transcripción génica de IL-1 β , IL-6 y IL-10 en leucocitos incubados durante 5 h con los BM indicados.120

Figura 33. Células mesenquimales (MSC) de pulpa dentaria sembradas en el BM y marcadas nuclearmente con DAPI (azul).121

Figura 34. Proliferación de MSC de pulpa dentaria, fibroblastos cardíacos y células HL-1 en diferentes BM evaluada mediante el ensayo de MTT.122

Figura 35. Examen macroscópico de los BM en la superficie epicárdica de ratas sanas, 8 semanas después de su implante.123

Figura 36. Corte transversal de tejido cardíaco teñido con H/E mostrando parches cardíacos 8 semanas después del implante.124

Figura 37. Tinción de H/E de las secciones de tejido cardíaco del corazón 2 semanas después del implante de los biomateriales.126

Figura 38. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para la identificación de los macrófagos con perfil M1 y M2 en corazones de ratas sanas e infartadas.127

Figura 39. Representación del ratio de macrófagos M1/M2.128

Figura 40. Imágenes de inmunofluorescencia marcando vasos sanguíneos en la zona del BM implantado en corazones sanos de rata.129

Figura 41. Cuantificación del número total de vasos en ratas sanas e infartadas 2 semanas después de su implante.130

Figura 42. Tinción de Masson de secciones de corazón de ratas con y sin IAM y con y sin biomateriales en el epicardio.131

Figura 43. Porcentaje del tejido cicatricial de los corazones con IAM y BM.131

Figura 44. Medición de la función del ventrículo izquierdo en animales control y tratados.....	132
Figura 45. Proliferación de fibroblastos dérmicos humanos y células endoteliales humanas en BM evaluada mediante el ensayo de cck-8.....	133
Figura 46. Corte transversal del tejido dermo-epidérmico teñido con tricrómico de Masson.	135
Figura 47. Imágenes representativas a los 14 días de la inmunofluorescencia de tejido dérmico para la identificación de los macrófagos con perfil M1 y M2. ..	137
Figura 48. Estudio en el tiempo de la modulación del perfil inflamatorio M1 /M2 después del implante de biomateriales a nivel subdérmico en ratas.....	138
Figura 49. Imagen de un equivalente dérmico (ED).	138
Figura 50. Esquema de un equivalente dérmico con un biomaterial de base... 	139
Figura 51. Evaluación histológica mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina de cortes de 10 µm del ED.	140
Figura 52. Imágenes manipulando el ED con y sin BM.	141
Figura 53. Tinción de Hematoxilina/Eosina de los ED cultivados durante 10 días con y sin BM en su base.	141
Figura 54. Imágenes macroscópicas del área injertada dos y cuatro semanas post-implante de ED humano con BM.	143
Figura 55. Tinción de H/E de los cortes histológicos de los injertos en ratones. 	144
Figura 56. Tinción de H/E del ED injertado durante cuatro semanas, con o sin BM, en la región dorsal de ratones NOD/SCID.	145
Figura 57. Tricrómico de Masson del ED injertado en la región dorsal de ratones NOD/SCID.	145
Figura 58. Inmunofluorescencia doble de involucrina/citoqueratina 5 del ED injertado en la región dorsal de ratones NOD/SCID.	146
Figura 59. Inmunohistoquímica anti-laminina del ED injertado durante cuatro semanas, con o sin BM, en la región dorsal de ratones NOD/SCID.	146
Figura 60. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de secciones ultradelgadas correspondientes a injertos de piel humana.....	147

Figura 61. Proliferación de queratinocitos epidérmicos en los injertos de piel humanos con o sin biomateriales, 4 semanas después de su implante en los ratones.148

Figura 62. Cuantificación de células BrdU+ en cada grupo, expresada como porcentaje de células positivas respecto del total.149

Figura 63. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia con anti-CD31 para la detección de los vasos sanguíneos en la dermis del injerto de piel humana en ratones NOD/SCID.....149

Figura 64. Cuantificación de los vasos sanguíneos en la dermis del injerto cuatro semanas después de su implante.150

Tabla 7. Niveles de expresión de genes de leucocitos después de 5 h de cultivo con diferentes BM.120

Tabla 8. Análisis histopatológico de BM implantados en corazones de ratas sanas.....125

Tabla 9. Análisis histopatológico de los BM implantados subcutáneamente en ratas durante 2 semanas.136

ANEXOS

ANEXO 1. Caracterización de los BM. Diámetro de las fibras de cada tipo de BM.
..... 197

ANEXO 2. Consentimiento para toma de muestras de piel humana 198

ANEXO 3. Resumen gráfico del procedimiento de la generación de un ED con células dermo-epidérmicas humanas y su posterior injerto en ratones inmunodeprimidos. 121

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y de hospitalización en los países desarrollados. La cardiopatía isquémica se produce como consecuencia de un flujo coronario deficiente, con el consiguiente déficit en el aporte de oxígeno para cubrir las necesidades metabólicas del miocardio.

Las modalidades terapéuticas actuales para el tratamiento del infarto agudo de miocardio son limitadas y van desde el tratamiento médico en la fase aguda hasta la aplicación de dispositivos de asistencia mecánica al ventrículo izquierdo y el trasplante de corazón. Todo ello ha hecho que en los últimos años se hayan desarrollado nuevas técnicas para encontrar solución a las cardiopatías basadas tanto en la ingeniería de tejidos como en la terapia celular con células madre. La combinación de ambos campos, la denominada bioingeniería cardioregenerativa, puede llegar a solventar los problemas que ocurren tras un infarto de miocardio mediante 2 objetivos terapéuticos: proporcionar un soporte a través de un biomaterial, para evitar o disminuir el remodelado ventricular que acaba conduciendo a insuficiencia cardíaca y servir de soporte para el cultivo de células, actuando como vehículo para facilitar el transporte celular hasta la región dañada del miocardio.

Por ello, se pretende encontrar un biomaterial que pueda ser implantado en el corazón, que sea biocompatible y que proporcione un contacto adecuado biomaterial-corazón.

Por otro lado, en este trabajo se aborda el problema de las personas que sufren quemaduras en casi la totalidad de su superficie corporal y se plantea una posible solución a nivel quirúrgico y de regeneración dérmica. En las quemaduras de espesor completo y en las de espesor parcial profundas, el proceso de cicatrización se desarrolla en fases sucesivas: eliminación del tejido necrosado espontánea o quirúrgicamente, regeneración del tejido conjuntivo-vascular y la re-epitelización espontánea o por colocación de un autoinjerto cutáneo. La escisión de la quemadura tiene la ventaja del cierre inmediato y definitivo de la herida con la incorporación en el mismo acto operatorio de un autoinjerto de piel. Pero el problema se agrava cuando no es posible el cierre primario por escasez de sitios donadores. Esto ocurre en pacientes con quemaduras masivas, en quienes se hace necesario cubrir las heridas tras el desbridamiento quirúrgico.

Para solucionar este problema se han desarrollado una serie de coberturas de las heridas que, por su composición, pueden ser biológicas, semi-sintéticas o sintéticas y pueden tener una función de cobertura temporal o definitiva. Hasta el momento, ninguna de estas coberturas supera las propiedades que la propia piel del paciente otorga. Desgraciadamente, ésta no está siempre disponible en cantidad suficiente y por ello resulta necesario encontrar alternativas.

El presente trabajo de investigación consiste en mejorar una estructura llamada equivalente dérmico (ED) que se forma a partir del cultivo de queratinocitos y fibroblastos del propio paciente. Aunque el ED funciona como cobertura definitiva, presenta varios inconvenientes: un tiempo elevado para su síntesis, fragilidad en cuanto a su manejo, bajo porcentaje de supervivencia en el lecho del paciente y un alto coste. Por ello, se pretende encontrar un biomaterial que sirva de soporte al ED generado *in vitro*, con el objetivo de favorecer la supervivencia y proliferación de los queratinocitos y fibroblastos obtenidos del propio paciente y que le proporcione la consistencia adecuada para facilitar su manejo en el acto quirúrgico.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción a los biomateriales y sus aplicaciones en la reparación tisular

Los biomateriales han sido ampliamente estudiados a lo largo de la historia. Sin embargo, es a partir de la Segunda Guerra Mundial cuando surge una necesidad de resolver problemas relacionados con la tecnología médica y la reparación tisular y esta disciplina empieza a cobrar fuerza. En este estudio se han utilizado una serie de biomateriales (BM) de origen natural y sintético para la realización de protocolos de reparación del tejido cardíaco y dérmico. En los siguientes apartados se describirá cada uno de ellos, incidiendo en las propiedades que los hacen adecuados para esas aplicaciones.

El término biomaterial ha tomado muchas definiciones, pero no es hasta septiembre de 1991 en la segunda conferencia de consenso sobre definiciones en el campo de biomateriales, cuando la Sociedad Europea de Biomateriales (*European Society for Biomaterials-ESB*) decidió definir los biomateriales como "material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano"[1].

Hoy en día, el uso de biomateriales con fines regenerativos sigue creciendo en el campo de la biomedicina. Son utilizados en la cura de heridas, como sistemas de liberación controlada de fármacos, como injertos vasculares o para la reconstrucción de tejidos entre otras muchas aplicaciones [2].

No obstante, para que la tecnología de los biomateriales siga en auge es necesario establecer un diálogo entre varias disciplinas como son la biología, la medicina, la cirugía, la ingeniería de materiales, la física y la química, con el fin de diseñar y fabricar nuevos materiales, y evaluar y seleccionar el más adecuado para cada aplicación o necesidad.

1.1. Propiedades y clasificación de los biomateriales

La finalidad de un biomaterial (BM) es entrar en contacto con un sistema biológico, por ello debe cumplir unas características esenciales que no desencadenen reacciones no deseadas, garantizando así su biocompatibilidad. Además, debe desempeñar su función en el entorno asignado y lo debe hacer en el tiempo deseado [3, 4]. Todo esto hace que en el diseño de los BM sea necesario combinar de manera armoniosa una serie de elementos como son la textura, la forma, su estructura biomecánica, sus características físico-químicas o su solubilidad ente otros.

Entre las características más relevantes que debe cumplir un biomaterial con fines terapéuticos encontramos las siguientes [5, 6]:

1) ser biocompatible, es decir que no cause rechazo por parte del sistema inmune del organismo en el que se implanta. 2) Ser bio-activo, permitiendo el crecimiento del tejido en su interior. No ser tóxico ni carcinogénico. 3) Tener un diseño de ingeniería adecuado a la anatomía del órgano, es decir tener un tamaño y forma acorde al sitio de implantación, y ser de fácil manejabilidad para su uso terapéutico. Además, debe tener unas características topográficas adecuadas para la función a desempeñar como son la rugosidad, la porosidad, el potencial eléctrico, y el comportamiento hidrófobo o hidrófilo. 4) Tener un bajo coste, ser reproducible y fácil de fabricar a gran escala.

Según el origen de los biomateriales, éstos pueden ser naturales, sintéticos o una combinación de ambos (Tabla 1). Según la respuesta que ejercen en el organismo implantado pueden considerarse inertes o bioactivos y en función de su durabilidad, temporales/biodegradables o permanentes.

Naturales	Polisacáridos	Almidón, celulosa, alginato, quitosano	Se usan principalmente en forma de hidrogeles, pudiendo administrar de manera controlada factores de crecimiento. También tienen uso en la industria alimentaria y química [7, 8].
	Proteínas	Seda, lana, colágeno, fibrinógeno.	Se usan como tejidos en suturas, vendaje corneal, regeneración de órganos, etc. [9, 10]
	Poliésteres	PLA, PHB, PGA, PLGA	Se usan como materiales de suturas y administración controlada de medicamentos [11-15].
Sintéticos	Metales	Aceros inoxidables, aleaciones cobalto-cromo, titanio	Se usan como prótesis compactas debido a sus buenas propiedades mecánicas. Generalmente en aplicaciones ortopédicas o en implantes dentales.
	Cerámicos	La principal materia prima, la arcilla.	Químicamente inertes y muy estables. Se usan en cirugías del oído, como relleno de defectos óseos, etc.
	Poliméricos	Destacan los poliésteres alifáticos: PCL, PA	Se usan en forma de tejido y no tejido. Poseen una elevada flexibilidad y fuerza mecánica. Por sus propiedades parecidas a los tejidos vivos son muy usados en implantes y en ingeniería de tejidos [16, 17].
Mezclas		Combinación de naturales y sintéticos	Tienen aplicaciones y usos muy heterogéneos ya que sus propiedades dependen de la proporción y tipo de biomateriales incluidos.

Tabla 1. Clasificación de los biomateriales según su naturaleza. *PLA:* ácido poliláctico, *PHB:* polihidroxibutirato, *PGA:* ácido poliglicólico, *PLGA:* ácido poliláctico-glicólico, *PCL:* policaprolactona, *PA:* poliamida.

1.2. Método de fabricación de los biomateriales: la electrohilatura

Existen diferentes procedimientos experimentales que permiten el procesamiento de biomateriales para obtener piezas o dispositivos útiles en el campo de la ingeniería de tejidos. Entre ellos, los no tejidos están ganando importancia por sus propiedades físico-químicas, rendimiento mecánico y biocompatibilidad. El método utilizado para la fabricación de los biomateriales utilizados en esta tesis es el método de la electrohilatura [18].

Este método es económico, eficiente y permite crear biomateriales compuestos por fibras en escala micro y nanométrica. Les confiere una gran diversidad de características como es una amplia superficie por unidad de área, porosidad y una serie de propiedades mecánicas que son muy atractivas para una gran variedad de aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, una de las aplicaciones más prometedoras de los biomateriales obtenidos con esta técnica dentro de la ingeniería de tejidos es como soporte de células. Además, se pueden fabricar adaptándose a los requerimientos anatómicos y a las especificaciones mecánicas del lugar de aplicación [19].

La técnica permite procesar una gran variedad de biomateriales, ya que permite ajustar las características que se deseen en las fibras a través de modificaciones en los parámetros básicos de ejecución. Estos parámetros pueden estar relacionados con la naturaleza y cantidad del polímero base (concentración de la solución de polímero, tensión superficial, conductividad de la solución) y con otros parámetros dentro del proceso (voltaje, flujo de salida, distancia entre la punta de la aguja y el plato colector). El método se describe con más precisión en el apartado 1.1 de Material y Métodos.

Las perspectivas futuras de esta técnica van enfocadas al diseño personalizado de biomateriales, ya sea con la combinación de otros materiales y/o encapsulando en sus fibras medicamentos para su liberación controlada, factores de crecimiento o genes que estimulen la regeneración tisular favoreciendo el crecimiento, proliferación y diferenciación de las células. Todo ello con la finalidad de obtener elementos funcionales con mejores propiedades para una aplicación determinada [20].

1.3. Descripción de los biomateriales utilizados

En este trabajo, se han evaluado una serie de biomateriales con el propósito de que en el futuro puedan ser utilizados con fines regenerativos. Por este motivo, a continuación se presenta una breve descripción de los BM estudiados así como una perspectiva general de su uso en la actualidad y sus últimos avances en investigación. Entre los polímeros estudiados se encuentran los poliésteres sintéticos (PCL) y naturales (PLA, PLGA y PHB), poliamidas (PA) y los polímeros naturales como la fibroína de seda (SEDA). Estos biomateriales se encuentran dentro de la categoría de los polímeros biodegradables, excepto la poliamida que no se considera como tal.

En general, y desde el punto de vista de la ingeniería tisular, los polímeros sintéticos ofrecen mayores ventajas que los naturales, ya que ofrecen la posibilidad de poder ser modificados y de diseñar sus propiedades de acuerdo a las necesidades. Los poliésteres suponen un grupo importante de polímeros. Se caracterizan por sus enlaces éster en la cadena principal (-CO-O-), que los hace degradables hidrolíticamente. Las poliamidas se caracterizan por sus grupos amida (-CONH-) y al contrario que los poliésteres, presentan interacciones intermoleculares fuertes [21].

Policaprolactona (PCL): se obtiene a partir de la polimerización por apertura del anillo de la ϵ -caprolactona (Figura 1). Se trata de un polímero semicristalino con un punto de fusión de 60 °C y una temperatura de transición vítrea de alrededor de -60 °C, lo que lo convierte en un termoplástico que se puede modelar aplicando temperatura y endurecer rápidamente con el frío. Tiene un tiempo de degradación muy elevado, alrededor de dos años [22]. Para aumentar la velocidad de bioabsorción se sintetizan copolímeros con el PCL, ya que se sabe que la composición de algunos copolímeros se degrada más rápido que sus polímeros puros. Este fenómeno es consecuencia de las diferencias morfológicas que hay entre los polímeros y especialmente a la disminución de la cristalinidad [23]. Un ejemplo de ello con gran utilidad en clínica es el co-polímero de PCL con ácido poliglicólico (PGA), el ácido poli caprolactona-co-glicólico (PCL-co-PGA). Comercialmente es conocido como Monocryl® y son suturas quirúrgicas, sintéticas y absorbibles indicadas para ligaduras de tejidos blandos. El tiempo de absorción en este caso es de 91 a 119 días.

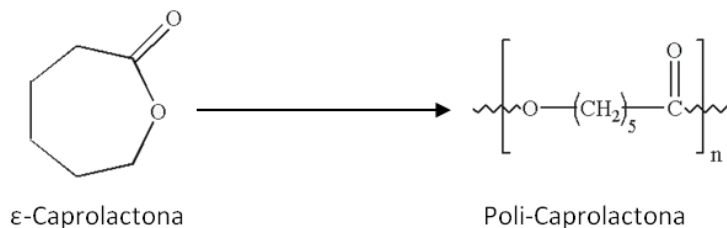


Figura 1. Síntesis de la policaprolactona (PCL).

Ácido poliláctico (PLA): Es un polímero natural formado por la polimerización de moléculas de ácido láctico (Figura 2). Pertenece a la familia de los poliésteres. Es biodegradable, biocompatible y degradable mediante un mecanismo de hidrólisis y actividad enzimática, no mutágeno y resistente a los procesos de esterilización [24]. Es uno de los pocos materiales que están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration), la agencia reguladora en Estados Unidos, para su uso en aplicaciones médicas. Debido al grupo metil extra que posee, el PLA tiene un comportamiento más hidrofóbico que otros polímeros. El PLA puede presentar un comportamiento quiral, es decir, se pueden encontrar dos estructuras con la misma química que, según hagan girar la luz polarizada a derecha o a izquierda, se conocerán como enantiómero dextrógiro (ácido poli-D-láctico PDLA) o levógiro (ácido poli-L-láctico PLLA), respectivamente. La principal diferencia entre estos enantiómeros radica en su capacidad de cristalización, una vez polimerizados. En este trabajo se utilizó el PLLA como polímero base para la generación de no tejidos por el método de la electrohilatura. Es un polímero biocompatible, ya que una vez es implantado en el organismo empieza su degradación por hidrólisis, dando como resultado monómeros de ácido láctico [25]. Las propiedades del PLLA hacen que en la actualidad este biopolímero sea usado en la fabricación de tornillos y clavos para unión de ligamentos y fijación de fracturas, suturas, liberación de fármacos, etc; todas ellas son aplicaciones en las que se deben soportar cargas relativamente moderadas. Además, si es procesado en forma de nanofibras, adquiere una superficie porosa y gracias a ello es capaz de permitir la adhesión celular. Por ello, ha sido ampliamente estudiado en el campo de la regeneración de tejidos como el cutáneo, hepático, cartilaginoso, óseo y cardiovascular [26, 27].

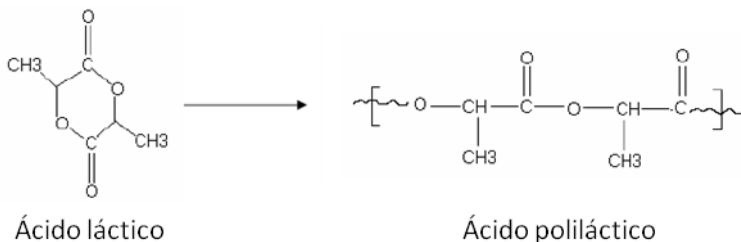


Figura 2. Síntesis del ácido poliláctico (PLA).

Ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA): es un co-polímero formado por la combinación del ácido láctico y el ácido glicólico (PGA) (Figura 3). El hecho de ser una combinación de dos polímeros hace que sus propiedades cambien según la proporción de ambos. Esta clase de procesos de copolimerización son muy útiles para la modificación de las propiedades de los polímeros de acuerdo a las aplicaciones requeridas. Su biodegradación y carácter hidrófobo se pueden cambiar de acuerdo a la relación entre sus monómeros. Por ejemplo, el PLGA formado por 50% de ácido glicólico y 50% de ácido láctico presenta una degradación más rápida que la de sus homopolímeros puros. Esta propiedad ha influido que en la actualidad se estén diseñando con el PLGA sistemas liberadores de fármacos [28]. También está aprobado por la FDA para uso en la industria farmacéutica [29, 30]. El co-polímero de PLGA más importante es el formado por un 90% de ácido glicólico y un 10% de ácido L-láctico. Está comercializado por la marca Ethicon como suturas absorbibles con el nombre comercial VICRYL.

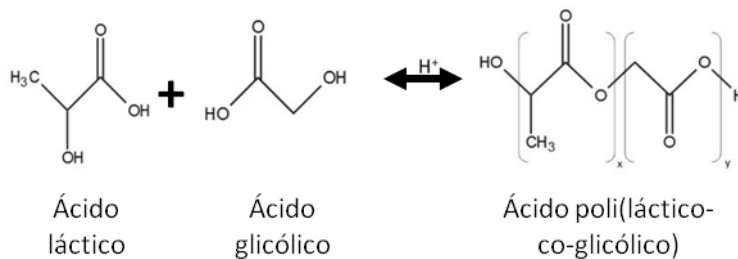


Figura 3. Síntesis del ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA).

Polihidroxibutirato (PHB); es un polímero obtenido a partir de microorganismos. Los principales polímeros obtenidos por este método son los llamados polihidroxicanoatos (PHA), dentro de los cuales se encuentra el PHB (Figura 4). Su síntesis es a partir de bacterias, como producto de asimilación de carbono (a partir de glucosa o almidón) y es empleado por éstas como una forma de almacenamiento de energía para ser metabolizado en condiciones de estrés fisiológico [15, 31]. La biosíntesis empieza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA, que es reducido posteriormente a hidroxibutiril-CoA que se utilizará como monómero para polimerizar PHB. El homopolímero puro PHB es cristalino y muy frágil. Por ello, se ha realizado un copolímero compuesto por PHB y PHV (el polihidroxicanoato, polímero de la familia de los PHA) que es menos cristalino que el PHB solo y por ello resulta más flexible y más fácil de procesar. Es ampliamente investigado en estudios médicos

como material implantable por sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad [32, 33].

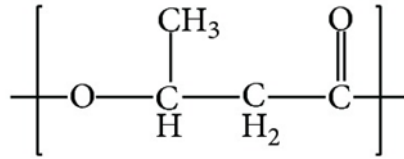


Figura 4. Estructura química del polihidroxibutirato (PHB).

Poliámidas (PA): también denominadas nylons o nilones, son polímeros cuyas unidades repetitivas contienen grupos amida (-CONH-) (Figura 5). El enlace CO-NH recibe el nombre de enlace amida o peptídico. El número y distribución de dichos grupos son los que determinan sus propiedades. El hecho de contener en su composición grupos nitrógeno (indispensable para el crecimiento de microorganismos), grupos amida (carácter polar) y puentes de hidrógeno confiere a las poliámidas unas excelentes propiedades mecánicas. Las poliámidas presentan una extraordinaria capacidad para formar fibras debido a sus enlaces de hidrógeno y a su alto grado de cristalinidad por lo que incrementa su resistencia en la dirección de la fibra. Se las considera no biodegradables ya que su velocidad de degradación es excesivamente lenta. Sin embargo, en condiciones *in vivo* los enlaces de hidrógeno pueden ser destruidos, por lo que las poliámidas pueden ser utilizadas en aplicaciones biodegradables como suturas reabsorbibles [1].

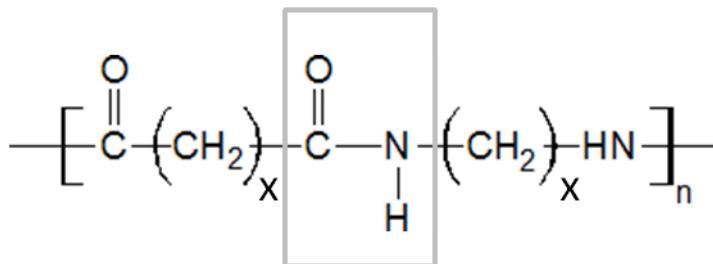


Figura 5. Estructura química de la poliámida (PA).

SEDA: Es un biopolímero natural que procede de la fibroína del gusano de seda *Bombyxmori* [34-36]. De las dos proteínas que forman los hilos de seda del capullo, la fibroína constituye el 72-81% (Figura 6). La otra proteína es la serina, que es eliminada en los procesos de elaboración de la fibroína para su aplicación como biomaterial debido a que restos de esta proteína producen reacciones inflamatorias [35, 37]. La fibroína es una glicoproteína hidrofóbica que contiene gran cantidad de enlaces de hidrógeno y posee una estructura semicristalina conformada por una fase cristalina ordenada de hojas- β antiparalelas que le confiere resistencia, separadas por espaciadores de hoja- β menos ordenados que le dan flexibilidad y elasticidad a la fibra. Todas estas propiedades junto con la de biocompatibilidad y degradabilidad, las han hecho hoy en día conocidas por su uso en dispositivos biomédicos como las suturas quirúrgicas. No obstante, la fibroína sigue abriendo una vía de investigación en el campo de las tecnologías de regeneración[38]. Por ejemplo se han realizado estudios en los que se ha combinado la fibroína con el ácido hialurónico y se han utilizado como soporte para el cultivo de células madre mesenquimales y se observó que esta combinación favorecía la respuesta de estímulos regenerativos [39]. También se ha estudiado la combinación de la fibroína con quitosano con células mesenquimales para la reparación de lesiones en rodillas de conejos [40]. Otro estudio ha estudiado la misma combinación pero con células madre de tejido adiposo para el desarrollo de un injerto de nervio artificial en ratas [41]. También se ha estudiado el uso de la fibroína como andamio para la reconstrucción de núcleo pulposo de los discos intervertebrales de la columna vertebral. Este estudio mostró a la fibroína como un biomaterial poroso con propiedades mecánicas únicas que proporcionaban a las células un microambiente óptimo para su proliferación [42].

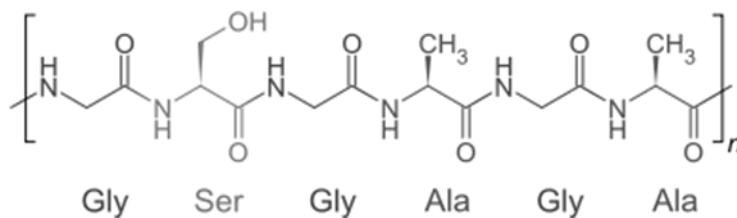


Figura 6. Estructura primaria de la fibroína. Gly: Glicina, Ser: Serina, Ala: Alanina

2. El infarto agudo de miocardio

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se han convertido en la principal causa de muerte más importante en todo el mundo en la última década. En 2010 se calculó que las ECV representaron el 30% de las muertes de todos los fallecimientos en todo el mundo [43]. Dentro de estas ECV, el infarto agudo de miocardio (IAM) representa la principal causa de mortalidad, constituyendo un 12,2 % del total, seguido por los accidentes cerebro-vasculares (9,7%). A nivel mundial, las ECV están ocasionadas por diversos factores de riesgos, muchos de ellos modificables, como son el tabaquismo, la obesidad abdominal, la inactividad física y una dieta rica en grasas y sal. Todo ello se traduce en hipertensión, diabetes, arteriosclerosis e hipercolesterolemia [44].

Entender el funcionamiento del corazón, así como todos los cambios metabólicos y anatómicos que se desencadenan en el miocardio tras un IAM, será de vital importancia para encontrar nuevas estrategias que contribuyan de forma significativa al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

2.1. Estructura y función del corazón

El corazón, junto con los vasos sanguíneos, forma parte del sistema cardiovascular. La función del corazón es bombear la sangre por todo el cuerpo y proporcionar así oxígeno y nutrientes a todos los órganos y controlar la temperatura corporal [45].

Para poder entender cómo lo hace, se exponen a continuación unas nociones básicas sobre la anatomía del corazón y sobre cómo se produce la contracción del corazón para realizar el ciclo cardíaco.

2.1.1. Anatomía del corazón

El corazón está compuesto por cuatro cavidades, dos aurículas superiores y dos ventrículos inferiores. El lado derecho del corazón está separado del izquierdo por un septo o tabique y no existe comunicación entre ellos, por lo que pueden funcionar de forma independiente. Entre las aurículas y los ventrículos sí existe comunicación y lo hacen a través de las válvulas cardíacas. Su función es evitar que exista reflujo retrógrado de la sangre. La válvula tricúspide, es la que separa la aurícula derecha del ventrículo derecho y la válvula mitral separa la aurícula izquierda del ventrículo izquierdo. Entre los ventrículos y las arterias

correspondientes también se encuentran otras válvulas llamadas semilunares. La válvula pulmonar es la que se encuentra entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar y la válvula aórtica entre el ventrículo izquierdo y la arteria aorta [46] (Figura 7).

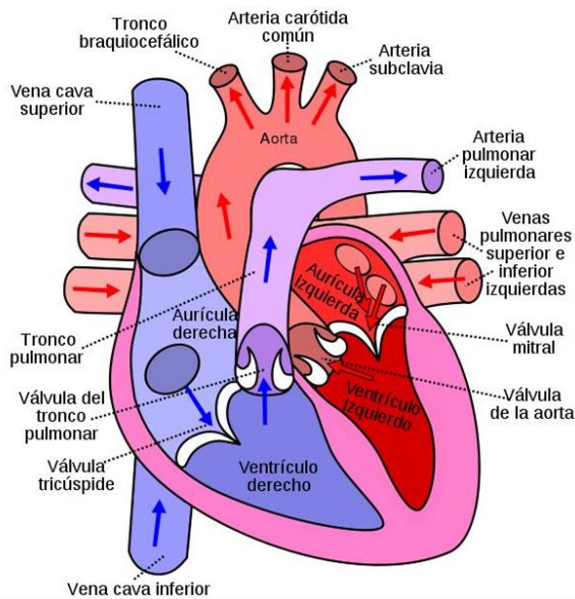


Figura 7. Anatomía del corazón. Las flechas indican el flujo de la sangre a su paso por las cavidades del corazón. Tomado de <https://es.pinterest.com/pin/281263939207215858/>.

2.1.2. Histología del corazón

A nivel histológico, el corazón está formado por tres capas: endocardio, miocardio y epicardio. El endocardio es la capa más interna y tapiza todas las cavidades cardiacas y las válvulas. La capa media es el miocardio y está formado por el músculo estriado cardíaco (los cardiomiocitos), matriz extracelular (estructura viscoelástica de fibras de colágeno tipos I y III, fibras elásticas, junto con un componente amorfo, que mantiene unidos a los cardiomiocitos entre sí y con la microcirculación capilar) y capilares. El epicardio es una membrana que recubre al corazón y que tiene como funciones principales reducir la fricción del corazón con otros órganos en el movimiento del corazón durante la contracción cardíaca e impedir las distensiones ventriculares bruscas [46].

El músculo estriado cardíaco está formado por células musculares anastomosadas. Estas células tienen uno o dos núcleos y están unidas entre sí a través de los discos intercalares, formando así las fibras del miocardio y asegurando el paso de la onda de despolarización de una célula a la siguiente [47].

Para que estas células funcionen existe toda una maquinaria molecular involucrada en la contracción muscular que comprende proteínas generadoras de fuerza (actina y miosina), proteínas reguladoras de la contracción (tropomiosina y troponinas) y proteínas estructurales (α -actinina y vinculina en el disco intercalar, proteínas de la banda M y proteína C). La elasticidad y la capacidad contráctil del músculo cardíaco son factores a tener en cuenta a la hora de diseñar procedimientos de ingeniería tisular como se discutirá más adelante.

2.2. Fisiopatología del infarto de miocardio

La isquemia cardíaca o infarto de miocardio (IM) se produce como consecuencia de la obstrucción de los vasos coronarios. El flujo sanguíneo es insuficiente y el aporte de oxígeno no cubre las necesidades metabólicas del miocardio; ello conlleva a una rápida muerte celular y a una consiguiente pérdida de la contractibilidad. Las principales causas de obstrucción del flujo sanguíneo, que dan lugar a la isquemia cardíaca, son la aterosclerosis y la oclusión coronaria aguda [48].

La aterosclerosis es una patología que se produce por el depósito progresivo de colesterol en la zona subendotelial de las arterias, principalmente de las coronarias. Posteriormente el tejido fibroso invade esa zona y se forman placas de ateroma, provocando una obstrucción total o parcial del flujo sanguíneo [49](Figura 8).

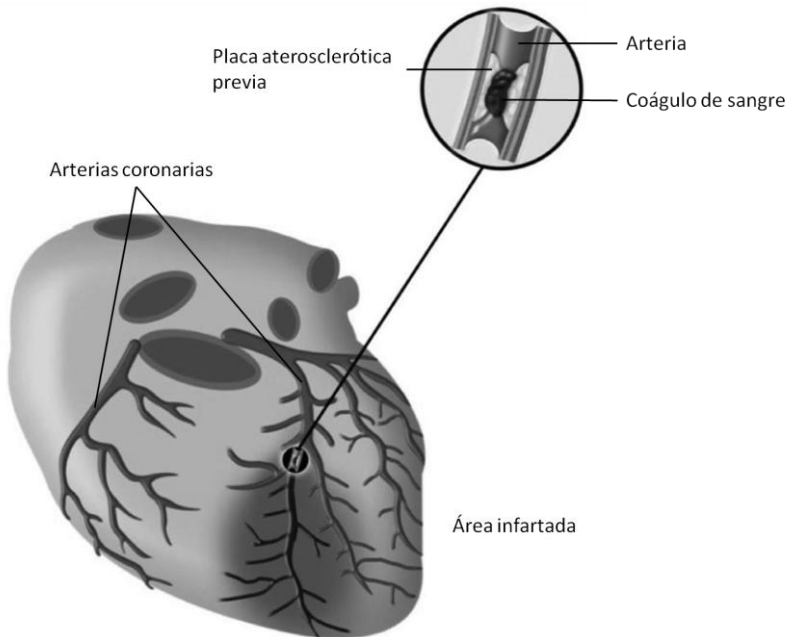


Figura 8. Depósito de una placa de ateroma con posterior formación de un trombo en la arteria coronaria. Tomado de Traupe T. Gloekler S. de Marchi SF, et al: *Assessment of the human coronary colateral circulation. Circulation 122:1210, 2010.*

La oclusión coronaria aguda ocurre frecuentemente en personas con una cardiopatía aterosclerótica coronaria grave subyacente. Este proceso se debe a la obstrucción de la arteria debido a la formación de un coágulo (trombo) originado por el depósito de células sanguíneas y fibrina sobre la superficie rugosa de las placas de ateroma. La placa va creciendo hasta llegar a obstruir la luz del vaso. Otras veces, el trombo se desprende y circula por la sangre hasta obstruir un vaso cuyo diámetro es menor que el suyo propio [50].

Los requerimientos metabólicos del corazón son muy estrictos y cuando hay una interrupción del aporte de oxígeno y nutrientes se inicia una situación en la cual el corazón no posee la capacidad de generar suficiente energía para mantener su funcionalidad [51]. Tras el comienzo del IM se desencadena una secuencia temporal de cambios bioquímicos, ultraestructurales, histoquímicos e histológicos que se explica a continuación. A los pocos segundos de producirse la isquemia, aparecen los primeros efectos celulares. La situación de hipoxia

generada provoca la acumulación de productos derivados del metabolismo anaerobio así como un descenso en la síntesis de adenosina 5'-trifosfato (ATP). Se produce el cese del metabolismo de ácidos grasos y comienza la glucólisis anaerobia que conlleva la producción de lactato (Figura 9). Esto compromete la relajación y contracción del miocardio y puede empezar a desarrollar una lesión celular irreversible en los primeros 20 minutos tras la oclusión. Si no se revierte el efecto a tiempo (por reperfusión o por una circulación colateral muy extensa), a partir de las 4-6 horas la necrosis del músculo cardíaco suele ser total y da lugar al IAM.

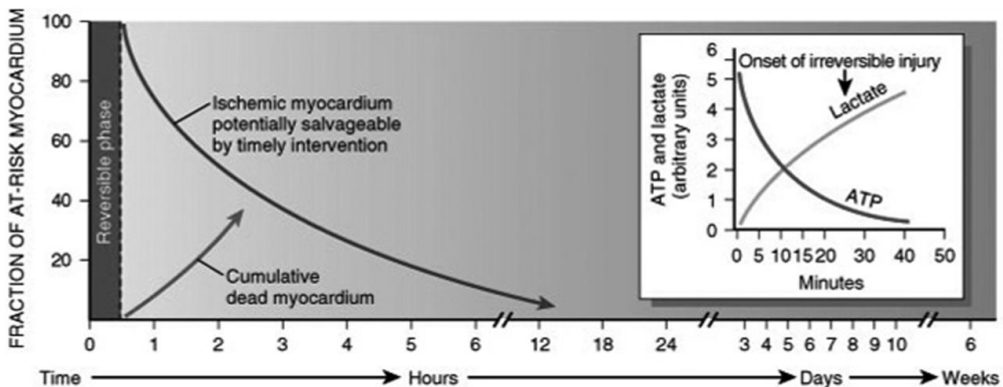


Figura 9. Esquema del marco temporal de la reperfusión precoz y tardía del miocardio en el territorio de una arteria coronaria ocluida. Aproximadamente durante 30 min después del comienzo de la isquemia más grave, la lesión miocárdica es potencialmente reversible. Después se produce una pérdida progresiva de viabilidad, que resulta completa a las 6-12 h. Los beneficios de la reperfusión son superiores cuando se realiza antes y van disminuyendo conforme se retrasa. Tomado de Schoen FJ: *The heart*. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N [eds]: *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2009.

Los mecanismos de respuesta tras el daño isquémico activan una serie de procesos de remodelado que se da en tres fases solapadas (Figura 10): inflamatoria, proliferativa y de cicatrización.

La **fase inflamatoria** empieza con la muerte celular del miocardiocito, iniciándose así la respuesta de inflamación propia de los mecanismos innatos de inmunidad. Esta respuesta inflamatoria aguda es mediada, entre otros, por la liberación de interleuquina-1 β (IL-1 β) y del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), principalmente por parte de macrófagos residentes y neutrófilos. También es

mediada por la IL-6 y las moléculas con actividad quimiotáctica, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o factor de células madre (SCF). Tanto la IL-1 β (importante mediador en la respuesta inflamatoria) como el TNF- α , inducen la expresión de moléculas de adhesión y de otras citoquinas que atraen a células inflamatorias hacia el sitio de la lesión. También estimulan la proliferación de células endoteliales y fibroblastos favoreciendo el aporte del flujo sanguíneo y la formación de tejido cicatricial en la zona isquémica. El miocardiocito experimenta una serie de cambios tanto funcionales como en su ultraestructura [52, 53]. Al mismo tiempo, se activa la acción de metaloproteinasas (MMPs) en la matriz extracelular promoviendo su degradación y favoreciendo a su vez la infiltración de neutrófilos y células mononucleadas que eliminan los restos celulares de la zona [54, 55]. De esta forma se va formando una matriz provisional a base de fibrina.

En la **fase proliferativa**, las células inflamatorias liberan factores quimiotácticos tales como el factor derivado del estroma-1 (SDF-1) o la interleuquina-8 (IL-8), implicados en el reclutamiento de progenitores vasculares, activándose la revascularización de la zona lesionada [56]. También se sintetiza el mediador angiogénico, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La liberación de altos niveles del factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1) [57] e IL-10 [58] marca la transición de la fase inflamatoria a la proliferativa. El TGF- β 1 está implicado en la atracción de fibroblastos del propio tejido así como en su diferenciación a miofibroblastos. Al mismo tiempo, se produce un depósito de fibronectina por parte de los fibroblastos y macrófagos de la zona isquémica. Se forma así una segunda matriz provisional a base de colágeno. También se sintetizan los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), que inhiben la actividad proinflamatoria, permitiendo así el comienzo de la tercera fase.

En la **fase de maduración o cicatrización**, la matriz extracelular evoluciona hasta formar una cicatriz madura y densa, que garantiza la estabilidad y el funcionamiento del corazón. Los miofibroblastos son los encargados de esta transformación. Liberan los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), se detiene la degradación de la matriz extracelular y producen colágeno. La formación de la cicatriz madura impide una mayor dilatación ventricular.

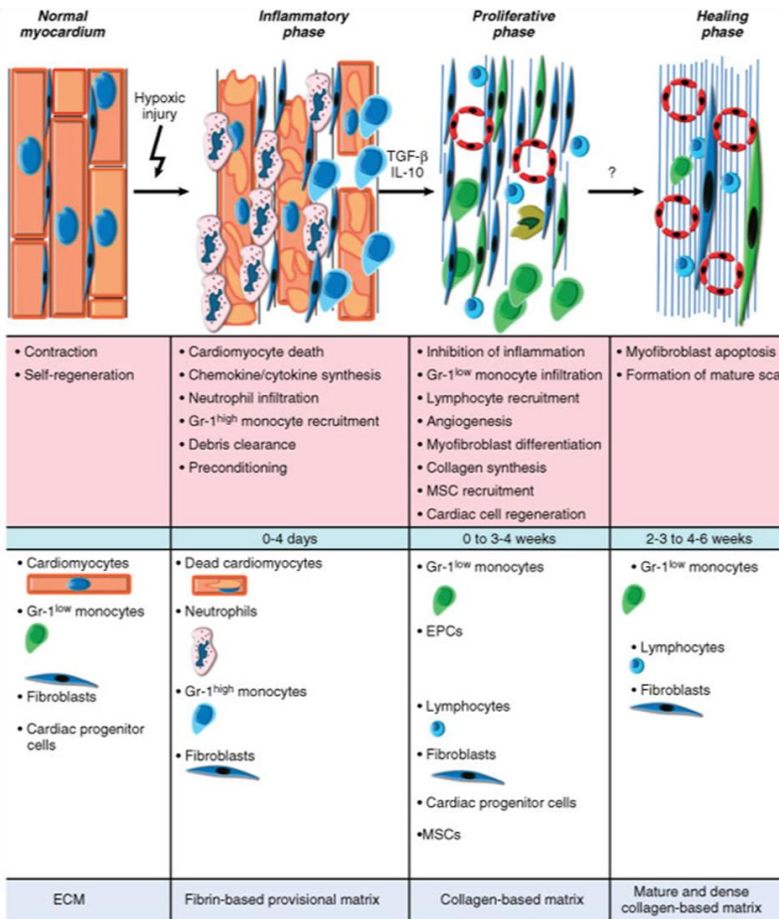


Figura 10. Cicatrización tras un IM. Tres fases solapadas: inflamatoria, proliferativa y de cicatrización. Cada una de ellas se caracteriza por una serie de procesos y acontecimientos específicos mediados por diferentes células controladas por quimiocinas específicas. El TGF- β y la IL-10 marcan la transición de la fase inflamatoria a la proliferativa. La matriz extracelular (MEC) evoluciona hasta formar una cicatriz madura, que garantiza la estabilidad y el funcionamiento del corazón. Los monocitos GR-1 light inducen inflamación y fagocitosis, mientras que los monocitos GR-1 low favorecen la cicatrización. Tomado de Liehn EA, Postea O, Curaj A, Marx N: Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: The role of chemokines. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2357.

Como se ha visto, el reclutamiento secuencial de subpoblaciones de monocitos realiza un papel fundamental en la cicatrización miocárdica. La primera población de células mononucleares pro-inflamatorias y con actividad fagocítica se encarga de eliminar los restos necróticos mientras que la segunda población de

monocitos se caracteriza por ser menos inflamatorios y contribuyen a la cicatrización estimulando la formación de un tejido de granulación.

A nivel histológico, el músculo cardíaco tras un IM también experimenta unos cambios que pueden ser observables a varios niveles según la progresión del IM. Las alteraciones macroscópicas son difíciles de detectar hasta que no pasan de 6 a 12 horas desde el comienzo de la necrosis. La lesión creada puede afectar a todo o a casi todo el grosor de la pared ventricular (infarto transmural) o solo afectar al subendocardio, el miocardio intramural o ambos pero sin extenderse a todo el espesor de la pared ventricular hasta el epicardio (infarto no transmural o subendocárdico). Sin embargo, se puede identificar la zona de necrosis tan solo de 2 a 3 horas tras el IM gracias a tinciones como el cloruro de trifeníltetrazolio, que marca la zona no infartada de color rojo mientras que la infartada no capta la tinción.

A nivel microscópico, los primeros cambios después del IM se observan a los 20 min y consisten en la reducción del tamaño y número de gránulos de glucógeno, el edema intracelular y la tumefacción con distorsión del sistema tubular transversal, retículo sarcoplásmico y mitocondrias. A partir de los 60 min se produce el aturdimiento de las células miocárdicas y de las mitocondrias así como agregación de la cromatina nuclear y relajación de las miofibrillas. Como consecuencia de estos cambios, los efectos celulares provocados por el IM entre los 20 min y las 2 h de isquemia son irreversibles, produciéndose una progresión de estas alteraciones [59]. Las características microscópicas del IM a largo plazo se explican y se muestran en la figura 11.

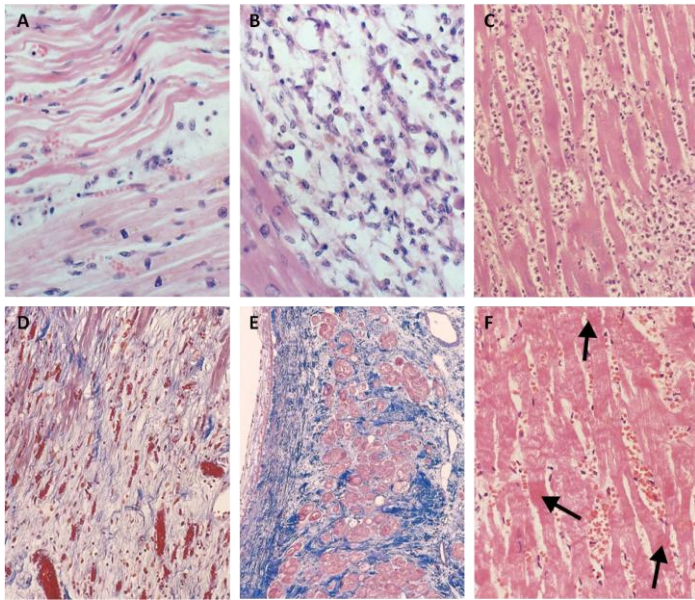


Figura 11. Características microscópicas del infarto de miocardio. **A.** Infarto de 1 día con necrosis coagulativa, fibras onduladas con elongación y estrechamiento, en comparación con las fibras normales adyacentes (inferior derecha). Espacios ensanchados entre las fibras muertas que contienen líquido de edema y neutrófilos dispersos. **B.** Infiltrado denso por leucocitos polimorfonucleares en una zona de infarto agudo de miocardio de 3 a 4 días de evolución. **C.** Eliminación casi completa de miocitos necróticos por fagocitosis (≈ 7 a 10 días). **D.** Tejido de granulación con una rica red vascular y depósito temprano de colágeno, aproximadamente 3 semanas después del infarto. **E.** Infarto de miocardio bien cicatrizado con sustitución de las fibras necróticas por una cicatriz colágena densa. Existen escasas células musculares cardíacas, residuales. (En D y E el colágeno es azul por la tinción tricrómica de Masson). **F.** Necrosis miocárdica con hemorragia y bandas de contracción, visible como bandas oscuras que abarcan varias miofibras (flechas). Éste es el aspecto característico del miocardio con isquemia avanzada sometido a reperfusión. Tomado de Schoen FJ: *The heart*. In kumar V, Abbas AK, Fausto N [eds]: *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2009.

Todos estos cambios celulares y moleculares pueden constatar el complejo proceso de remodelado cardíaco que se efectúa tras un IM. El corazón intenta mantener su funcionalidad pero existe una limitación importante para su recuperación ya que el tejido cardíaco posee una reducida capacidad de regeneración. Esto hace inevitable la continuidad de la cicatriz en el miocardio [60].

Los eventos que tienen lugar tras un IM desencadenan unos cambios de tamaño, forma y grosor del ventrículo izquierdo (VI) y dan lugar a lo que se conoce como **remodelado ventricular**. Este fenómeno afecta tanto al segmento infartado como a los no infartados y puede influir en la función y el pronóstico ventricular. Una combinación de cambios, tales como la dilatación e hipertrofia del VI en el miocardio no infartado, es responsable del remodelado. Las zonas sanas del miocardio se hipertrofian para compensar la pérdida de músculo cardíaco. A pesar de ello se produce una reducción del gasto cardíaco, ya que la capacidad de bombeo del VI disminuye. Este efecto se ve aumentado por la distensión sistólica, que en cada sístole el tejido miocárdico sano se contrae, mientras que la zona isquémica, que ha perdido su capacidad contráctil, es incapaz de soportar la presión del ventrículo y es empujada al exterior, disipando parte de la fuerza de bombeo para impulsar la sangre desde el ventrículo hacia la circulación (Figura 12)[61].

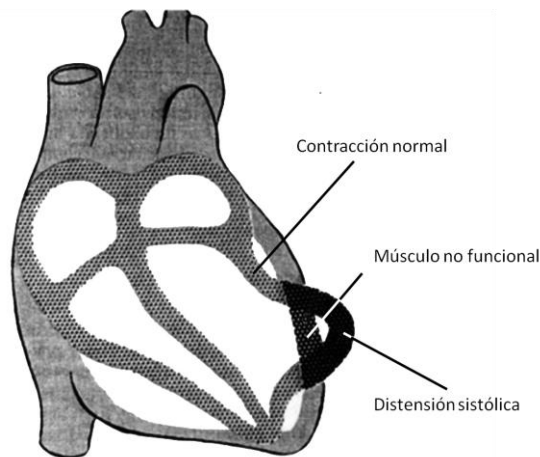


Figura 12. Distensión sistólica en una zona isquémica del miocardio. Tomado de Guyton. 1996.

La sobrecarga sobre la zona sana va provocando en las zonas adyacentes cambios como hipertrofia celular y dilatación ventricular, con el consiguiente deterioro de la función cardíaca. Con el tiempo, la afectación de la función cardíaca desencadena una insuficiencia cardíaca, que se define como la incapacidad del corazón para bombear la cantidad de sangre necesaria para cubrir las demandas de oxígeno y nutrientes del organismo. En este estudio se plantea el uso de biomateriales para prevenir el remodelado ventricular, como se detallará más adelante.

2.3. Tratamiento del infarto de miocardio

2.3.1. Tratamiento convencional

Los tratamientos actuales del IAM van desde el tratamiento en la fase aguda para reducir de manera inmediata la progresión del infarto y la demanda del corazón, seguido de la reperfusión precoz de la arteria obstruida mediante fármacos trombolíticos y/o la colocación de dispositivos de asistencia mecánica (angioplastia y stents vasculares), hasta el tratamiento quirúrgico como la derivación aortacoronaria o en última instancia el trasplante del corazón [62].

Tratamiento farmacológico en el momento agudo

Los principales objetivos en los inicios del IAM son detener la progresión del infarto lo antes posible, mermar las demandas al corazón, paliar el dolor y evitar más complicaciones derivadas de la isquemia cardíaca.

El tratamiento tradicional se basa en el uso de varios compuestos, según el estado del paciente y en qué fase del IM se encuentre en el momento de su ingreso. Como medidas inmediatas, se debe administrar al paciente **oxígeno** para contrarrestar el déficit en los tejidos y reducir así la carga del corazón; se administrará **nitroglicerina** (sublingual o intravenosa) como vasodilatador y un **analgésico** (el de elección suele ser la morfina) para el tratamiento del dolor [63, 64]. Como tratamiento farmacológico general, todos los pacientes sin contraindicaciones deberían recibir tratamiento oral con **β -bloqueantes** pues bloquea los efectos de la adrenalina en los receptores β , retardando los impulsos nerviosos que pasan por el corazón y disminuyendo las necesidades de oxígeno del mismo, disminuyendo así la isquemia tisular [65]. También se utilizan los **antiagregantes plaquetarios**, como la aspirina, para favorecer la reperfusión arterial, reducir las probabilidades de re-infarto y de accidentes cerebrovasculares y el **clopidrogel** como tratamiento preventivo.

Tratamiento de reperfusión

El siguiente paso terapéutico tras realizar estas medidas iniciales es la reperfusión de la arteria coronaria bloqueada de manera farmacológica (trombolisis) y/o de forma mecánica mediante angioplastia y stent vascular [66]. El procedimiento de **angioplastia** consiste en la introducción de un catéter con un balón por la arteria ocluida y una vez se ha llegado al punto de obstrucción, el

balón es inflado y a continuación desinflado abriendo la luz de la arteria y restaurando el flujo sanguíneo. En el 80% de los casos, al mismo tiempo que se realiza la angioplastia se coloca una **stent vascular** (pequeño tubo mallado) en el interior de la arteria que ayudará a mantenerla abierta. Actualmente se han desarrollado stent vasculares recubiertos de medicamentos que se liberan poco a poco ayudando a prevenir la reestenosis.

Tratamiento quirúrgico

En algunos pacientes puede ser conveniente realizar una operación quirúrgica para mejorar la isquemia, para disminuir la disfunción valvular, para reducir las desventajas mecánicas provocadas por el remodelado ventricular o, cuando fracasan todas las demás opciones, para realizar un trasplante cardíaco. Entre los tratamientos quirúrgicos actualmente empleados se realiza la **revascularización arterial coronaria o bypass coronario** que consiste en la colocación de segmentos de vasos sanguíneos desde la aorta hasta la coronaria ocluida. En algunos pacientes, la dilatación y la disfunción ventriculares son tan graves que se hace necesaria una **reconstrucción ventricular directa** para mejorar el funcionamiento cardíaco. Los objetivos son eliminar el segmento infartado para restaurar una cavidad ventricular elíptica, reducir la tensión parietal remota, favorecer la orientación helicoidal de las fibras y aumentar el engrosamiento de la porción de la cavidad afectada. A continuación, en la zona intervenida se coloca un parche (parche de dracón endoventricular). En el mejor de los casos, con esta intervención se disminuyen un 30% los volúmenes telesistólicos al mismo tiempo que se consigue un tamaño adecuado del ventrículo. Otro caso en el que se requiere la cirugía es en pacientes con elevado grado de disfunción ventricular izquierda. En estos casos, el remodelado progresivo del VI, hace necesaria la **reparación o sustitución de la válvula mitral o aórtica**. En otros casos, se hace necesaria la implantación en el corazón de **dispositivos de asistencia ventricular (DAV)**. Son aparatos mecánicos que se utilizan para reemplazar la función de un corazón dañado de manera temporal o de por vida. El **trasplante de corazón** es en último término la terapia de elección y consiste en la sustitución del corazón dañado por otro. Es, hoy en día, el único tratamiento realmente eficaz para la insuficiencia cardíaca debida a un IAM. Desgraciadamente hay escasez de donantes y además existen problemas asociados a la terapia inmunosupresora que el paciente trasplantado ha de llevar de por vida [67].

Gracias a todos estos tratamientos, se ha conseguido mejorar y prolongar la vida de estos pacientes, no obstante, ninguno de ellos alcanza a regenerar el tejido cardíaco dañado. Es por ello que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a alcanzar este objetivo ayudaría a mejorar de forma significativa los tratamientos de las enfermedades cardiovasculares. Aunque se han desarrollado varios tipos de terapias con este último fin (terapia proteica [68-74], génica [75-78], celular), en este proyecto se expondrá a continuación una breve revisión de la terapia celular en la regeneración cardíaca, así como sus nuevas aplicaciones hacia el mundo de la bioingeniería.

2.3.2. La terapia celular

Aunque se ha demostrado que el corazón es un órgano capaz de auto-regenerarse se ha visto que lo hace de una manera limitada e insuficiente [79, 80]. Además, se ha comprobado la presencia en el corazón de células madre capaces de dar a lugar a cardiomiocitos [79], pero éstas no son capaces de reparar el daño producido en el tejido cardíaco tras un IAM. Todas estas evidencias apuntan a que para promover una mayor recuperación del tejido cardíaco dañado es necesario un aporte externo que ayude a restaurar el flujo sanguíneo en la zona afectada y que regenere el daño producido en el órgano. Con esta idea, surgen las llamadas terapias avanzadas, que constituyen nuevas estrategias para tratar enfermedades humanas que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces.

En el caso que nos ocupa, la terapia celular en tejido cardíaco, se ha aprovechado la capacidad de auto-renovación y diferenciación de las células madre hacia otros tipos celulares para tratar la isquemia cardíaca. La búsqueda se centra en encontrar un tipo celular que pueda diferenciarse en cardiomiocito, que éste sea funcional en el tejido cardíaco circundante y que pueda formar vasos que mantengan el tejido regenerado, todo ello con la finalidad de disminuir el remodelado ventricular y mejorar la función cardíaca. En los últimos años, se ha analizado el potencial terapéutico de varios tipos de células madre tanto en modelos experimentales [81-83] como en ensayos clínicos [84-87].

Se han utilizado **células madre embrionarias** en modelos de IAM murinos, donde se observó que los cardiomiocitos derivados de las células madre embrionarias implantados en el tejido cardíaco dañado, indujeron la regeneración del corazón y un beneficio funcional del mismo [81, 82]. Aunque tienen una gran capacidad de diferenciación, este tipo celular despierta un dilema ético, además

de presentar unas limitaciones para su uso clínico como la formación de tumores y su inmunogenicidad. En este sentido, es importante señalar el descubrimiento de la reprogramación de células adultas hacia estadios de desarrollo más tempranos y con características parecidas a las de las células madre embrionarias. Estas células han sido llamadas **células madre pluripotentes inducidas** o iPS del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells* [88]. De igual forma que en las células embrionarias, se ha demostrado la capacidad de diferenciación de las iPS a cardiomiocitos funcionales en un modelo de IAM murino [83, 89]. Sin embargo, su capacidad tumorigénica sigue representando un problema. Por otro lado, está la utilización de las **células madre adultas**. Éstas presentan una capacidad de diferenciación más limitada pero tienen otras características que las hacen idóneas para su uso en clínica: no entrañan problemas éticos, se pueden obtener de diferentes tejidos adultos y pueden autorrenovarse y diferenciarse, restaurando así el tejido dañado. Todo ello hace pensar que se pueden usar como posible terapia autóloga.

Existen muchos tipos celulares derivados de tejidos adultos que se encuentran en estudio (Tabla 2).

TEJIDOS ADULTOS	CÉLULAS MADRE	REFERENCIAS
CORAZÓN	CSC	[90-92]
MÉDULA ÓSEA	MSC	[93-111]
	HSC	[79, 112-115]
TEJIDO ADIPOSO	SVF	[116-134]
	ADSC	[103, 118, 129, 135-145]
MÚSCULO ESQUELÉTICO	MIOBLASTOS	[146-156]

Tabla 2. Tipos de células madre derivadas de tejidos adultos usadas en estudios de terapia celular cardiaca. *CSC: células madre cardíacas; HSC: células madre hematopoyéticas; MSC: células madre mesenquimales; ADSC: células madre derivadas de adipocitos; SVF: fracción estromal vascular.*

Existen diferentes teorías sobre los mecanismos por los cuales las células madre adultas reparan los tejidos. Se han postulado tres mecanismos, la transdiferenciación, la fusión celular y la liberación de mediadores paracrinos [157]. Los dos primeros mecanismos están relacionados con el concepto de

plasticidad celular, el cual se fundamenta en que las células madre de un tejido se pueden diferenciar en células especializadas de otro tejido. El mecanismo de transdiferenciación implica que una célula madre al diferenciarse adopta las características de otro tipo celular de diferente linaje [158, 159], mientras que el mecanismo de fusión celular explica el fenómeno mediante la transferencia del contenido celular de una célula trasplantada con la célula residente cuando éstas se fusionan [160]. A medida que se realizaron más estudios, quedó patente la existencia de ambos mecanismos, pero también se observó que se producían en un porcentaje muy bajo y no demostraban los mecanismos terapéuticos desencadenados *in vivo*. Es decir, aunque se ha comprobado la diferenciación celular *in vitro*, ésta no siempre se da *in vivo*. La carencia de un entorno adecuado, como la presencia de niveles óptimos de nutrientes y oxígeno, una matriz extracelular adecuada o la liberación de factores y citoquinas específicos que contribuyan a la diferenciación, impide el asentamiento y la supervivencia de las células receptoras y así la regeneración del tejido.

De esta manera, ha tenido más relevancia la teoría del efecto paracrino, en el cual se induce la reparación del tejido dañado por la activación de las células madre residentes o por la secreción de factores pro-angiogénicos y anti-apoptóticos de las células trasplantadas [96, 156].

Independientemente del mecanismo de acción de las células trasplantadas, se encuentra otra limitación en la terapia celular y es la capacidad de injerto y supervivencia de las células trasplantadas. Esto puede deberse en parte por la vía de administración mayoritariamente utilizada, la inyección intramiocárdica de las células en suspensión, que se pierde un alto porcentaje de células tanto en el momento de la inyección como posteriormente. Se ha visto que después de 48 horas más del 70% de células no sobreviven, debido a las condiciones de hipoxia, inflamación, fibrosis del tejido circundante o por falta de adhesión a la matriz [161].

No obstante y a pesar de las limitaciones comentadas sobre la terapia celular, cabe esperar que si se mejora la capacidad del injerto y la supervivencia celular se potencie su efecto terapéutico. Con este fin, se han desarrollado nuevas estrategias dentro de la bioingeniería y la búsqueda de nuevos materiales compatibles a nivel celular es uno de los principales objetivos.

2.3.3. La ingeniería tisular y los biomateriales en la terapia celular

La ingeniería tisular engloba un conjunto de conocimientos, técnicas y métodos de base biotecnológica que permiten diseñar y originar sustitutos tisulares o tejidos artificiales a partir de células madre y biomateriales. Por ello, la ingeniería tisular se presenta como un gran avance para la terapia celular y la medicina regenerativa.

Concretamente en el campo de la bioingeniería cardio-regenerativa, el uso de BM en este ámbito pretende solventar los problemas que ocurren tras un IM. El BM se sintetizaría para ser implantado posteriormente en la zona afectada y cumpliría tres objetivos terapéuticos [162]:

- Vehículo y liberación controlada: El BM actuaría como vehículo para ayudar al transporte celular hasta la región del miocardio dañado. Además, podría servir como sistema de liberación controlada de células, factores y/o fármacos.
- Contención. El BM actuaría de soporte para evitar o disminuir la distensión sistólica originada del remodelado ventricular.
- Prevención de adherencias pericárdicas. Después de una intervención a tórax abierto se produce una fibrosis que provoca adherencias pericárdicas que hacen más complicadas las segundas intervenciones si así hiciera falta. La utilización de BM podría prevenir tanto la reacción fibro-inflamatoria como las adherencias pericardio-tórax. Diferentes estrategias ya han sido ideadas; entre ellas destacan el uso de soluciones lubricantes [163], la utilización de pericardios autólogos [164] o heterólogos (de otros órganos u especies) o la imposición de sustitutos permanentes no biodegradables como el Goretex [165] o biodegradables [166].

Centrándonos más en el primer objetivo, se han realizado estudios que han demostrado que la inyección celular en combinación con biomateriales (gelatina, colágeno o fibrina) o la administración de células mediante su adhesión previa a un sustrato mostraron una mayor supervivencia de las mismas, además de un efecto terapéutico más homogéneo en la zona dañada [167, 168]. Por todo ello,

se ha potenciado el estudio de diferentes tipos de soportes tanto en su composición, origen o forma, para aumentar los beneficios de la terapia celular en el lugar de injerto. A continuación, se muestra los tipos de soportes más relevantes.

Soportes biocompatibles

Se está trabajando en la combinación de diferentes biomateriales con diversos tipos celulares para favorecer el injerto de las células en la zona dañada.

Estudios recientes han empleado la técnica de la electrohilatura (Apartado 1.2 de la Introducción y apartado 1.1 de Material y Métodos) para la fabricación de BM con un patrón dirigido. Con esta técnica se han podido crear matrices con microporos en su estructura interna o con las fibras organizadas a modo de canales. Con ello se ha favorecido la angiogénesis o la disposición de las células de forma que simularan la organización del corazón [169].

Los principales biomateriales con los que se ha trabajado son los biomateriales sintéticos como los PGA, PLA o su co-polímero PLGA. También con componentes de la matriz extracelular como el colágeno [170], la fibrina [168], la gelatina o el alginato [171]. Todos ellos se caracterizan por su biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Por citar varios estudios realizados con algunos de los BM comentados, se puede destacar el trabajo de Kellar y colaboradores [172, 173]. En sus estudios utilizaron una matriz de PLGA con fibroblastos cultivados en su superficie, que posteriormente fue implantada en el corazón de un ratón al que se le realizó un modelo de IM. Un mes tras el implante se observó la revascularización del tejido así como una mejora en la función ventricular.

El siguiente estudio sirvió de ejemplo para destacar que en algunos casos no es el propio efecto regenerativo de las células trasplantadas el que infunde un efecto beneficioso sino el efecto paracrino que provocan con su presencia. Se utilizó un gel de alginato en combinación con células madre fetales de rata y se implantó en un modelo murino de IM. Se observó revascularización del parche pero las células trasplantadas fueron reemplazadas por colágeno. Aun así se observó una mejora en la función cardiaca como consecuencia del remodelado positivo del corazón y de la revascularización [171, 172].

También se han realizado estudios en modelos animales de isquemia cardiaca utilizando hidrogeles de matriz extracelular procedentes de placenta humana y en su interior células de cardiomiocitos derivados de iPSc humanas cultivadas *in vitro*. El grupo de Francis y colaboradores inyectó el hidrogel en el miocardio de rata después de realizar un IAM por ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (ADAI). El hidrogel creado a partir de la matriz extracelular de placenta demostró ser rico en colágeno, proteínas de membrana basal y factores de crecimiento VEGF- β y HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos), entre otros. Se observó una reducción significativa en el volumen de la cicatriz y el tejido superviviente mantuvo una actividad electrofisiológica normal [174].

Sistemas sin soporte

Los sistemas sin soporte prescinden de matrices que actúen de andamios para el crecimiento celular, es decir, son las propias células las que forman el parche. Consiste en cultivar láminas de células para formar diferentes modelos de tejido 3D. Estas láminas se mantienen conectadas por las uniones intracelulares y la matriz extracelular sintetizada por las células. Esta técnica se ha podido conseguir gracias al desarrollo de placas termosensibles [175]. Estas placas contienen en su base una lámina del polímero poli (N-isopropil acrilamida) que es sensible a la temperatura, de forma que a bajas temperaturas, el cultivo celular sembrado en su superficie se desprende con facilidad en forma de monocapa. Para la construcción de parches más gruesos se pueden unir varias láminas celulares, aumentando así el número de células implantadas en el lugar de la lesión [176].

Cuando se crea un parche de células formada por la unión de varias láminas, es posible que el grosor impida la difusión de oxígeno y nutrientes esenciales, llegando a crear necrosis en la parte central del parche. Por ello, la creación de parches celulares con la adición de células endoteliales ayudaría a la revascularización de los parches tridimensionales [177].

Con esta idea, el grupo de Kawamura ha creado un parche con cardiomiocitos humanos derivados de iPS en combinación con un parche de omentum para que éste proporcione un aumento del suministro de sangre. Las láminas de células creadas se trasplantaron en corazones porcinos con IAM con y sin soporte de omentum. Los resultados mostraron que los cardiomiocitos derivados de iPS que estaban formando los parches acompañados con el colgajo de omentum eran

funcionales *in vivo*. Además, histológicamente se observó más densidad vascular en el área trasplantada por lo que, gracias a una mayor angiogénesis en la zona se aumentó la supervivencia de las células trasplantadas, pudiendo éstas ejercer su efecto terapéutico [178].

Otro estudio en el que se utilizaron varias láminas de células fue el llevado a cabo por Homma y colaboradores [179, 180]. En este estudio se construyeron láminas de células de mioblastos de triple capa y se trasplantaron en el lugar de la lesión de corazones en ratas recién nacidas y adultas con un IAM previamente inducido. En las ratas recién nacidas se mejoró la capacidad autorregenerativa en el espesor de la pared, la fibrosis y la función cardíaca y se observó un mayor número de cardiomiocitos en proliferación que en el grupo de ratas adultas y que en el de ratas recién nacidas sin láminas de mioblastos. También se observó un aumento de las redes vasculares y de células c-kit positivas [179]. Estos resultados proporcionan nuevos datos esenciales para la terapia clínica en pacientes infantiles.

Una de las ventajas de utilizar estos sistemas sin soporte es que no se induce respuesta inflamatoria ni inmunogenicidad debida a la presencia de materiales externos. Además, por los últimos estudios publicados, se sabe que se puede inducir la angiogénesis *in vitro* aumentando la vascularización *in vivo*, consiguiendo así una mejora en la función cardíaca y en el remodelado ventricular de los corazones con lesión inducida. No obstante, sigue teniendo el inconveniente de que es necesario recurrir a la cirugía para su implante.

Matrices decelularizadas

Las matrices decelularizadas se obtienen por la eliminación celular completa de un tejido u órgano. De esta manera la matriz resultante se puede recelularizar con las células de interés y trasplantar el conjunto en el sitio que lo requiera por ejemplo a modo de parche en el pericardio. Con este método se consigue minimizar la inmunogenicidad y a la vez, se mantiene la estructura de la matriz extracelular nativa, lo que contribuye a mantener las propiedades mecánicas y biológicas. De esta manera, la matriz extracelular retenida en el tejido decelularizado puede ser utilizada como andamiaje para las nuevas células, ayudando a su adherencia y supervivencia y favoreciendo así la reconstrucción tisular [181].

Los últimos estudios realizados con matrices decelularizadas aplicadas como parches cardíacos han mostrado la ventaja de poder ser diseñados de acuerdo al tamaño y forma de la zona de lesión tras un IAM. Además, se ha observado que muestran una fisiología contráctil y eléctrica normal *in vitro*. En un estudio llevado a cabo por Wang y colaboradores, cultivaron células cardíacas derivadas de iPSC humanas en una matriz extracelular del corazón previamente decelularizada y se puso *in vivo* en el área de infarto. Se observó que mejoró la función cardíaca en ratas con IAM [182].

En otros estudios en los que se sembraron células progenitoras cardíacas embrionarias en una matriz extracelular de submucosa del intestino delgado porcino previamente decelularizada, se observó que las células se diferenciaron a cardiomiocitos y a células endoteliales y mostraron contractibilidad 7 días después de su cultivo. Después de este tiempo en cultivo se trasplantaron los parches en corazones de ratones infartados y tras cuatro semanas del trasplante éstos estaban firmemente unidos al miocardio y se mantenían viables. El trasplante mejoró la función cardíaca, disminuyó el área de cicatrización del miocardio del VI y redujo la fibrosis y la insuficiencia cardíaca [183].

En general, las ventajas que se obtienen con la utilización de matrices decelularizadas son que no inducen respuesta inflamatoria ni inmunogenicidad, aumentan la vascularización en el lugar implantado, mejoran la función cardíaca y el remodelado ventricular y proporcionan estructura mecánica a las células trasplantadas y acondicionamiento eléctrico. No obstante, sigue presentando unas desventajas como son la distribución irregular de las células trasplantadas y la necesidad de cirugía para su trasplante.

De acuerdo con los resultados expuestos en la utilización de los diferentes tipos de parches y teniendo en cuenta sus ventajas e inconvenientes, en general su uso puede resultar provechoso, sobre todo cuando se trata de zonas del corazón pequeñas.

Sin embargo, en los casos en los que el corazón empieza a no ser funcional la única solución llega a ser el trasplante de corazón. Desgraciadamente, en esta situación se presentan dos problemas, que son la escasez de órganos y la incompatibilidad del paciente con el órgano receptor. Aunque hoy en día hay avances en el desarrollo de corazones mecánicos, éstos siguen presentando problemas de tromboembolismos o la reducida calidad de vida del paciente. La ingeniería de órganos enfocada en este sentido es una alternativa teórica al

alotrasplante [184]. La decelularización de corazones completos de cadáveres o incluso procedentes de cerdos se puede ejecutar mediante la perfusión de detergentes y la recelularización con células cardiovasculares derivadas de células madre. Teniendo en cuenta los muchos aspectos que todavía necesitan ser solucionados tras la aplicación de esta técnica (eliminación total del ADN del órgano donante, creación de una pared de grosor similar a un corazón normal, fuente celular óptima en cuanto a cantidad y funcionalidad, etc.), la opción de crear órganos con esta técnica representa una nueva posibilidad de encontrar nuevas terapias para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

3. Las quemaduras

3.1. Estructura y función de la piel

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano, representa el 15% del peso corporal y cubre aproximadamente una superficie de 1,7 m² en el adulto. Sus funciones principales son las de mantener la temperatura corporal y el balance de fluidos, además de proporcionar una barrera protectora frente a infecciones. Al mismo tiempo, a través del contacto con la piel, las personas obtienen información del entorno que les rodea mediante el tacto, la percepción de la temperatura y el dolor.

La piel está formada por dos capas, una externa llamada **epidermis** y una capa interna conocida como **dermis**. Ambas capas están unidas por la **lámina basal** (Figura 13). El grosor de la epidermis varía según la parte del cuerpo, desde 0,05 mm en los párpados a más de 1mm en las plantas de los pies [185]. La mayor parte del grosor de la piel es debida a la dermis y varía según la edad, el sexo y la parte del cuerpo.

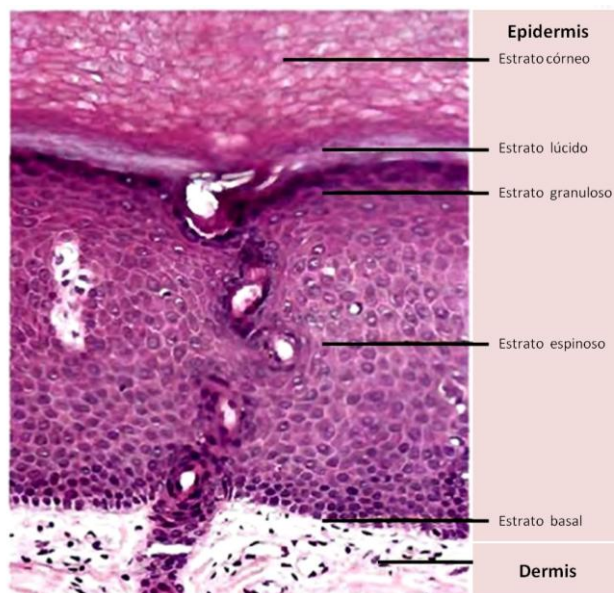


Figura 13. Microfotografía de una porción de la piel. Tomado de <http://4.bp.blogspot.com/-7WmSdiaviFM/VaGnxSJG1v1/AAAAAAAAOj4/QQWr5BEp0eY/s1600/Estructura+de+la+piel+5.jpg>

La **epidermis**, a su vez está formada por varios estratos. De dentro hacia fuera las capas que la componen son las siguientes: **estrato basal o germinativo** (monocapa de células cúbicas o cilíndricas bajas en continua división), **estrato espinoso** (formado por varias capas de células de morfología poligonal), **estrato granuloso** (compuesto de dos a cuatro capas de células más aplanadas que empiezan a queratinizar), **estrato lúcido** (solo en las pieles más gruesas, formado por dos a tres capas de células) y **estrato córneo** (formado por células escamosas, muertas, planas que se desprenden continuamente).

Además, la epidermis está constituida por cuatro tipos de células, siendo el queratinocito su célula principal representando el 90% frente a los demás tipos, los melanocitos (5%), las células de Langerhans (3-5%) y las células de Merkel (<0,1%).

Los **queratinocitos** empiezan a dividirse y diferenciarse en el estrato basal y van desplazándose hacia las capas más externas. Este proceso tarda de 2 a 4 semanas [186]. Los queratinocitos pierden su núcleo en el estrato lúcido y se convierten en células muertas aplanadas y queratinizadas en el estrato córneo. Desde el punto de vista bioquímico, los queratinocitos sintetizan citoqueratinas (CK) (principales componentes proteicos de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de las células epiteliales, así como de las uñas y el pelo) y dependiendo del estrato donde se encuentre la célula sintetizan un tipo u otro; en el estrato basal sintetizan CK5 y CK14, en el estrato espinoso CK1 y CK10, en la capa granulosa CK9 y en la capa córnea CK6 y CK16. Los **melanocitos** se encuentran principalmente en el estrato basal y son los que producen el pigmento melanina, elemento importante para la coloración de la piel y la protección frente a la radiación ultravioleta. Las **células de Langerhans** se encuentran sobre todo en el estrato espinoso, realizan la fagocitosis y desempeñan un papel fundamental en el sistema inmunitario, ya que pueden captar y presentar a los antígenos que llegan a la epidermis. Las **células de Merkel** son las células neuroendocrinas de la piel y se encuentran en el estrato basal.

Cuando se produce una lesión en la epidermis, los queratinocitos proliferan a partir de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas de la dermis y también, a partir de los propios bordes de la herida. Este proceso continúa hasta que se alcanza la reepitelización completa. Por todo ello, las lesiones epidérmicas pueden recuperarse al cicatrizar por regeneración o sin cicatrización, convirtiendo así a la epidermis en una capa con una alta capacidad de regeneración.

El **estrato basal** es la conexión entre la epidermis y la dermis. Esta conexión entre ambas capas se realiza a partir de interdigitaciones que se establecen a través de prolongaciones epidérmicas llamadas crestas, alternadas con proyecciones de la dermis hacia la epidermis denominadas papilas. Cabe mencionar la importancia de las uniones que se establecen entre las células del estrato basal (desmosomas) y entre las células basales y la lámina basal (hemidesmosomas). Estas uniones permanecen estables y aseguran la unión de la dermis y la epidermis hasta que los queratinocitos migran a las capas superiores. Las estructuras fundamentales que estabilizan la unión dermoepidérmica son las fibrillas de anclaje de colágeno VII derivadas de los queratinocitos que se extienden hacia la dermis [187]. Cuando se produce una lesión, estas fibrillas pueden tardar semanas o incluso meses en formarse durante la cicatrización y por ello, hasta que esto sucede se pueden producir roturas, ampollas e incluso pérdida de la epidermis [188].

La **dermis** se encuentra entre la epidermis y el tejido subcutáneo. Se encuentra dividida en dos compartimentos, la dermis papilar más superficial y la dermis reticular más profunda. Las fibras de colágeno representan el elemento más importante de la estructura de la dermis y junto con las fibras de elastina, aportan firmeza y elasticidad a la piel. La dermis contiene células destinadas a desempeñar las principales funciones de la piel; **fibroblastos** (células principales de la dermis, que sintetizan las fibras de colágeno y elastina), **mastocitos** (mediadores de la inflamación liberando histamina, heparina y serotonina) y **macrófagos**. Además de estos componentes, la dermis es rica en vasos sanguíneos (aportan nutrientes a las células de la dermis y epidermis, además de mediar en las respuestas inflamatorias locales y sistémicas tras una lesión [189]) y terminaciones nerviosas. También se localizan los **folículos pilosebáceos**, básicos en el proceso de epitelización tras una lesión ya que están recubiertos de queratinocitos de la epidermis. El componente no fibroso de la dermis se llama sustancia fundamental o matriz extracelular y está formada por glucosaminoglucanos (como ácido hialurónico y condroitín sulfato) y proteoglucanos, cuyas funciones son almacenar gran cantidad de agua (lo que contribuye al balance homeostático de agua y electrolitos) y regular las comunicaciones intercelulares mediante la unión y liberación de mediadores inflamatorios [190].

Cuando se produce una lesión, a diferencia de la epidermis, la dermis no regenera, por ello la calidad de la cicatriz resultante tras una herida será directamente proporcional a la afectación de la dermis [191].

3.2. Clasificación y fisiopatología de las quemaduras

3.2.1. Clasificación de las quemaduras

Denominamos quemaduras a las lesiones producidas en los tejidos vivos por agentes físicos, químicos y eventualmente biológicos, los cuales provocan alteraciones que varían desde el eritema hasta la destrucción de las estructuras afectadas [191].

Dependiendo de la profundidad, extensión y localización de las quemaduras se podrá diagnosticar una quemadura y por lo tanto realizar un pronóstico de la misma.

Según la profundidad de las heridas, las quemaduras se clasifican en (Figura 14):

- **De primer grado o eritema:** afectan a la epidermis. Existe enrojecimiento e hipersensibilidad. Es la típica lesión por exposición solar. En tres o cuatro días, la epidermis muerta se desprende y es reemplazada por queratinocitos regenerados.
- **De segundo grado superficial:** afecta a la epidermis y parte de la dermis. Aparecen flictenas y edema. Epitelizan espontáneamente antes de los doce o catorce días gracias a las células epiteliales de los anejos dérmicos.
- **De segundo grado profundas:** la lesión llega hasta la dermis más profunda. El lecho es pálido, rosáceo y seco debido a la mala perfusión vascular. La regeneración por epitelización espontánea será más lenta y costosa, más de veintiún días. Son más propicias a infecciones locales y por ello se recomienda tratamiento quirúrgico de la zona afectada mediante escisión y trasplante de autoinjertos.
- **De tercer grado o espesor total:** toda la dermis está afectada e incluso puede llegar al tejido subcutáneo y muscular. Se produce una destrucción total de las terminaciones nerviosas y de los vasos sanguíneos. No hay

posibilidad de reepitelización desde el lecho de la herida y por ello es totalmente inevitable la escisión e injerto de la zona afectada.

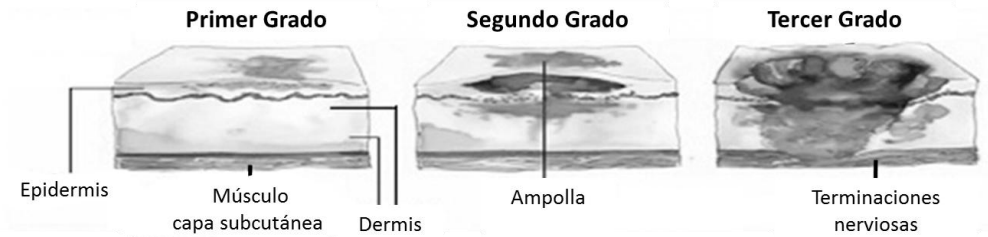


Figura 14. Tipos de quemaduras según el grado de profundidad de la herida. Tomado de <http://primerosauxiliosenlaindustria.blogspot.com.es/p/quemaduras.html>

Según la extensión de las heridas, las quemaduras se pueden valorar utilizando distintas reglas. A continuación, se exponen dos (Figura 15):

- **La regla de los 9 o de Wallace:** la extensión de las áreas quemadas se expresa en porcentaje según la superficie corporal total (SCT). La cabeza y las extremidades superiores representan el 9% de la SCT; el tórax, la espalda y cada una de las extremidades inferiores el 18%; los genitales suponen el 1%. Estos valores son algo diferentes para niños.
- **La regla del 1:** se usa en quemaduras no tan extensas y la valoración se realiza sabiendo que la palma de la mano representa un 1% del SCT. Esta valoración es válida para todas las edades.

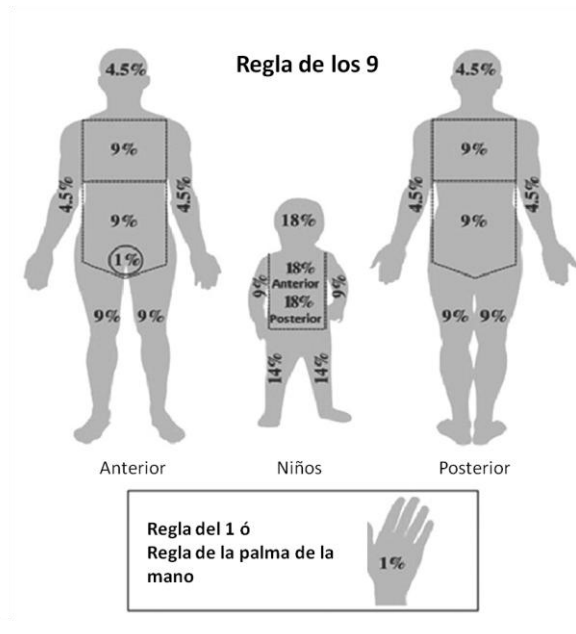


Figura 15. Cálculo de la superficie corporal quemada. La regla de los 9 o de Wallace y la Regla del 1 o Regla de la palma de la mano (recuadro interno). Tomado de http://legal.legis.com.co/document?obra=legcol&document=legcol_07a069b3d7330112e0530a0101510112

3.2.2. Fisiopatología de las quemaduras

La quemadura es un traumatismo que produce una lesión y como tal desencadena una serie de alteraciones a nivel local y otras a nivel sistémico. Las alteraciones sistémicas ocurren cuando la superficie quemada supera el 25-30% de la superficie total corporal. Estas alteraciones van desde una pérdida masiva de líquidos hasta el incremento de mediadores de la inflamación y si no se restaura el equilibrio a tiempo, se favorecen la hipoxia y el daño celular, se produce una disfunción orgánica o multiorgánica, se desencadena el fallo orgánico y finalmente, la muerte. A continuación, se expone la fisiopatología de las quemaduras a nivel local y sistémico.

Tras una quemadura, a nivel local se va a producir una zona de necrosis que irá perdiendo severidad conforme se aleja del centro de la lesión. Se van a originar

tres zonas concéntricas con fenómenos fisiopatológicos diferentes (Figura 16): (i) el **área central o de coagulación**, donde la necrosis celular es completa y corresponde a la escara inicial de la quemadura; (ii) el **área de estasis**, concéntrica al área anterior y con un número mayor de células viables. Se producen alteraciones en la microcirculación con fenómenos de agregación plaquetaria, depósitos de fibrina, microtrombos, etc. Con una adecuada actuación sobre la quemadura se evitará que esta zona evolucione a necrosis; (iii) el **área de hiperemia**, el área más periférica, muestra un daño tisular mínimo y casi siempre reversible. Presenta fenómenos de vasodilatación y un aumento del flujo sanguíneo debido a la acción de los mediadores locales de la inflamación. En el caso del gran quemado, para que la zona de estasis no derive a necrosis se incide en la reposición hidroelectrolítica y en una correcta modulación de la respuesta inflamatoria y metabólica [192].

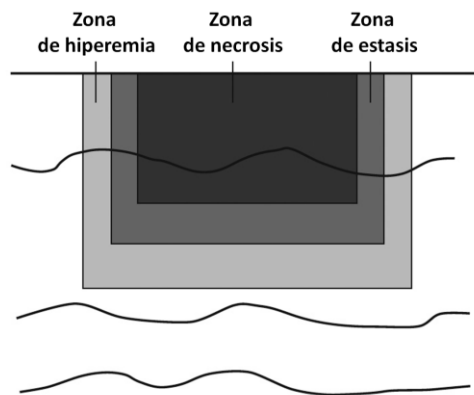


Figura 16. Áreas de afectación cutánea tras una quemadura. Descripción de Jackson en 1953 vigente hoy en día.

Además de ocasionar unos cambios a nivel local, cuando se produce una lesión por quemadura se genera una respuesta inflamatoria e hipermetabólica generalizada, con cambios en la producción de mediadores químicos (citoquinas, interleuquinas, histamina, etc) y activación de leucocitos [193]. Todo ello va a producir una serie de alteraciones sistémicas que si no se restauran a tiempo pueden llevar al paciente a un fallo multiorgánico y a la muerte.

Se distinguen tres procesos en la fisiopatología de la quemadura: (i) la fase de **shock post-quemadura**. Se produce extravasación de plasma en la propia quemadura y en tejidos circundantes lo que llevará a una disminución del gasto

cardíaco, del volumen plasmático, de la diuresis, del flujo periférico y de la liberación de oxígeno. La formación del edema se va incrementando en las 12-24 horas alcanzando su nivel máximo a las 24-48 horas postquemadura; (ii) **respuesta inflamatoria**. Tras la lesión se desencadenan una serie de procesos que pueden ser neutralizados por los propios mecanismos de protección de la inflamación o desencadenar en un daño tisular si el proceso inflamatorio no es resuelto por los mismos procesos inflamatorios. Se produce un aumento en la permeabilidad vascular, se activan y migran los leucocitos a través del torrente sanguíneo hasta llegar a la zona afectada, se desencadenan los procesos de fagocitosis y se produce la liberación de metabolitos. La misma lesión produce una liberación aguda de citoquinas que favorecen la inflamación, entre ellas se encuentran el factor α de necrosis tumoral (TNF- α abreviatura del inglés *tumor necrosis factor*) y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6). El área afectada es ocupada por monocitos y neutrófilos polimorfonucleares atraídos por las citoquinas. Al mismo tiempo, éstos migrarán del espacio intravascular y segregarán enzimas proteolíticos y radicales libres de O₂ que actuarán en el espacio intersticial fagocitando bacterias y tejido necrótico. De esta manera se iniciará el proceso de regeneración. Sin embargo, si se trata de un traumatismo o quemadura severa, la liberación de citoquinas será mayor y desencadenará un síndrome inflamatorio sistémico (SIRS). El organismo, para protegerse de esta excesiva respuesta inflamatoria, desencadenará una respuesta antiinflamatoria mediante la liberación de interleuquinas como la IL-10 y el TGF- β . No hay que obviar que este estado puede llevar al paciente a una situación de inmunosupresión dejándolo expuesto a infecciones oportunistas y finalmente a la sepsis; (iii) **respuesta hipermetabólica**. Esta fase es más acusada en quemaduras severas y en pacientes con un SCT mayor del 40%. Se caracteriza porque acarrea una pérdida de proteínas corporales y una bajada en las defensas inmunitarias, lo que supone un descenso en la capacidad de la curación de las heridas. Esta fase durará más de nueve meses y su intensidad dependerá de la extensión de la quemadura, del peso del paciente en el momento del ingreso y del tiempo transcurrido entre la quemadura y su escisión [194].

3.3. Tratamiento de las quemaduras

Durante años se trataron las quemaduras mediante lavados diarios y se dejaba que las heridas cicatrizaran por ellas mismas. Dependiendo de la profundidad y de la extensión de la lesión, las heridas tardaban en cicatrizar entre 2 y 6 semanas; esto hacía que se desencadenara una prolongada e intensa respuesta inflamatoria y en el mejor de los casos la cicatriz terminaba contraída e hipertrófica y en el peor, ocasionaba la muerte del paciente [195, 196].

Gracias a los avances en la reanimación y estabilización de los pacientes quemados, se ha conseguido aumentar la supervivencia de los mismos. Esto ha supuesto contar con un margen de tiempo que antes no se tenía y ha permitido tratar a estos pacientes de manera más personalizada y especializada. En este tiempo, el mayor avance ha sido la escisión quirúrgica de la quemadura de manera precoz con el consiguiente cierre de la misma de manera personalizada. Dada la supervivencia de estos pacientes, el reto en el siglo XXI es elegir no solo el tratamiento adecuado de las quemaduras para conseguir una buena evolución del paciente sino también una buena calidad de las cicatrices.

3.3.1. La problemática del gran quemado

El principal objetivo en el tratamiento de las heridas por quemadura es el cierre de las mismas con la epidermis del propio paciente. Muchas veces esto se consigue de manera espontánea pero cuando la quemadura es de tercer grado, se requiere de una intervención lo más rápida posible. En estos casos, se escinde el tejido quemado y se cubre la herida con un injerto autólogo.

El problema viene cuando, además de tratarse de quemaduras de tercer grado el porcentaje de SCT quemada supera el 30%; se trata de pacientes con quemaduras profundas y masivas. Se crea la difícil situación en la que hay mucha área de superficie corporal quemada y poca área donante para cubrirla. Solo la piel del propio paciente cumple realmente la función y por lo que hemos explicado, en ocasiones ésta es escasa. En la actualidad no existe un sustituto permanente de la piel realmente eficaz por sí mismo. Por ello, es habitual que ante un paciente de este tipo, se recurre a la combinación de varios sustitutos cutáneos tanto temporales como permanentes.

3.3.2. Tipos de sustitutos cutáneos: temporales y definitivos

Se considera apósito o sustituto cutáneo a todo material que se coloca en una herida o lesión, fijado con sutura, grapas o material autoadhesivo y que tiene propiedades funcionales y físicas parecidas a la piel [197].

En la actualidad se dispone de materiales alternativos para el cierre de las heridas por quemaduras y los hay tanto temporales como permanentes. Cabe mencionar otras clasificaciones de sustitutos de la piel. Según su composición, pueden ser epidérmicos, dérmicos o compuestos; según su procedencia pueden ser biológicos (xenoinjertos, homoinjertos o autólogos) o sintéticos (fabricados en laboratorios o de naturaleza industrial).

Los **sustitutos temporales de la piel**, ya bien sea por su composición (serán degradados por el huésped) o por su origen (no son autólogos y serán rechazados por el sistema inmunológico del propio paciente) no suponen una cobertura definitiva de la piel. No obstante, son clínicamente muy útiles ya que proporcionan un cierre fisiológico de las heridas evitando la deshidratación o ejerciendo de barrera contra infecciones. Actúan de vendajes de las zonas donantes para disminuir el dolor, ayudan en la epitelización o proporcionan un cierre temporal de las zonas de herida hasta que sea posible realizar un injerto del propio paciente (autoinjerto).

A continuación, se describen algunos apósitos temporales utilizados en la clínica hoy en día. En este grupo encontramos sustitutos de tipo biológico, como la membrana amniótica que se obtienen en la sala de partos, los xenoinjertos porcinos o los homoinjertos o aloinjertos cutáneos. Estos últimos proceden de piel de cadáver y son también usados como cobertura temporal de la piel. Aunque es rechazada por el huésped varias semanas después (entre 3 y 4), este tiempo permite realizar una evaluación del lecho y planificar la puesta de injerto del propio paciente. También hay una gran variedad de sustitutos temporales de naturaleza sintética o biosintéticos. Es el caso de la membrana de Biobrane®, sustituto de piel biosintético que está compuesto por una capa de silicona para evitar la evaporación y otra capa en contacto con el lecho de la herida formada por nailon y colágeno porcino. Supratel®, cobertura biológica compuesta por un polímero reabsorbible de poli-DL-láctico, es un sustituto epitelial que aumenta la matriz extracelular y favorece la reepitelización a través de la formación de la capa basal.

Los **sustitutos permanentes de la piel** son los que aportan una cobertura definitiva. En la actualidad, solo el injerto del propio paciente tiene esa cualidad, pero debido a la escasa área donante en pacientes con quemaduras masivas se hace necesario idear nuevas formas de coberturas definitivas. Por ello, es imprescindible la elaboración de un sustituto cutáneo que cumpla los siguientes requisitos: prevenir la pérdida de fluidos, que ejerza de barrera frente a las bacterias, que sea barato, que sea útil un tiempo prolongado, que sea flexible, que se adapte a la morfología irregular de la herida, que no se vuelva hipertrófico, que no transmita enfermedades víricas o desarrolle una respuesta inmunológica y que sea de fácil aplicación [198].

En la actualidad existen sustitutos de la piel que, aunque no son perfectos, son muy valiosos en las circunstancias clínicas descritas. Se exponen a continuación.

Existen hoy en día varios productos de elaboración industrial que regeneran la dermis. Entre los más conocidos están Integra® o Matriderm®; ambas están indicadas cuando hay una pérdida total de la dermis [199]. Integra® es un sustituto bilaminar formado por un análogo dérmico (colágeno bovino y glucoasaaminoglicanos) y una capa de silicona que hace de epidermis [200]. La matriz de colágeno es invadida por fibroblastos y otras células durante el proceso de epitelización al mismo tiempo que se va degradando. La capa de silicona se desecha cuando se ha producido la vascularización de la capa interna y se procede a la cobertura con un injerto de piel de espesor fino. La ventaja de esta cobertura es que se consigue una buena calidad cicatricial, ya que la reestructuración de la dermis es casi completa y ofrece la posibilidad de cubrir la herida con finas capas de epidermis, permitiendo que las zonas dadoras regeneren rápidamente y puedan ser usadas repetidas veces [201]. Matriderm® es otro sustituto permanente hecho con una monocapa de colágeno bovino y elastina. Funciona de manera similar a Integra® en cuanto a la manera de regenerar la dermis. Sin embargo, este apósito es más delgado (solo 1mm frente a los 2mm de Integra®) y esto permite que con un solo acto quirúrgico se coloque el regenerador dérmico (Matriderm®) y a continuación el autoinjerto muy fino. Dependiendo de la localización de la herida y la necesidad de una dermis más gruesa se elegirá uno u otro sustituto.

Por último, como sustitutos cutáneos permanentes, está el cultivo de queratinocitos autólogos. Existen de dos tipos, los formados únicamente por capas de queratinocitos (epidermis) y los compuestos por dos capas, una capa de

queratinocitos (epidermis) sobre una matriz de fibrina con fibroblastos en su interior que hace la función de la dermis. El primer tipo se coloca sobre la dermis del propio paciente o sobre algún tipo de sustituto de la dermis. El segundo tipo se coloca directamente sobre el lecho de la herida y se le denomina equivalente dérmico (ED). Estos sustitutos permanentes de piel se han podido desarrollar gracias a los avances en el cultivo de células epiteliales a partir de biopsias del propio paciente [202]. Tienen varios inconvenientes: el tiempo de cultivo de las células (aproximadamente 21 días), su alto coste, la fragilidad de las capas creadas de células, el bajo porcentaje de prendimiento y el difícil anclaje al lecho de la herida. No obstante, sigue siendo una buena opción cuando se trata de pacientes con quemaduras extensas y que no poseen áreas donantes. Actualmente, se investiga en mejorar estos sustitutos para obtener mejores resultados en cuanto a calidad y prendimiento de la piel.

OBJETIVOS

Los tratamientos actuales para el tratamiento del infarto agudo de miocardio (IAM) siguen siendo hoy en día limitados. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas que van encaminadas en la combinación de dos áreas de estudio, la ingeniería de tejidos y la terapia celular, la denominada bioingeniería cardioregenerativa. En este trabajo, hemos querido solventar los problemas que ocurren tras un IAM mediante dos objetivos terapéuticos: proporcionar un soporte a través de un biomaterial, para evitar o disminuir el remodelado ventricular que acaba conduciendo a insuficiencia cardiaca, y servir de soporte para el cultivo de células, actuando como vehículo para facilitar el transporte celular hasta la región dañada del miocardio. Para ello, proponemos la utilización de un BM que sea biocompatible y pueda ser implantado en el corazón de manera que proporcione un contacto adecuado biomaterial-corazón.

Por otro lado, en este trabajo se trata el problema de los pacientes que tienen un porcentaje de SCT quemada superior al 30%, lo que se traduce en mucha superficie corporal por cubrir y disposición de pocas áreas donantes. Aunque existen en el mercado muchos sustitutos cutáneos, ninguno cumple completamente las propiedades funcionales y físicas tan bien como la piel del propio paciente. Una de las alternativas para la cobertura de la región quemada, es la utilización de los cultivos de queratinocitos y fibroblastos del propio paciente en una estructura llamada equivalente dérmico (ED). Tiene la ventaja de ser un sustituto cutáneo autólogo permanente pero la calidad del injerto resultante y el porcentaje de prendimiento siguen siendo hoy en día muy bajos. En este estudio se ha querido mejorar el ED poniendo en su base un biomaterial resistente, biocompatible y con propiedades angiogénicas, con la finalidad de que aumente la manejabilidad del ED preservando su estructura, que aumente la supervivencia del injerto una vez depositado en el lecho y que se obtenga una mejor calidad de la piel nueva generada.

Los objetivos del presente trabajo han sido los siguientes:

- 1- Caracterizar distintos tipos de biomateriales y seleccionarlos según su comportamiento biológico, hidrofílico y mecánico.
- 2- Determinar la biocompatibilidad y degradabilidad de los biomateriales *in vivo* en un entorno cardíaco y dérmico.
- 3- Evaluar varios tipos de biomateriales como parches biocompatibles en un modelo de infarto agudo de miocardio en rata. El estudio se centrará en:

- a. Desarrollar un modelo de infarto agudo de miocardio en rata que permita evaluar el efecto de la aplicación de biomateriales como alternativa terapéutica.
 - b. Seleccionar biomateriales:
 - i. Con propiedades angiogénicas y anti-inflamatorias.
 - ii. Capaces de albergar y cultivar células para que sirvan como vehículo conductor hasta la zona de lesión.
 - iii. Capaces de adaptarse a la anatomía del órgano.
 - iv. Capaces de disminuir el remodelado ventricular.
- 4- Evaluar varios tipos de biomateriales como soporte de un equivalente dérmico en un modelo de xenotrasplante de piel en ratones inmunodeprimidos. El estudio se centrará en:
- a. Desarrollar un modelo de xenotrasplante de piel en ratón inmunodeprimido que permita evaluar el efecto de la aplicación de biomateriales en los injertos de piel.
 - b. Mejorar el equivalente dérmico con la adición de un biomaterial. Se pretende con ello aumentar:
 - i. La calidad del injerto.
 - ii. El porcentaje de prendimiento del injerto.
 - iii. La manejabilidad del equivalente dérmico.
 - iv. La superficie de contacto.
 - c. Seleccionar biomateriales:
 - i. Con propiedades angiogénicas y anti-inflamatorias.
 - ii. Que potencien el crecimiento de células dérmicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Biomateriales

Se analizaron 6 tipos de biomateriales (BM) que fueron preparados y proporcionados por el Instituto Tecnológico Textil AITEX, en forma de velos utilizando el método de la electrohilatura [18]. Los polímeros de base fueron poli (ε-caprolactona) (PCL), ácido poli-láctico (PLA), poli (3-hidroxibutirato) (PHB), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poliamida (PA) y fibroina de seda (SEDA). Los velos electrohilados, aunque de composición diferente, presentaban un aspecto similar. Son velos continuos que pueden ser cortados y manipulados con facilidad (Figura 17).

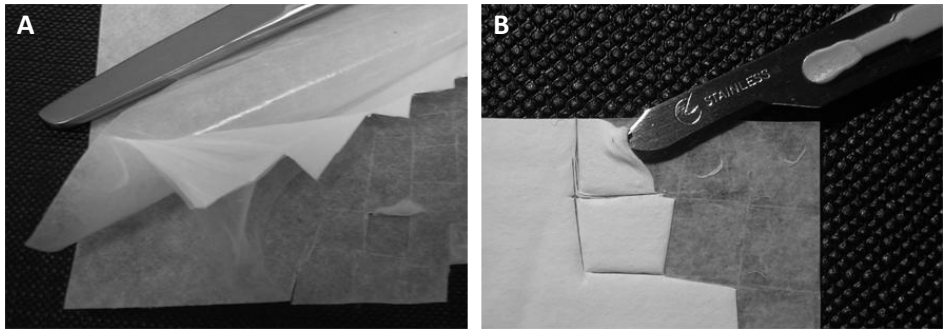


Figura 17. Imagen representativa del aspecto macroscópico de los biomateriales utilizados.

Como materiales control de no tejido se utilizaron una membrana de colágeno (COL) preparada por la empresa VISCOFAN, S.A. y una matriz de colágeno y elastina llamada Matriderm® (MD) y fabricada por MedSkinSolutions Dr. Suwelack y comercializada por MBA S.L.

La membrana de colágeno se utilizó como material control para los estudios cardíacos. Está compuesta por colágeno de tipo I (20 g/m^2) no reticulado. Se preparó a partir de piel bovina y presentaba un grosor de $20 \mu\text{m}$. Este biomaterial es biocompatible, favorece el crecimiento celular y ha sido validado en terapias regenerativas cardíacas [203].

Matriderm® es una matriz de estructura tridimensional de colágeno tipo I, III y V (tipo bovino) y de elastina con un espesor de 1 mm. En la actualidad se usa para la reconstrucción de piel en pacientes con una extensa superficie del cuerpo

quemada [199]. Debido a esta aplicación, la matriz de Matriderm se utilizó como control para el estudio de biomateriales de nueva síntesis en piel.

A continuación, se muestran las condiciones para la fabricación de todos los BM utilizados en este estudio (Tabla 3).

Polímero	Concentración (w/t)	Solvente	Proporción solvente	Aditivos (w/t)	Distancia entre electrodos (cm)	Diámetro de aguja (mm)	Voltaje (kV)
PHB	7%	CHCl ₃	-	NaCl 0,2%	11	0,6	81
PCL	10%	DMF/CHCl ₃	1:8	-	13	0,6	14
PLA	10%	THF/DMSO	8:2	-	11	0,6	9
SEDA	10%	HFIP	-	-	10	0,6	11
PA	12%	HCOOH/ CH ₃ COOH	1:2	-	13	0,6	14
PLGA	30%	DMF/CHCl ₃	7:2	-	20,2	0,6	7,95

Tabla 3: Condiciones del electrohilado para la fabricación de los diferentes biomateriales. PHB: poli (3-hydroxibutirato); **PCL:** poli (ε-caprolactona); **PLA:** ácido poliláctico; **PA:** poliamida; **PLGA:** ácido poliláctico-co-glicólico; **HFIP:** hexafluoroisopropanol; **DMF:** dimetilformamida; **THF:** tetrahydrofurano; **w/t:** peso/total, **kV:** kilovoltio.

Como figura complementaria, se expone en el Anexo 1 la caracterización de los BM en función de su diámetro de fibra.

1.1. Método de la electrohilatura

Los BM fabricados con este método, se obtienen a partir de una disolución de polímero biocompatible a la que se le aplica una elevada diferencia de potencial. El campo electrostático formado entre dos electrodos, uno en contacto con el polímero y el otro a una cierta distancia (entre 10 y 15 cm), permite que el polímero cargado eléctricamente venza la tensión superficial y forme finos chorros de disolución que se ven arrastrados por el campo electrostático formado, hasta el electrodo opuesto. Durante este recorrido, el chorro sufre un estirado y latiguo que hace que disminuya su tamaño hasta formar fibras con un diámetro por lo general en la escala nonométrica (Figura 18A).

Estas fibras se depositan formando una estructura tridimensional muy porosa de fibras entrecruzadas y en estado sólido. Este velo de nanofibras se colecta sobre un soporte no textil que permitirá la manipulación de las nanofibras.

En función del voltaje aplicado, de la distancia entre electrodos y de la velocidad de recolección de las nanofibras formadas, se pueden obtener velos de nanofibras con unas propiedades concretas, como alta porosidad, pequeño tamaño de poros y elevada superficie específica.

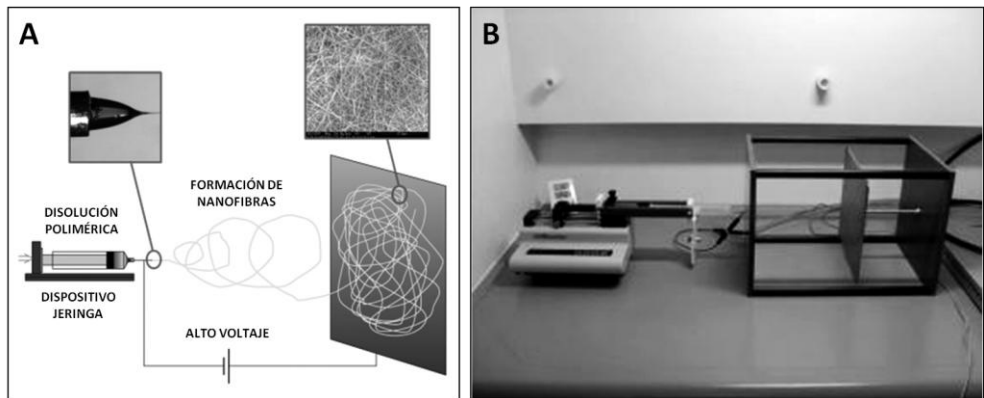


Figura 18. Método de la electrohilatura. A. Esquema de obtención de nanofibras mediante un montaje clásico de aguja conectada a un campo electrostático. **B.** Equipo de aguja para la puesta a punto con pequeña cantidad.

La obtención de de BM mediante este método se puede llevar a cabo con dos equipos distintos. El primer equipo es el de electrohilatura de aguja, útil para pruebas preliminares en el laboratorio, ya que es rápido y sencillo de utilizar en la optimización y puesta a punto de las disoluciones (Figura 18B). Además, la menor cantidad necesaria de disolución permite ahorrar recursos materiales, tales como los polímeros utilizados, los disolventes u otras sustancias aditivas. El otro equipo, más sofisticado, es el Equipo Nanospider™ equipment NS LAB (Figura 19). También genera un campo electrostático entre dos electrodos, pero en este caso la disolución se encuentra en la superficie de un cilindro metálico. Así se forman múltiples chorros de disolución que se convierten en nanofibras. Mediante este método es posible obtener una productividad mucho más elevada y la formación en continuo de un velo de nanofibras.

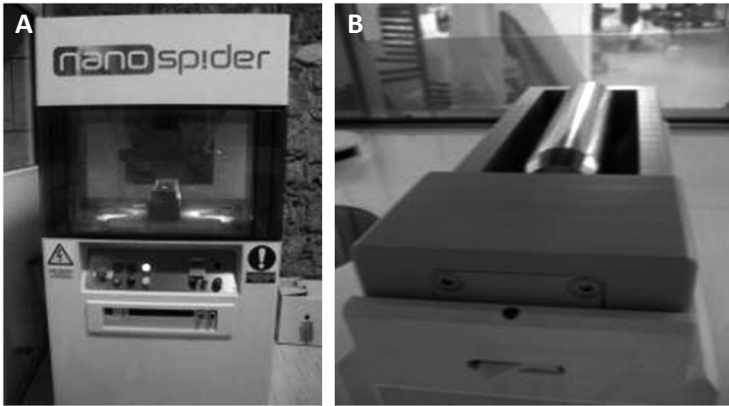


Figura 19. Equipo de electrohilatura NS LAB de producción semi-industrial sobre anchos de 400 mm. A. Imagen exterior del equipo. B. Detalle del cilindro metálico en el interior del equipo.

1.2. Tratamientos posteriores a la obtención del biomaterial

Lavado del biomaterial

Los dispositivos de nanofibras obtenidos se sumergen en agua destilada renovada periódicamente durante 24-48 horas para eliminar cualquier resto de disolvente. A continuación, se secan durante 24-48 horas en una atmósfera controlada.

Tratamiento de modificación de la superficie de las nanofibras mediante plasma a baja presión de N₂.

Con este tratamiento se consigue activar la superficie del biomaterial y promueve la hidrofilia y el anclaje de diferentes especies reactivas.

2. Líneas celulares

Para el estudio del comportamiento de los BM a nivel celular se utilizaron varias líneas celulares que fueron obtenidas de cultivos primarios realizados en el propio laboratorio o de líneas inmortalizadas.

2.1. Células mesenquimales de pulpa dentaria humana

Las células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*) fueron descubiertas por Friedenstein y colaboradores por su capacidad de adherirse a sustratos sólidos y por su rápida división [204]. Constituyen una población muy heterogénea descrita en primer lugar en la médula ósea [205] y posteriormente en otros tejidos como la pulpa dentaria [206].

Las MSC de pulpa dentaria se aislaron a partir de terceros molares de pacientes de 18 a 20 años que fueron extraídos por razones odontológicas. Se marcaron con la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*). Estos procedimientos se realizaron en el seno del grupo de investigación con anterioridad a mi llegada.

Se utilizaron las MSC de pulpa dentaria por su potencial terapéutico probado [207] y por su facilidad de expansión en medios de cultivos sencillos.

Se crecieron en medio de cultivo compuesto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco-Invitrogen), 2 % L- glutamina (1:100, Sigma-Aldrich) y 1% P/E (Penicilina/Estreptomina) (Sigma-Aldrich).

2.2. Línea celular HL-1

Las células HL-1 son una línea de cardiomiocitos adultos de ratón inmortalizada. Claycomb y colaboradores establecieron y patentaron dicha línea a partir de células AT-1, un linaje tumoral de cardiomiocitos atriales de ratón [208].

Gracias a su estabilidad como línea celular, su similitud fenotípica en los cardiomiocitos humanos y su facilidad en el cultivo, estas células constituyen un modelo ideal para las investigaciones *in vitro* en el ámbito cardiovascular. En este estudio, se empleó la línea celular inmortalizada HL-1 como modelo celular cardíaco para sembrar en los BM.

Se crecieron en medio de cultivo Claycomb (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de FBS (Gibco-Invitrogen), 2 % de L- glutamina (1:100, Sigma-Aldrich) y 1 % de P/E (Sigma-Aldrich).

2.3. Células 3T3-Swiss

Las células 3T3-Swiss proceden de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, www.ecacc.org.uk, número de catálogo 85022108). Corresponden a una línea celular de fibroblastos de ratón Swiss albino.

Las células 3T3-Swiss son necesarias para el cultivo y la expansión de los queratinocitos *in vitro* ya que actúan como cultivo nutricional.

Las células se crecieron en medio de cultivo compuesto por DMEM alto en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de FBS (Gibco-Invitrogen), 2 % de L- glutamina (1:100, Sigma-Aldrich) y 1 % de P/E (Sigma-Aldrich).

2.4. Fibroblastos y queratinocitos dérmicos humanos

Los fibroblastos y queratinocitos dérmicos humanos fueron aislados y cultivados en nuestro laboratorio a partir de piel desechada de pacientes sanos sometidos a una cirugía de abdominoplastia. El procedimiento se explica en el apartado 3.1 de Material y Métodos. Las cirugías se realizaron en el Área de Cirugía Plástica del Hospital La Fe de Valencia y las donaciones se realizaron bajo consentimiento informado del paciente (Anexo 2).

Los fibroblastos y queratinocitos obtenidos fueron utilizados para los estudios *in vitro* y para la síntesis del equivalente dérmico.

Los fibroblastos se cultivaron utilizando la misma composición de medio de cultivo que las células 3T3. Los queratinocitos humanos se cultivaron en medio de cultivo compuesto por DMEM alto en glucosa (Sigma-Aldrich) y F-12:HAM'S (Sigma-Aldrich) en una proporción 3:1. El medio además es suplementado con 10 % de FBS (Gibco-Invitrogen), 24 µg/ml de adenina (Sigma-Aldrich), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 1,3 ng/ml de triyodotironina (Sigma-Aldrich), 8 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich), 1:100 ITS (Insulina Transferrina Selenio) (BD Biosciencie), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco-Invitrogen) y 2,5 µg/ml de fungizona (Sigma-Aldrich). Tres días después de realizar un pase celular, al medio de cultivo se le adiciona 10 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (Sigma-Aldrich).

2.5. Leucocitos

Los leucocitos fueron aislados de sangre total de donantes sanos de muestras procedentes del Centro de Transfusión Sanguínea de la Comunidad Valenciana bajo consentimiento informado. Se aislaron utilizando la técnica de separación de células por gradiente de densidad descrita en el apartado 3.3 de Material y Métodos.

Se emplearon para conocer la respuesta inflamatoria de los biomateriales a nivel celular *in vitro*.

Se crecieron en medio RPMI (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco-Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS (Gibco-Invitrogen) y 1 % de P/E (Sigma-Aldrich).

2.6. Células endoteliales del cordón umbilical humano

Las células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC) consisten en una línea celular primaria compuesta de células endoteliales procedentes de la vena del cordón umbilical humano. Secretan una gran diversidad de moléculas vasoactivas, citoquinas, factores de crecimiento, agregación plaquetaria, fibrinólisis y de coagulación [209].

Se utilizan ampliamente en investigaciones fisiológicas y farmacológicas cardiovasculares por su papel en el transporte de macromoléculas, coagulación y presión sanguínea, angiogénesis y fibrinólisis [210].

Las HUVEC se obtuvieron de viales comerciales (Cascade Biologics) y se crecieron en medio de cultivo EBM2 (Clonetics) con los siguientes suplementos ya preparados en un kit: hidrocortisona, gentamicina, anfotericina B, FBS, VEGF, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento insulínico (R3-IGF-1), ácido ascórbico y heparina.

2.7. Fibroblastos cardíacos de rata

Los fibroblastos cardíacos fueron aislados de corazones de ratas wistar. Este procedimiento se realizó en el seno del grupo de investigación con anterioridad a mi llegada.

Los fibroblastos cardíacos fueron utilizados para los estudios de proliferación celular en los BM destinados a ser usados en un entorno cardíaco.

Las células se crecieron en medio de cultivo compuesto por DMEM alto en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de FBS (Gibco-Invitrogen), 2 % de L- glutamina (1:100, Sigma-Aldrich) y 1 % de P/E (Sigma-Aldrich).

3. Técnicas *ex vivo*

3.1. Aislamiento, cultivo y expansión de fibroblastos y queratinocitos dérmicos humanos.

3.1.1. Parada del ciclo celular de células 3T3-Swiss mediante tratamiento con mitomicina C para su uso como capa nutricia

La expansión de los queratinocitos *in vitro* a partir de una biopsia de piel requiere de una capa celular nutricia de células 3T3-Swiss en las que se ha detenido previamente el ciclo celular mediante un tratamiento con mitomicina C [211] (Sigma-Aldrich).

Para el tratamiento con mitomicina C se preparó una solución stock de 1 mg/ml a partir del producto inicial, y de esta solución stock se trabajó a una concentración de 10 µg/ml, diluyéndola en medio de cultivo con suero.

El tratamiento se puede realizar con las células 3T3 en suspensión o estando éstas adheridas a las placas de cultivo. La elección de una u otra forma estará sujeta a las necesidades del cultivo de queratinocitos. Cuando se prevea un pase celular de queratinocitos se tendrán 3T3 previamente mitomizadas en adherencia. Sin embargo, si los queratinocitos que están en cultivo requieren de la adición de nuevas células 3T3 mitomizadas, entonces se añadirán a la placa de cultivo 3T3 mitomizadas en suspensión.

Tratamiento de células 3T3 en condiciones de adherencia: las células 3T3 se sembraron a una densidad de 96.000 células/cm². Se incubaron con la solución de mitomicina a 37 °C en el incubador durante 2-3 horas y en oscuridad, ya que la mitomicina C es fotosensible. Tras este periodo, se retiró la solución de mitomicina y se lavaron las células 3 veces con Tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) y se añadió el medio de cultivo correspondiente. Las células adheridas a la placa de cultivo están así listas para su utilización como capa nutricia para queratinocitos, debiendo ser usadas como máximo 48 horas tras el tratamiento.

Tratamiento de células 3T3 en suspensión: se obtuvo una suspensión de 1×10^6 de células 3T3 por ml de solución de mitomicina. Se dejaron las células en agitación suave a 37°C y en oscuridad durante 2-3 horas. Después de este tiempo se centrifugaron las células durante 5 minutos a 400 g a temperatura ambiente (TA), se lavó el pellet con PBS 3 veces y se resuspendieron en el medio apropiado. Las células tratadas en suspensión pueden ser utilizadas en el momento o mantenerse en el frigorífico a 4°C hasta su utilización como capa nutricia. De esta manera son viables durante 48 horas tras su preparación y tratamiento.

3.1.2. Aislamiento y expansión de fibroblastos y queratinocitos humanos a partir de biopsia de piel

Aislamiento y expansión de queratinocitos

Inmediatamente después de obtener la muestra quirúrgicamente (de un tamaño aproximado de 2 cm^2), se introdujo en un recipiente con una solución de DMEM alto en glucosa con 2% de P/E y se conservó a 4°C hasta su procesamiento. A partir de este momento todas las manipulaciones de la muestra en abierto se realizaron en condiciones de esterilidad y con material estéril.

Tras esterilizar el exterior del recipiente con etanol al 70% se introdujo en el interior de la campana de cultivos y a continuación se extrajo la biopsia de piel que se colocó en una placa Petri. La muestra se troceó con unas tijeras y se decantaron los fragmentos a un frasco con 25-30 ml de Tripsina/EDTA (T/E _del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*) (Gibco-Invitrogen) al 0,05% donde se incubó a 37°C bajo agitación orbital durante 45 minutos (primer lavado). Después de este tiempo se sacó el frasco del agitador orbital y se pasó la suspensión celular a un tubo de 50 ml. Se neutralizó la T/E con igual cantidad de medio de cultivo y se centrifugó durante 10 minutos a 400 g. Se realizó un conteo de células. Al frasco con los fragmentos de piel sobrantes se le añadió T/E nueva y se incubó nuevamente unos 30 minutos a 37°C en agitación (segundo lavado). Este procedimiento de incubaciones en T/E se repitió en lavados subsiguientes hasta que no se obtuvieron más células de la biopsia.

A continuación, para el cultivo primario de queratinocitos, se mezclaron las células resultantes de todas las incubaciones con T/E y se sembró a razón de unas 24.000-30.000 células/ cm^2 en presencia de 96.000 células 3T3 tratadas por cm^2 . Las células se incubaron a 37°C , con 5% de CO_2 y saturación de humedad. Cuando

la placa alcanzó la confluencia, (aproximadamente a los 13 días) se procedió a realizar un pase celular (apartado 1.2 de Material y Métodos). La muestra se sembró en un/os frasco/s nuevo/s a una concentración de entre 14.000-23.000 células/cm², en presencia de 75.000 células 3T3 tratadas por cm². Esto constituyó el pase 1. [202, 212].

Aislamiento y expansión de fibroblastos

Los restos de biopsia que quedaron de las incubaciones con tripsina se introdujeron en 25-50 ml de una solución estéril de colagenasa I (Gibco-Invitrogen) al 0,3% en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Gibco-Invitrogen) y se dejaron en un agitador orbital a 37 °C hasta la completa disolución de los fragmentos (alrededor de 3-9 horas). Tras la incubación, la suspensión celular en colagenasa se filtró utilizando un filtro de 70 µm, se neutralizó con igual cantidad de medio de fibroblastos y se centrifugó a 400 g. De la suspensión celular resultante se obtuvieron los fibroblastos dérmicos y se sembraron a razón de 10.000-12.000 células/cm².

3.2. Obtención de un equivalente dérmico con un biomaterial en su base

El equivalente dérmico (ED) es una estructura tridimensional, compuesta por fibroblastos y queratinocitos cultivados *in vitro*, que intenta imitar a las capas originales que componen la piel, la dermis y epidermis.

Para la preparación del equivalente dérmico se resuspendieron 6-7x10⁴ céls/cm² de fibroblastos humanos en una matriz de fibrina formada por 10 ml de plasma sanguíneo humano (del Centro de Transfusión de la C. Valenciana), 10 mg de amchafibrina, 2 ml de cloruro de calcio (Panreac) al 2 % y 23 ml de suero salino (Gibco-Invitrogen). Esta solución se dejó gelificar sobre el biomaterial a 37 °C durante 30 minutos en placa. Tras este tiempo se resuspendieron 12x10⁴ queratinocitos/cm² en medio de cultivo de queratinocitos y se añadieron encima de la matriz de fibrina con los fibroblastos integrados. El medio de cultivo se cambió cada dos días y a los 10-12 días la placa alcanzó la confluencia tanto de fibroblastos como de queratinocitos [213].

3.3. Aislamiento de leucocitos a partir de sangre total

Para obtener leucocitos a partir de sangre total se empleó la técnica de Ficoll Hypaque que es una técnica de centrifugación por gradiente de densidad que facilita la separación de células mononucleadas (como los leucocitos) de otras células de la sangre.

Para ello, primero se realizó una depleción de hematíes de la muestra mediante un lavado con medio HES en una proporción de 1 volumen de HES por cada 3 volúmenes de sangre. Tras una centrifugación a 400 g durante 10 min a 25 °C sin freno, los hematíes quedaron en la parte inferior pudiendo recoger el sobrenadante libre ya de hematíes. El sobrenadante se depositó en una botella estéril y se añadieron 3 volúmenes de PBS - EDTA 2 mM (Gibco-Invitrogen) por cada volumen de muestra y se mezcló bien.

Posteriormente se realizó la separación celular mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Plaque™ PLUS (GE Healthcare España S.A.). Se añadieron 15 ml de Ficoll-Plaque™ PLUS a un tubo de 50 ml y a continuación se añadieron 35 ml de muestra, cuidadosamente para no distorsionar el gradiente. La solución bifásica se centrifugó a 450 g durante 35 min sin freno a 20 °C. Tras ello, se recogió la fase intermedia (fracción mononucleada) con ayuda de una pipeta pasteur de punta fina y se colocó en tubos de 50 ml, donde se procedió a su lavado con 30 ml de PBS – EDTA. Se centrifugó a 300 g durante 10 min a 20 °C, se eliminó el sobrenadante por decantación y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml PBS-EDTA. Se procedió al recuento celular con ayuda de un hemocitómetro (Modelo MICROS60 de Horiba ABX Diagnostics, Francia).

4. Técnicas *in vitro*

4.1. Cultivos celulares

Los procedimientos con células se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica de flujo laminar clase II.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂ en incubadores HEPA CLASS 100 (Thermo Electron Corporation, Estados Unidos).

4.1.1. Descongelación de células

Las células que estaban almacenadas en criotubos y conservadas a $-195,8^{\circ}\text{C}$ en tanques de N_2 líquido se descongelaron de la siguiente manera: primero el vial se sumergió en un baño termostático a 37°C para su descongelación y rápidamente la suspensión celular se transfirió a un tubo con 10 ml de medio de cultivo atemperado a esa misma temperatura y se centrifugó a 400 g durante 7 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en nuevo medio de cultivo atemperado y se sembró en un frasco de 75 cm^2 (SARSTEDT, Alemania). Al día siguiente se cambió el medio a las células y se mantuvieron en cultivo hasta su confluencia.

4.1.2. Tripsinización

Cuando los cultivos celulares alcanzan el 80-90 % de confluencia en la placa de cultivo, las células deben ser levantadas y pasadas a otra placa a una densidad menor para continuar su expansión o para directamente ser utilizadas en ese momento para un experimento. Si no se realiza este procedimiento, las células paran su ciclo celular y se inactiva el cultivo.

Para levantar las células de la placa se hace por tripsinización. Este método es un proceso enzimático que permite separar las células de su soporte mediante la enzima tripsina. Esta enzima rompe las uniones de las células al soporte, así como las uniones entre las células.

Para ello se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS estéril con el fin de eliminar restos de medio y celulares. A continuación, se añadió 1 ml de T/E al 0,05 %, (Gibco-Invitrogen), para una superficie de 75 cm^2 de células adherentes y se incubó el frasco durante 5 min a 37°C (temperatura óptima de actuación de la enzima). Transcurrido este tiempo el frasco se golpeó suavemente para acabar de despegar las células, se observó bajo el microscopio para constatar que las células se despegaron y se añadieron 10 ml de medio nuevo completo del cultivo correspondiente con el fin de inactivar la tripsina. La suspensión celular se transfirió a un tubo y se centrifugó a 400 g durante 7 min. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en medio nuevo y se procedió al contaje celular en una cámara de Bürker (Apartado 4.2. de Material y Métodos). Las células se sembraron en otra placa a la densidad requerida. La realización de este proceso constituye un pase celular.

4.1.3. Congelación de células

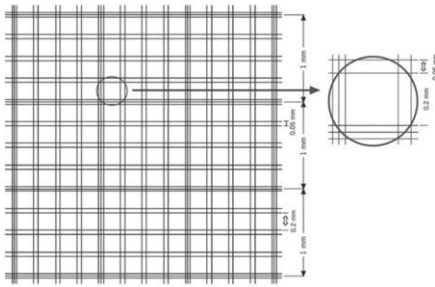
Con el fin de disponer de muestras en pases tempranos para posteriores experimentos, los cultivos celulares empleados se amplificaron y congelaron.

Para el proceso de congelación, las células se tripsinizaron y se resuspendieron a la concentración de 1×10^6 cel/ml en una solución conl 90 % de FBS y 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck-Millipore) en criotubos (Nunc, Rochester, NY). Los criotubos se almacenaron a -80 °C en un contenedor "Mr Frosty" (Nalge Nunc Internacional, USA) el cual permite disminuir la temperatura de las células 1 °C/min y, por lo tanto, realizar una congelación de las células más eficiente. Al día siguiente los viales se transfirieron a un tanque de N_2 líquido para su criopreservación, donde permanecieron hasta su empleo.

4.2. Recuento celular con cámara de Bürker

Para conocer el número de células vivas después de tripsinizarlas en una placa de cultivo, se realizó un recuento con la cámara de Bürker. La cámara de Bürker es un portaobjetos que consta de una cuadrícula de recuento que muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm^2 . Cada cuadrado grande, a su vez está dividido por líneas dobles (a una distancia de 0,05 mm) en 16 cuadrados que facilitan el recuento de las células presentes en cada campo (Figura 20). Para poder diferenciar las células vivas de las muertas se utilizó Azul de Tripán (Invitrogen S.A., USA).

Para realizar el recuento se diluyeron $10 \mu\text{l}$ de la suspensión celular en $10 \mu\text{l}$ de azul de tripán y se pipetearon $10 \mu\text{l}$ en la cámara. A continuación, se realizó el recuento de células viables en cuatro campos utilizando un microscopio invertido de contraste de fases (Modelo DMIL Leica Microsystems Heidelberg y MBH, Mannheim, Germany). Para realizar el cálculo de la concentración de células (células/ml) se hizo la media de los cuatro campos contados y se multiplicó por 2 (la dilución que se realizó con el azul de tripán) y por 10^4 (factor por el cual se multiplica teniendo en cuenta el volumen de muestra en cada campo, determinado por el fabricante). De esta manera se conoció el número de células viables por ml.



$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = \dot{x} \cdot 2 \cdot 10^4$$

Figura 20. Recuento celular con cámara de Bürker. Dibujo representativo de la retícula de la cámara Bürker y fórmula para el cálculo número de la concentración de células viables.

4.3. Preparación y siembra de células sobre biomateriales

Previamente a su manipulación en cultivos, los biomateriales fueron esterilizados exponiéndolos durante 20 minutos a luz ultravioleta (UV). A partir de este momento los BM fueron manipulados en todo momento en condiciones de esterilidad.

Para la siembra de células sobre los BM se estableció una relación entre el tamaño de los mismos, la densidad celular y el volumen de medio de cultivo que pueda abarcar el biomaterial. De esta manera un biomaterial de 1 cm² con una densidad celular de 4x10⁴ células/cm² suspendida en un volumen de 10 µl de medio de cultivo queda con su superficie totalmente recubierta de células.

Los materiales se cortaron y se colocaron en placas de cultivo para la posterior siembra celular. Una vez las células fueron sembradas sobre los BM, se dejó la placa en posición horizontal en el incubador durante 30 minutos. Posteriormente se adiciona medio de cultivo a cada pocillo que contiene al BM.

De esta manera las células se encuentran sembradas en los biomateriales y permanecen en cultivo el tiempo requerido para cada experimento.

Los BM con las células sembradas en su interior, permanecieron 4 días en cultivo. Tras este periodo los materiales con las células fueron lavados con PBS, fijados con paraformaldehído (PFA) (Electrón Microscopy Sciences, Hatfield) al 2 % durante 10 minutos y los núcleos celulares se marcaron con 4',6 diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Sigma-Aldrich). Los materiales se depositaron en portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos utilizando medio de montaje (Merk Milloporo-Calbiochem) y se sellaron para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia.

4.4. Técnicas de estudio de la viabilidad celular

4.4.1. Viabilidad celular mediante MTT

El fundamento de este ensayo colorimétrico *in vitro* está basado en la reducción de una sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), de color amarillo, en un formazán insoluble de color azul. Esta reducción se realiza en el interior de la célula por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y la cantidad de producto formado se puede cuantificar fácilmente disolviendo en DMSO los cristales y cuantificando la Absorbancia (Abs) ($\lambda = 570 \text{ nm}$) (Figura 21). De esta manera cuanto mayor sea el porcentaje de células vivas mayor es el cambio de color de amarillo a azul y por lo tanto los valores de absorbancia que se obtienen son indicativos de la viabilidad celular. Esta clase de ensayo es muy útil para valorar la viabilidad celular en el interior de los biomateriales.

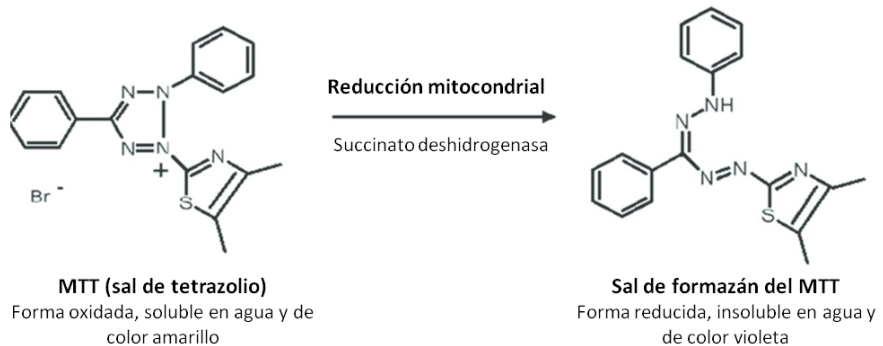


Figura 21. Reacción de MTT. La sal de MTT que es soluble en agua y de color amarillo se convierte en una sal insoluble y de color violeta por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa.

Las células se sembraron sobre los biomateriales de 1 cm^2 en placas estériles de 24 pocillos a una densidad de $40.000 \text{ células/cm}^2$ y a los 4 días de cultivo se realizó la reacción de MTT. Para ello se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se lavaron los biomateriales con PBS. A continuación, los materiales con las células sembradas y crecidas en su interior fueron transferidos a una nueva placa de 24 pocillos, para asegurar que el resultado obtenido corresponde a las células crecidas en el interior de los materiales y no fuera de ellos. Para realizar la reacción de MTT, se añadieron $500 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo de MTT por pocillo y las células fueron incubadas 2-3 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad.

Previamente, se realizó la elaboración de la solución de trabajo de MTT. Para ello, se preparó una solución stock de la sal de tetrazolio MTT (Sigma-Aldrich Química S.A.) a una concentración de 5 mg/ml en PBS 0,1 M. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración y se conservó a 4 °C hasta su uso. La solución de trabajo se preparó a partir de la solución stock, diluyendo esta última en el medio de cultivo adecuado al tipo celular en una proporción 1:11. La solución de trabajo de MTT se preparó en el momento de su uso.

Al finalizar la incubación, se eliminó la solución de trabajo de MTT y los cristales precipitados se disolvieron con 500 µl de DMSO (Sigma-Aldrich Química S.A.) por pocillo (Figura 22). A continuación, se transfirieron 100 µl de la disolución azul resultante de cada pocillo a un pocillo de una placa de 96 pocillos para poder ser leída a 550 nm de Abs utilizando el contador multimarcaje Wallac Victor2V 1420 Multilabel HTS. El experimento se realizó 3 veces.

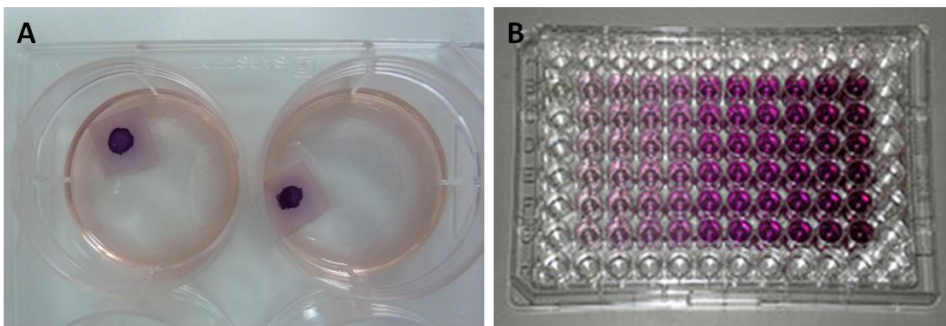


Figura 22. Reacción de MTT en los biomateriales. A. Cristales precipitados de color azul en el interior del biomaterial resultado de la reacción de MTT en el interior de las células. **B.** Disolución de la sal con el disolvente orgánico DMSO para realizar la lectura de Abs a 550nm.

4.4.2. Viabilidad celular mediante reactivo de cck-8

El Kit-8 de Conteo Celular o CCK-8 (Sigma-Aldrich) es un ensayo colorimétrico muy sensible ampliamente utilizado capaz de detectar las células viables en ensayos de citotoxicidad y proliferación [214-216].

Este ensayo se basa en el uso de la sal WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolum), que es soluble y produce un colorante en presencia de un transportador de electrones. WST-8 es biorreducido por las deshidrogenasas celulares a un producto de formazán de color naranja que es soluble en medio de cultivo. La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas.

Para la realización del ensayo con células y biomateriales se procedió de la misma manera que en el apartado anterior. Después del periodo de incubación con el reactivo cck-8 se midió la Abs a 450 nm.

4.5. Test pirógeno

Para conocer la respuesta inflamatoria que despertaban los BM una vez éstos estaban en contacto con las células, se realizó un test pirógeno.

Para la realización de este test, se extrajeron los leucocitos a partir de una muestra de sangre total, se sembraron sobre los biomateriales a una densidad de 3 a 4×10^6 células por biomaterial (1 cm^2) y se incubaron durante 5 horas. Después de este periodo de incubación, los BM fueron lavados con PBS, se sumergieron en Trizol (Invitrogen) y se almacenaron a -80°C para posteriormente realizar la extracción de ARN, síntesis de ADNc y PCR cuantitativa (qPCR) de interleuquinas con perfil pro-inflamatorio (IL-1 β , IL-6) y con perfil anti-inflamatorio (IL-10). Todas estas técnicas se explican en el apartado 4.7. de Materiales y Métodos.

De esta manera, y tras la realización de la qPCR, se pudo medir la expresión génica inflamatoria de las células en contacto con los biomateriales y definir así el perfil inflamatorio de éstos.

4.6. Técnicas histológicas

Las técnicas histológicas son el conjunto de técnicas utilizadas para la visualización de las células y sus constituyentes así como de los procesos celulares que en ellas tienen lugar.

A continuación, se describen las técnicas utilizadas para la obtención de las muestras de estudio y su posterior análisis histológico. Este apartado abarca desde el sacrificio de los animales hasta el procesamiento final de las muestras para su análisis.

Dada la diversidad de las muestras generadas en este trabajo de investigación (tejido cardíaco, tejido dérmico y equivalente dérmico) cada técnica está descrita para los tres tipos de muestras en estudio adecuándose a su diferente composición.

4.6.1. Obtención y fijación de tejidos

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos dependiendo del objetivo del estudio o muestra. Los métodos utilizados para el sacrificio de los animales cumplían las normas del CEEA (Comité de Ética de Experimentación Animal) del IIS LaFe (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe) y del CIPF (Centro de Investigación Príncipe Felipe).

Una vez se han extraído las muestras del animal, deben conservarse mediante procesos de fijación. La fijación tiene como principal objetivo la interrupción de los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, asegurando la máxima conservación de la estructura tisular y celular y las características químicas del tejido. Así, la finalidad del proceso de fijación que realmente nos interesa es preservar la ultraestructura biológica protegiendo a la muestra de posibles alteraciones durante los posteriores procesos.

Como las muestras obtenidas eran de naturaleza y tamaño diferente requirieron de procesos de fijación específicos.

Muestras de tejido cardíaco

Se eligió la perfusión transcardiaca para la fijación de los corazones de ratas. Es un procedimiento por el cual la solución fijadora se introduce a través del sistema circulatorio accediendo así a todas las células del tejido. De esta manera proporciona una fijación uniforme de alta calidad que lo hace un método muy efectivo.

En un principio los animales fueron anestesiados profundamente con tiopental a una dosis de 50 mg/kg (Tiobarbital Braun 1g) y se les suministró como anestésico 0,05 mg/kg de fentanilo (Fentanest, Kerm Pharma), mediante inyección intraperitoneal. El efecto de la anestesia se comprobó por la ausencia de reflejo podal. Se colocó a la rata en posición decúbito supino y se le sujetaron las extremidades para tener acceso al tórax. Se realizó un corte en la piel a la altura del esternón y se cortaron las costillas en paralelo a los pulmones dejando expuesto el corazón. A partir de este momento el animal no puede respirar, pero el corazón sigue funcionando por un corto espacio de tiempo. Es importante empezar con el proceso de perfusión antes que el latido se pare totalmente para evitar así el inicio de los procesos de coagulación.

Se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo y otra por la vena porta y se pasaron simultáneamente 5 ml de una solución de KCl 1 M (Sigma-Aldrich), consiguiendo así la parada cardiaca en diástole. Con unas tijeras se realizó una incisión en la vena porta para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado, evitando a su vez que se produzcan roturas inespecíficas en el circuito sanguíneo debido al exceso de presión que se genera al circular las diferentes soluciones introducidas.

A continuación, se pasaron 10 ml de PBS por el ventrículo izquierdo para el lavado de los tejidos y después 5 ml de la solución fijadora PFA al 2%. Se retiró la aguja del ventrículo izquierdo y se introdujo otra por la aorta para seguir inyectando PFA al 2% durante 15 minutos a una velocidad de 4.3 ml/hora utilizando para ello una bomba de perfusión (Masterflex, ColePalmer, EEUU), consiguiendo así un flujo constante e ininterrumpido.

A continuación, se extrajo el corazón, se cortaron las aurículas y el apex para que penetraran mejor las soluciones y se lavó con suero fisiológico con ayuda de una jeringuilla para vaciar de sangre las cavidades ventriculares. Después se post-fijó por inmersión con PFA al 2 % durante 24 horas a 4 °C en agitación. Transcurrido ese tiempo se procedió a eliminar la solución fijadora del tejido mediante 5 lavados de 15 minutos con agitación en tampón fosfato (PB 0,1 M, pH 7,4) (Panreac, España) con agitación.

Después de los lavados, el corazón que se destina para ser cortado en criostato se crioprotege en sacarosa al 30 % (Panreac, España) diluida en PB 0,1 M durante un tiempo de 2 a 3 días a 4 °C. Tras este tiempo se embebe el corazón en

el medio sintético OCT (*Optimal Cutting Temperatura*) (Bayer, Barcelona, España) y se conserva a -80°C hasta su seccionamiento.

Por otro lado, el corazón que se destina para ser cortado con el micrótopo de parafina se conserva en etanol al 70% a 4°C durante un tiempo de 3 a 5 días. Transcurrido este tiempo se realizó el protocolo de inclusión en parafina explicado en apartado 4.6.2.1 de Material y Métodos.

Muestras de tejido dérmico

Los animales se anestesiaron y se les administró anestesia de la misma manera que en el apartado anterior. Se extrajo la piel de la zona de estudio y se extendió sobre un papel Whatman (Sigma-Aldrich) para evitar su contracción en el proceso de fijación. Las muestras se fijaron con etanol al 70 % a 4°C durante un tiempo de 3 a 5 días, transcurrido el cual se realizó el protocolo de inclusión en parafina.

Para la visualización de las muestras en microscopio electrónico, las muestras se fijaron con una solución de 2,5 % glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) y 2 % paraformaldehído (Panreac) en PB 0,1 M, pH=7,4. Para ello se sumergió la muestra en esta solución fijadora en un volumen 20 veces superior al tamaño de la muestra. Se dejó 24 horas a TA y después se pasó a 4°C de 1 a 5 días dependiendo del tamaño de la muestra. Después de este tiempo se realizaron 4 lavados de 30 minutos con tampón fosfato para retirar bien la solución fijadora y se guardó a 4°C en tampón fosfato hasta el envío de la muestra al servicio de Microscopia Electrónica de Trasmisión del CIPF.

Muestras de equivalente dérmico

Los ED fueron despegados de la placa de cultivo utilizando una espátula. Debido a su naturaleza frágil y para evitar una excesiva manipulación se realizó un lavado de PBS en la misma placa de cultivo. A continuación, se fijó con etanol al 70 % durante 12 horas a 4°C hasta la realización del protocolo de inclusión en parafina.

4.6.2. Seccionamiento de las muestras de tejido

Para poder visualizar y analizar los tejidos al microscopio, se han de obtener secciones muy finas de los mismos. Para ello, los tejidos, que se han fijado previamente, han de ser incluidos y envueltos por una sustancia de consistencia firme que puede ser parafina u OCT.

El OCT es un medio sintético que favorece la realización de cortes en criostato a temperaturas muy bajas. A temperatura ambiente es una sustancia viscosa pero a una temperatura de -20°C se vuelve sólida.

La parafina es una mezcla de hidrocarburos saturados que tiene un punto de fusión a $56-58^{\circ}\text{C}$ y solidifica a temperatura ambiente.

4.6.2.1. Inclusión en parafina y seccionamiento con micrótopo

El proceso de inclusión en parafina depende del tipo de tejido que se va a incluir, por lo cual lo detallaremos a continuación. Este proceso consta de una deshidratación mediada por alcoholes de concentración creciente y el uso de xilol como solvente previo a la parafina, un producto miscible tanto con el alcohol absoluto como con la parafina. Una vez las muestras estuvieron incluidas en parafina se realizaron cortes seriados con un micrótopo de rotación HM-340E (Microm). Los cortes fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con gelatina. Las muestras de tejido cardíaco y dérmico se cortaron a $5\ \mu\text{m}$ y las de equivalente dérmico a $10\ \mu\text{m}$.

Muestras de tejido cardíaco

Para la inclusión en parafina, las muestras de tejido cardíaco se sometieron a sucesivos baños de etanol de distinta graduación en agitación a 200 rpm en el siguiente orden: 15 minutos en etanol al 70 %, 15 minutos en etanol al 80 %, 20 minutos en etanol al 96 % y 2 baños, de 30 y 40 minutos en etanol absoluto. Posteriormente se introdujeron en dos baños de xileno (Panreac) de 10 minutos cada uno y a continuación en dos baños de parafina (ParaPlast Pul-Tyco Healthcare) a 60°C uno durante 1 hora y el otro durante toda la noche.

Muestras de tejido dérmico

Para la inclusión en parafina, las muestras de tejido dérmico se sometieron a sucesivos baños de etanol de distinta graduación en agitación a 200 rpm en el siguiente orden: dos baños sucesivos de 1 hora cada uno en etanol al 80 %, dos baños sucesivos de 1 hora cada uno en etanol al 96 % y 2 baños en etanol absoluto, de 2 horas el primero y toda la noche el segundo. Posteriormente se introdujeron en dos baños de xileno de 1 y 2 horas y a continuación en dos baños de parafina a 60 °C durante 2 horas cada uno.

Muestras de equivalente dérmico

Para la inclusión en parafina, las muestras de ED se sometieron a sucesivos baños de etanol de distinta graduación en agitación a 70 rpm en el siguiente orden: 15 minutos en etanol al 70%, dos baños de 15 minutos en etanol al 80 %, dos baños de 15 minutos en etanol al 96 % y dos baños de 15 minutos en etanol absoluto. Posteriormente se introdujeron en dos baños de xileno de 20 minutos cada uno y a continuación en dos baños de parafina a 60 °C durante 20 minutos el primero y de 45 minutos el segundo.

Una vez se realizaron todos los pasos de deshidratación e inclusión de las muestras, éstas se orientaron en el molde sumergida en parafina líquida. A continuación, se enfrió bruscamente para solidificar la parafina quedando la muestra encastrada en el bloque de parafina con la orientación deseada.

4.6.2.2. Crioseccionamiento

El criostato se usó para seccionar las muestras de tejido cardíaco que previamente habían sido crioprotectidos, embebidas en bloques de OCT (Bayer) y conservadas a -80 °C. Se seccionaron directamente utilizando un criostato (MICRON modelo HM550) a -20 °C. Se obtuvieron cortes seriados de secciones de 10 µm que fueron depositadas sobre un portaobjetos (porta-objetos superfrost plus Menzel-Glaser, Afora, España). Los portaobjetos se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

4.6.3. Desparafinación e hidratación de las muestras

Antes de la realización de las tinciones y las inmunodetecciones, los portaobjetos con los cortes de parafina que contenían las muestras pasaron por dos procesos, primero de desparafinación y segundo de hidratación.

Los portaobjetos se pusieron en una estufa a 60 °C durante 1 hora para las muestras de corazón y 25 minutos para las muestras de piel o equivalente dérmico. Después de este tiempo se sometieron a un proceso de desparafinación mediante sucesivos pases en xilol e hidratación con pases de etanoles a concentraciones decrecientes de la siguiente manera: dos baños de 10 minutos en xilol, dos baños de 10 minutos en etanol absoluto (Panreac), un baño de 10 minutos en etanol al 96 % y un baño de 10 minutos en etanol al 70 %. Después los portas se dejan en agua hasta empezar la tinción o la inmunodetección.

4.6.4. Tinciones

Debido a que el material biológico apenas presenta contraste, se hace necesario dotar a las preparaciones del suficiente contraste como para poder apreciar sus componentes. El fundamento de cualquier método de tinción radica en la propiedad que poseen todos los tejidos para incorporar y fijar, de manera variable, diversas sustancias coloreadas llamadas colorantes.

Gracias al uso de diversos tipos de tinciones histológicas hemos podido observar los procesos inflamatorios producidos tras la implantación de los BM en los tejidos así como el análisis de su estructura.

4.6.4.1. Tricrómico de Masson

Esta tinción utiliza tres colorantes para evidenciar el núcleo, el citoplasma y el tejido conjuntivo de los tejidos. Como resultado de la tinción los núcleos se tiñen de azul oscuro, los eritrocitos, la queratina, el citoplasma y las fibras musculares de un rojo rosado, y el colágeno y las fibras de reticulina de color azul claro. Esto nos permite identificar la zona fibrótica en los tejidos en estudio.

Para realizar la tinción de tricrómico de Masson las muestras se incubaron en solución de Bouin (Sigma Aldrich) precalentada a 56 °C y se mantuvieron durante 15 minutos. A continuación, se enfriaron y lavaron con agua corriente. Se incubaron durante 5 minutos en Hematoxilina de Harris y se lavaron con agua corriente primero y agua destilada después, hasta eliminar el exceso de coloración. Posteriormente se incubaron durante 5 minutos en Ponceau Fucsina. Esta solución está compuesta por la mezcla en proporción 1:2 de la solución A (1 % de Ponceau de Silidina en agua acética al 0,5 %) y la solución B (1 % de Fucsina ácida en agua acética al 0,5 %). La mezcla se filtró antes de usarla. Se lavaron con agua destilada y seguidamente se introdujeron en ácido fosfomolíbico (Sigma-

Aldrich) 5 minutos y en una solución de Azul de Anilina (disuelta al 2 % en agua acética al 0,5 %) durante 5 minutos. A continuación, se lavaron con agua destilada y seguidamente con agua acética al 1 % durante 2 minutos. Por último, se realizaron 20 inmersiones de un segundo en etanol al 70 %, 20 inmersiones en etanol al 96 %, 20 inmersiones más en etanol absoluto y 3 inmersiones en xileno. Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje Eukitt (Panreac). Todos los colorantes se adquirieron de Merck Farma y Química, S.L.

4.6.4.2. Hematoxilina-Eosina

La tinción de Hematoxilina-Eosina es uno de los métodos más utilizados en histología animal y en el diagnóstico en medicina. La eosina es un colorante ácido y tiñe en rosa estructuras básicas del citoplasma y componentes de la matriz extracelular como las fibras del tejido conjuntivo. La hematoxilina es un colorante básico y tiñe en azul/púrpura estructuras ácidas como la heterocromatina de los núcleos celulares. De modo que observando un corte histológico con esta tinción se identifica el colágeno en rosa pálido, el músculo en rosa fuerte, la queratina en rojo intenso, el citoplasma en rosado, los núcleos en azul oscuro o púrpura y los eritrocitos en color cereza. De esta manera podemos diferenciar zonas fibróticas del tejido sano e identificar los infiltrados celulares.

Para realizar la tinción de hematoxilina-eosina las muestras se incubaron durante 30 segundos (20 segundos para las muestras de equivalente dérmico) con Hematoxilina de Harris y se lavaron con H₂O corriente durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron dos inmersiones en alcohol clorhídrico (dilución 1:200 de ácido clorhídrico en etanol de 70°) para eliminar el exceso de colorante. A continuación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con H₂O corriente y se realizaron 5 inmersiones de un segundo en agua amoniacal (15 gotas de amoniaco en H₂O corriente) y se volvió a lavar con H₂O corriente. Se incubaron con la solución Eosina alcohólica (eosina al 0,25 % en etanol al 19 %) durante 30 segundos y se realizó un lavado de H₂O corriente. Por último, el tejido se deshidrató mediante incubaciones sucesivas en etanol de gradación creciente, realizando 1 lavado de 20 segundos en etanol de 96°, 1 lavado de 20 segundos en etanol de 100° y 1 lavado de 30 segundos en xileno (Panreac). Las muestras permanecieron momentáneamente en xileno hasta su inmediato montaje con resina sintética Eukitt (Panreac, España). Todos los colorantes se adquirieron de Merck Farma y Química, S.L.

4.6.5. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un procedimiento histopatológico cuyo objetivo es identificar algunos tipos celulares en tejidos que expresan determinadas moléculas de forma específica. Para ello se utiliza un anticuerpo, que llamamos primario que se une específicamente a estas moléculas o antígenos que queremos identificar y otro anticuerpo denominado secundario que reconoce y se une al anticuerpo primario.

El anticuerpo secundario ha sido previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible o un producto fluorescente o fluorocromo. Así el complejo antígeno-anticuerpo 1º-anticuerpo 2º formado permite ser identificado y fotografiado mediante microscopía.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo están recogidos en la Tabla 4 que se muestra a continuación:

Ac 1º	Tipo celular que marca	Casa comercial	Referencia	Dilución
Rabbit Anti-Caveolin 1 polyclonal	Células endoteliales humano, ratón y rata	Cell Signaling	#3238	1:250
Rat Anti-BrdU monoclonal	BrdU incorporado en células en fase S	Abcam	Ab6326	1:100
Mouse anti-Involucrin monoclonal	Queratinocitos humanos estrato espinoso	SIGMA	I9018	1:100
Rabbit anti-Ck5 polyclonal	Queratinocitos humanos y de ratón del estrato basal	Covance	PRB-160P-100	1:600
Rat anti- mouse CD31	Células endoteliales de ratón	BD	553370	1:100
Mouse Anti-Laminin-5 monoclonal	Lámina basal de humano	Abcam	Ab78286	1:100
Rabbit Anti-CCR7 monoclonal	Macrófagos perfil M1 pro-inflamatorio	Abcam	ab32527	1:100
Rabbit Anti-CD206 monoclonal	Macrófagos perfil M2 anti-inflamatorio	Abcam	ab64693	1:100

Ac 1º	Tipo celular que marca	Casa comercial	Referencia	Dilución
Mouse Anti-rat CD163 monoclonal	Macrófagos perfil M2 anti-inflamatorio	BIO RAD	MCA342R	1:100
Mouse Anti-rat CD68 monoclonal	Macrófagos	BIO RAD	MCA341R	1:100
Ac 2º	Espectro de emisión	Casa comercial	Referencia	Dilución
Alexa 594 Donkey Anti-rabbit IgG (H+L)	ROJO	Invitrogen	A21207	1:200
Alexa 488 Donkey Anti-mouse IgG (H+L)	VERDE	Invitrogen	A21202	1:200
Alexa 488 Goat Anti-rabbit IgG (H+L)	VERDE	Invitrogen	A11008	1:200
Alexa 488 Goat Anti-mouse IgG (H+L)	VERDE	Invitrogen	A11001	1:200
Goat Anti-rabbit FITC IgG (H+L)	VERDE	Jackson InmunoResearch	111-095-003	1:200
Biotin-SP Donkey Anti-rat IgG (H+L)		Jackson InmunoResearch	712-066-153	1:200

Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados. Se detallan su origen, su nombre comercial o antígeno que reconoce, la dilución a la que se ha usado, su referencia del catálogo y su casa comercial.

4.6.5.1. Técnica de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se caracteriza porque podemos localizar el antígeno gracias a que el anticuerpo secundario va marcado directamente con un cromógeno fluorescente. Durante la realización de esta tesis se ha realizado inmunofluorescencia sobre cortes montados sobre portaobjetos y con diferentes grosores, aunque en todos los casos el protocolo usado fue el mismo.

Previamente a realizar esta tinción, las muestras fueron desparafinadas e hidratadas (Apartado 4.6.3 de Material y Métodos) restableciendo la inmunoreactividad tisular. Después de este paso, se empezó la inmunofluorescencia realizando tres lavados de 5 minutos en PBS a TA y se

continuó con la permeabilización del tejido y el bloqueo de la reacción de fondo inespecífico. Para ello durante 1 hora las muestras permanecieron en la solución de tampón de bloqueo compuesta por PBS suplementado con un 10 % de suero de cabra (NG, del inglés *Normal Goat Serum*) (Gibco-Invitrogen) y un 0.1 % Tritón X-100 (Panreac) a TA. En el caso de que alguno de los anticuerpos esté hecho en cabra, usaremos suero de caballo (Gibco-Invitrogen). El siguiente paso la incubación con el anticuerpo primario. Las muestras permanecieron toda la noche a 4 °C y en una atmósfera húmeda con el tampón de bloqueo al que se le había añadido el anticuerpo a la disolución correspondiente. A la mañana siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en PBS para eliminar el anticuerpo no unido al antígeno durante la incubación anterior. A continuación, se hizo una incubación de 60 minutos a TA y en oscuridad con el anticuerpo 2º diluido en tampón de bloqueo. El anticuerpo 2º usado en este caso está marcado directamente con el fluoróforo (Tabla 4). Finalmente, se realizaron 5 lavados de 5 min a las muestras para eliminar el exceso de anticuerpo secundario que no se ha unido al anticuerpo primario y se montaron con medio de montaje con DAPI (Prolong Gold antifade with DAPI, Invitrogen S.A.).

4.6.5.2. Técnica de inmunoperoxidasa

El proceso de desparafinación e hidratación en el caso de esta inmunohistoquímica es diferente al comentado en el apartado anterior. Para ello los portaobjetos que contenían los cortes histológicos se introdujeron en una estufa a 60 °C durante 25 minutos. Después se realizaron dos lavados de xilol durante 5 minutos cada uno, y por último se sumergieron durante 20 minutos y en oscuridad en una solución de metanol con 3 % de H₂O₂ (Panreac) para inhibir la peroxidasa endógena del tejido.

Seguidamente se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con PBS y se incubaron durante 50 minutos a 37 °C en HCl 1N. Este paso con HCl es debido a que vamos a usar un anticuerpo primario que se une directamente al ADN y hemos de separar las hebras de ADN previamente a la incubación con el anticuerpo primario, si no, es innecesario. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS y se bloquearon durante 1 hora a TA con una solución de NGS al 10 % (Gibco-Invitrogen) y Triton X-100 al 01 % en PBS. Posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario, en nuestro caso usamos un anticuerpo monoclonal anti-BrDU (Abcam) diluido 1/100 en tampón de

bloqueo. Al día siguiente se lavaron las muestras 5 veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rat biotinilado (Jackson ImmunoResearch) a la dilución 1/200 en tampón bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

A continuación, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se incubó con el kit Vectastain Elite ABC Peroxidase kit Standard (ABC) (Vector laboratories) en tampón de bloqueo durante 30 minutos y en oscuridad. Esta solución se preparó 30 min antes de su uso.

Seguidamente se lavaron las muestras 3 veces con PBS y en nuestro caso se revelaron con el reactivo 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich Química S.A.) que deja un precipitado de color marrón, estableciendo el tiempo de revelado entre 30 segundos y 1 minuto aproximadamente. La muestra se lavó abundantemente con agua corriente y se contrastaron los núcleos con Hematoxilina de Harris durante 20 segundos y se lavaron 3 veces con agua destilada. Finalmente, las muestras se deshidrataron con una sucesión creciente de alcoholes (1 baño minutos en alcohol de 50°, 1 baño de 5 minutos en alcohol de 70°, 1 baño de 5 minutos en alcohol de 96°, 2 baños de 10 minutos en alcohol de 100°), 2 baños de 10 minutos en xileno y se montó con Eukitt (Panreac).

4.6.6. Técnicas de imagen

4.6.6.1. Microscopia de campo claro

Para la visualización de los cortes de tejido cardíaco y dérmico teñidos con las tinciones convencionales se utilizó un microscopio de lupa digital para campo claro modelo Leica DM108.

4.6.6.2. Microscopia de fluorescencia

Tras realizar la inmunohistoquímica de fluorescencia, los cortes de tejido cardíaco y dérmico se fotografiaron con el microscopio óptico DM6000 de Leica, equipado con la cámara en blanco y negro Leica DFC350 y con el software Leica Application Suite Version 2.4.0 R1. Se realizó una adquisición secuencial de imágenes con distintos filtros de barrera (adecuados para cada uno de los fluorocromos) que posteriormente se combinaron creando una imagen superpuesta en color, lo que facilitó el análisis de la co-localización de los marcadores y, en su caso, la cuantificación de su expresión.

4.6.6.3. Microscopia confocal

La microscopía confocal es un tipo de microscopía de fluorescencia basada en el uso de un láser que incide sobre la muestra y barre todos los puntos en un plano focal mientras que elimina la luz emitida por otros niveles, lo que permite realizar fotos secuenciales a distintos planos y crear una composición de imagen 3D. Esto consigue evitar efectos de solapamiento de señales y resulta imprescindible en estudios inmunohistoquímicos de alta precisión.

Tras realizar la inmunohistoquímica de fluorescencia las muestras se analizaron con el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS utilizando un objetivo de inmersión 63 X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N. Las muestras se analizaron mediante una doble o triple excitación 405 nm (DAPI), 491 nm (Alexa Fluor 488) y 561 nm (Alexa Fluor 555).

El análisis se realizó a través del servicio de microscopía confocal del IISLaFe de Valencia.

4.6.6.4. Microscopia electrónica de transmisión

En la microscopia electrónica se utiliza un haz de electrones como fuente de iluminación, de tal forma que aumenta mucho la resolución, lo que nos permite resolver detalles que no puede resolver el microscopio óptico, es decir, nos permite observar la ultra-estructura celular.

Para el estudio mediante microscopia electrónica las muestras requirieron de un procesado especial que fue realizado con la asistencia de un técnico especializado del servicio de microscopia electrónica de transmisión del CIPF de Valencia.

Se obtuvieron secciones del tejido de 1,5 μm (cortes semifinos) con un ultramicrotomo con cuchilla de diamante y se tiñeron con una solución de Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich; 1% Azul de toluidina, 1% Borato sódico, H_2O) para su contraste. Estos cortes fueron visualizados al microscopio óptico DM600 (Leica) y se identificaron las zonas de interés. Una vez identificada la zona de interés a partir de los cortes semifinos, se realizaron secciones de 0,5 μm (cortes ultrafinos) con cuchilla de diamante, se tiñeron con citrato de plomo (Sigma-Aldrich) y se analizaron con el microscopio electrónico FEI Tecnai spirit.

4.6.7. Análisis histológico

4.6.7.1. Cuantificación del tamaño de infarto

Para cuantificar la extensión del infarto se realizó la tinción de Tricrómico de Masson en una serie completa de cortes de tejido cardíaco desde el ápex hasta la base para cada animal. La tinción de tricrómico de Masson permite distinguir la zona de tejido infartado (teñida en azul) del músculo cardíaco no dañado (teñida en rosa-morado). Los cortes se fotografiaron con un fotomicroscopio DMD 108 de Leica y mediante un programa de análisis de imagen (Image Proplus 7.0), software de Media Cybernetics, se determinó el área de la cicatriz resultante del infarto. La extensión del infarto se expresó como el porcentaje de zona fibrótica respecto al total del área del ventrículo izquierdo.

4.6.7.2. Cuantificación del grado de inflamación tisular

Para el análisis de la inflamación producida por el biomaterial tanto en tejido cardíaco como dérmico, se utilizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina.

Dicha tinción nos permite distinguir las zonas de infiltrado leucocitario correspondientes a las zonas de inflamación (que adquieren un intenso color morado debido a la alta densidad de núcleos en la zona, que tienen naturaleza ácida y se tiñen con la hematoxilina que es un componente básico) de las zonas de no inflamación, tejido conjuntivo o musculatura sana (zonas más rosadas con un menor número de núcleos y mayor extensión de componentes citoplasmáticos que, por ser elementos de naturaleza básica, se teñirán con el colorante ácido, la eosina).

En los experimentos de tipo cardíaco se tomaron imágenes de cortes de corazón sin infarto del interior de los BM. Se analizaron 3 cortes por corazón y se tomaron de 3 a 4 fotos a 200 aumentos. El estudio se realizó para en 6 ratas por grupo experimental y para cada condición.

En los experimentos donde el BM fue implantado a nivel subdérmico, se analizaron de 5 a 10 cortes por animal y se tomaron imágenes del interior del BM a 200 aumentos. El estudio se realizó para en 6 ratas por grupo experimental.

En ambos casos se analizó la presencia de infiltrados celulares inflamatorios (proceso en el cual un tejido vascularizado presenta un acúmulo de alguna de las siguientes células: neutrófilos, monocitos, macrófagos o linfocitos), hemorragia

(extravasación de eritrocitos), reacción granulomatosa (aparición de células multinucleadas gigantes reactivas frente a cuerpo extraño) y congestión vascular (acúmulo de sangre en los vasos). Para el estudio cardíaco, además de los factores mencionados también se analizó la fibrosis cardíaca epicárdica. Los datos se muestran en una tabla donde refleja la presencia de estos factores en elevada, leve, modera o nula. Este método de cuantificación de la inflamación ha sido descrito en otros trabajos y se considera un análisis semi-cuantitativo [161, 217, 218].

4.6.7.3. Cuantificación del grado de revascularización tisular o análisis de la neovascularización

El número de vasos se calculó a partir de las imágenes de fluorescencia de tejido cardíaco marcado con el anticuerpo caveolina que es un marcaje específico de células endoteliales. Se obtuvieron 4 imágenes a 200 aumentos de tres cortes del interior de los BM implantados en la superficie de corazones de ratas con y sin infarto (12 fotos por animal). El estudio se realizó en 6 ratas por cada grupo experimental y condición.

El mismo análisis se hizo para determinar el número de vasos en la zona injertada de piel humana en ratones. En este caso se utilizó el anticuerpo CD31. Se obtuvieron 3 fotos a 200 aumentos en zona de la dermis del injerto de piel humana para cada corte y se analizaron 6 cortes por animal (18 fotos por animal). El estudio se realizó en 5 ratones por grupo experimental.

La densidad vascular se midió a partir de las imágenes capturadas utilizando un programa de tratamiento de imágenes (Image Proplus 7.0) y se expresó como número de vasos/mm².

4.6.7.4. Cuantificación de macrófagos inflamatorios M1/M2

La identificación de macrófagos se realizó con un anticuerpo que identifica la molécula CD68 presente en macrófagos. Para determinar el fenotipo de los macrófagos se utilizaron los anticuerpos CCR7+ para el fenotipo M1 y para el fenotipo M2 el CD163+ en tejido cardíaco y el CD206+ en tejido dérmico.

La cuantificación se realizó en ratas sanas e infartadas y se utilizaron 6 animales por cada grupo experimental y condición. Fueron sacrificadas a las 2 semanas tras el implante del biomaterial. Las imágenes para la cuantificación se realizaron en la interfase entre el tejido cardíaco y el BM. Se tomaron un total de

seis cortes de una serie completa del corazón y se realizaron dos imágenes a 20x de la zona circundante al implante.

En los experimentos donde el BM fue implantado a nivel subdérmico, se analizaron de 5 a 10 cortes por animal y se tomaron 4 imágenes a 200 aumentos del área de la dermis en contacto con el biomaterial. El experimento se realizó en 4 ratas por grupo experimental.

La proporción de macrófagos M1 y M2 se calculó mediante la cuantificación del número de células CCR7+/CD68+ (M1) y células CD163+/ CD68+ (M2 cardíaco) o CD204+/ CD68+ (M2 dérmico) en cada campo.

4.6.7.5. Análisis morfométrico de los equivalentes dérmicos injertados

Para la valoración de la orientación de las fibras de colágeno en los ED injertados en ratones realizamos un análisis morfométrico utilizando la transformada de Fourier [219, 220]. Esta técnica permite cuantificar la calidad de la piel nueva generada valorando las muestras histológicas de la piel. En el análisis se obtiene el índice de orientación del colágeno, que está comprendido entre 0 y 1. Valores cercanos a 0 significan que la orientación de las fibras de colágeno es paralela y la piel generada es de mala calidad. Valores cercanos a 1 corresponden a un patrón aleatorio de las fibras de colágeno, lo que se traduce en una dermis resistente y de buena calidad.

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante un programa de análisis de imagen IMAGE-PRO PLUS 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU.). Para cada animal se adquirieron 3 imágenes a 200 aumentos de tres cortes teñidos con la tinción de tricrómico de Masson (9 imágenes por animal). Los cortes correspondían a la zona de la dermis de los ED injertados en ratones inmunodeprimidos después de 1 mes. El estudio se realizó en 5 ratones por cada grupo experimental. Se calculó la media de las imágenes adquiridas para cada grupo experimental.

4.7. Técnicas bioquímicas y moleculares

4.7.1. Extracción de ARN

La obtención de la muestra para la extracción del ARN se realiza de diferente manera según la naturaleza de la misma.

4.7.1.1. Extracción de ARN a partir de cultivo celular

Se sembraron a razón de 6 a 8 millones de leucocitos por biomaterial. Después de estar los leucocitos en contacto con los materiales durante 5 horas, se les realizó un lavado de PBS, se cogió el BM y se introdujo en tubos de 2 ml. A continuación, se añadió 1 ml de Trizol (Tri-reagent, Sigma Aldrich Química S.A.) y se centrifugó a máxima velocidad para lisar las células. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich Química S.A.), se incubó durante 3 min a TA y se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se recogió la fase acuosa, en la cual se encuentra disuelto el ARN total, evitando recoger la interfase donde se sitúa el ADN, se pasó a un tubo, se añadieron 500 µl de Isopropanol (Panreac) y se incubaron durante 15 min a TA. Seguidamente se centrifugó a 12.000 g durante 20 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 800 µl de etanol de 70°. El precipitado se mezcló suavemente, se centrifugó a 12.000 g durante 20 min a 4 °C y, una vez eliminado el sobrenadante, se dejó el eppendorf abierto en una cabina para que se evaporaran los restos de etanol. Finalmente se añadieron 30 µl de agua DEPC (Invitrogen S.A.) para resuspender el ARN y las muestras se conservaron en un congelador a -80 °C hasta su posterior procesado.

4.7.1.2. Extracción de ARN a partir de tejido

Para llevar a cabo la extracción de ARN a partir de tejido sin fijar, primero se obtuvo la zona de tejido que había estado en contacto con el biomaterial e inmediatamente se depositó el tejido en el interior de un criotubo y se congeló sumergiéndolo en N₂ líquido. Los tejidos se conservaron a -80 °C hasta el momento que se realizó la extracción de ARN. Para la extracción se cogió una cantidad de 80 a 100 mg de tejido, se añadió 1 ml de Trizol y a continuación se trituró el tejido. A partir de este paso se procedió igual que en el apartado anterior.

4.7.2. Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN extraído se llevó a cabo con el espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Termo Fisher Scientific, USA). La cuantificación de ARN se

realiza mediante absorbancia a 260nm y su pureza midiendo el ratio A_{260}/A_{280} . Los valores cercanos a 2 se consideran óptimos en este caso.

4.7.3. PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) consta de dos partes. En primer lugar, tiene lugar la transcripción inversa mediada por una transcriptasa inversa o retrotranscriptasa que cataliza la conversión de ARN en ADN complementario (ADNc). A continuación, este ADNc sintetizado se emplea como molde en una reacción convencional de reacción en cadena de la ADN-polimerasa.

4.7.3.1. Transcripción inversa

La transcripción inversa consiste en la síntesis de ADNc desde una muestra de ARN que actúa como molde, el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas.

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN mensajero de las muestras se utilizó la transcriptasa inversa M-MLV-RT (Invitrogen) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf partiendo de 1 μg de ARN como molde de la reacción y usando Random hexamers (Applied Biosystems-Invitrogen) como cebadores. Esta reacción se llevó a cabo como se indica a continuación: en una primera etapa se añadió 1 μg de ARN, 1,25 μl de Random hexamer 50 μM y agua DEPC (Sigma-Aldrich) hasta un volumen final de 20 μl . Esta solución se incubó durante 5 min a 37 °C. A continuación, se añadieron a la solución 4 μl de First Strand Buffer 5x (Invitrogen), 1,5 μl de la transcriptasa inversa M-MLV RT (Invitrogen), 1,25 μl del inhibidor de ARNasas RNaseOUT (Invitrogen) y 1,25 μl de la mezcla de dNTPs 10 mM (Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. El ADNc sintetizado se guardó a -20 °C hasta la realización de la siguiente etapa.

4.7.3.2. Amplificación del ADNc

Una vez sintetizado el ADNc, amplificamos de forma selectiva secuencias específicas de ADN mediante la reacción en cadena de la ADN-polimerasa.

Para la realización de las qPCR se siguen las recomendaciones del producto KAPA SYBR FAST qPCR (KAPA Biosystems; cat: KK4602). Para cada reacción se mezclan: 7,5 μL de SYBR FAST qPCR Master Mix (2x), 3 μL de una dilución 1:10 del ADNc obtenido en el paso anterior, 0,3 μL de una solución de los

correspondientes cebadores sentido y antisentido 10 mM (Tabla 5) y agua miliQ (Millipore) hasta alcanzar un volumen final de 15 μ L. Para cada gen y muestra se hacen triplicados. Previamente a la adición de los reactivos, se hacen dos mezclas o mixes diferentes: ADNc en agua miliQ y, por otro lado, SYBR FAST PCR Master Mix (2x) junto con los cebadores antes de la mezcla final en el pocillo. ACT- β se utilizó como normalizador de la expresión o del inglés housekeeping.

Cebadores	Secuencia (5 \rightarrow 3)	Tamaño del amplicón (pb)
IL- β forward	AGGCACAAGGCACAACAGGCT	277
IL- β reverse	AACAACCTGACGCGGCCTGCC	277
IL-4 forward	TCTGTGCACCGAGTTGACCGT	150
IL-4 reverse	TGCTGTGCAGTCGCACCCAG	150
IL-10 forward	AGACCCAGACATCAAGGCGCA	82
IL-10 reverse	TCGATGACAGCGCCGTAGCC	82
IL-13 forward	GGCATGTACTGTGCAGCCCTGG	96
IL-13 reverse	GTGCGGGCAGAATCCGCTCA	96
IFN $-\gamma$ forward	GAGTGTGGAGACCATCAAGGA	176
IFN $-\gamma$ reverse	CTGTTTTAGCTGCTGGCGAC	176
ACT- β forward	AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC	101
ACT- β reverse	CATGCCGGAGCCGTTGTCGAC	101

Tabla 5: Resumen de las características principales de los cebadores utilizados en la qPCR.

Para la reacción de amplificación y detección se utiliza el siguiente protocolo: 95 $^{\circ}$ C 2 min \rightarrow [95 $^{\circ}$ C 3s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 20 s] x40 \rightarrow 40 $^{\circ}$ C 30 s. La adquisición de fluorescencia se recoge al final del paso a 60 $^{\circ}$ C para cada ciclo. La reacción de qPCR y la adquisición de fluorescencia se realiza en el aparato *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf). Las medias de los Ct de las 3 réplicas obtenidas se analizan por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5. Técnicas *in vivo*

5.1. Animales

Todos los procedimientos quirúrgicos descritos en la presente tesis han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) o del Instituto de Investigaciones Sanitarias La Fe (IISLaFe) y están realizados según los requisitos estipulados por el Real Decreto 1201/05 y Ley 32/07 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Delia Castellano cuenta con la titulación oficial de tipo C concedida por la Consejería de Alimentación, Agricultura y Pesca, de la Generalitat Valenciana, necesaria para poder trabajar legalmente con animales de experimentación.

Para la realización de esta tesis se usaron diferentes tipos de animales procedentes de Charles River Laboratories internacional, Inc.

Para el modelo de infarto agudo de miocardio y los implantes subdérmicos se utilizaron ratas Wistar macho de unos 200 gramos de 8 semanas de edad. Y para el modelo de xenotrasplante se utilizaron ratones atómicos Foxn1nu (nu/nu) de unos 20 gramos y 7 semanas de edad. Por su condición inmunológica, la estabulación se realizó en condiciones libres de patógenos, utilizándose para ello racks ventilados y alimentación irradiada con radiación gamma. La cepa Wistar fue mantenida en condiciones similares pero sin los mismos requisitos de esterilidad.

5.2. Procedimientos quirúrgicos

5.2.1. Anestesia y analgesia

La anestesia es un estado reversible producido por fármacos, caracterizado por la ausencia de cualquier tipo de percepción sensorial, ya sea dolorosa o no. Gracias a este estado de no consciencia, se facilita la manipulación de los animales durante los procesos quirúrgicos, se reduce el sufrimiento del animal y se disminuyen las consecuencias negativas de la cirugía sobre la fisiología del animal.

En la tabla 6 se expone los productos y las dosis administradas para la anestesia y analgesia en las diferentes fases del proceso quirúrgico.

Fase	Anestesia				Analgesia		
	Producto (*)	Vía (**)	Dosis (mg/kg)	Mezcla O ₂ (L)	Producto (*)	Vía (**)	Dosis (mg/kg)
Preoperatorio e inducción anestésica	Sevorane	INH	6%	0,6	fentanilo	IP	0,05
Mantenimiento anestésico	Sevorane	INH	2,5% (rata) 1,5% (ratón)	0,3			
Postoperatorio	-	-	-	-	buprenorfina	IP	0,05
Ecografías	Sevorane	INH	2%	0,3	-	-	-

(*) Sevorane. Sevoflurano Abbott, Madrid, España; Fentanilo. (Fentanest, Kern Pharma); Buprenorfina. (Buprex, Schering-Plough S.A.).

(**) INH: inhalatoria. IP: intraperitoneal.

Tabla 6: Anestesia y analgesia de los animales: productos y dosis administradas.

5.2.2. El modelo experimental de infarto de miocardio en rata

Antes de realizar la técnica quirúrgica se procedió a anestesiarse a la rata introduciéndola en una cámara anestésica. Esto permitió que la rata se durmiera momentáneamente y disponer de unos segundos para realizar la intubación.

Para la intubación se colocó a la rata en posición decúbito supino, se transiluminó la tráquea con una fuente de luz fría y se procedió a la intubación endotraqueal con un catéter de 18G (1,3 mm de diámetro) y una longitud de 2" (5,1 cm) (Braun). A partir de este momento la rata queda conectada al respirador automático (modelo 683, Harvard Apparatus), cuyos parámetros más importantes son un volumen tidal de 2 ml y un ritmo de respiración de 100 respiraciones por minuto. El plano anestésico se mantuvo a lo largo de todo el procedimiento quirúrgico mediante anestesia volátil con la mezcla descrita en la tabla 6.

A continuación, la rata fue colocada sobre una manta eléctrica para asegurar el mantenimiento de la temperatura corporal y se procedió a preparar el campo quirúrgico. Se rasuró la zona izquierda del pecho, se esterilizó con una solución

yodada y se realizó una incisión de 2 cm entre la cuarta y la quinta costilla hasta acceder a la cavidad torácica. Con cuidado de no dañar el pulmón y con un separador se abrió el espacio intercostal hasta acceder bien al corazón. Se abrió la fina membrana pericárdica y se procedió a la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDAI) mediante la ligación permanente de la misma con una sutura de monofilamento no reabsorbible de 6/0 (Premilene, Braun). Esto produce un cambio de coloración en la zona de miocardio dependiente de la arteria ligada indicando la correcta realización del IAM (Figura 23A). Una vez la arteria estaba ocluida se cerró el pecho del animal con una sutura monofilamento reabsorbible de 3/0 (Monosyn, Braun). Por último, se retiró la anestesia, se curó la herida con Betadine (Viatrix Manufacturing, Burdeos, Francia) y se esperó a que la rata despertara por sí sola.

5.2.3. Implante del biomaterial sobre el tejido cardíaco

Para implantar el biomaterial en la superficie del tejido cardíaco en corazones con y sin IAM, se procedió de la siguiente manera. Se situó el BM de 1 cm² de tamaño en la zona isquémica del epicardio y se fijó al mismo mediante 2 puntos sueltos de sutura con Premilene 6/0 (Braun). Los dos puntos se realizaron en dos esquinas opuestas del BM para una mejor sujeción (Figura 23B) [221]. En los animales sin IAM se colocó el BM en la misma región donde hubiese sido la isquemia y con la misma sujeción.

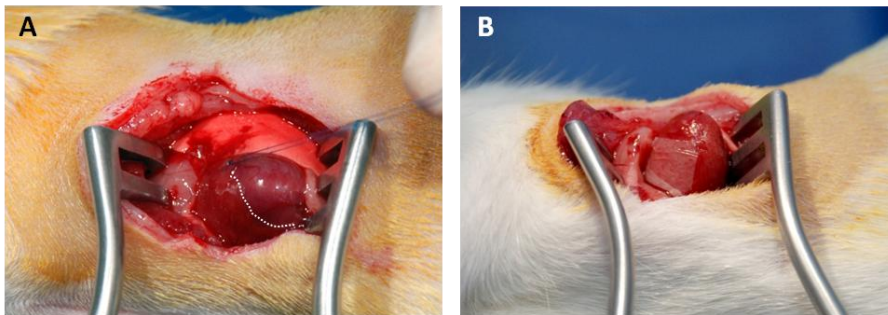


Figura 23. Imágenes del corazón durante la realización de los procesos quirúrgicos. A. Momento en el que se realiza el IAM mediante la ligadura de la ACDAI. La línea de puntos indica la zona isquémica y la sana. **B.** Técnica de sutura del biomaterial al corazón.

5.2.4. Modelo subdérmico en rata

La finalidad de este modelo es testar los biomateriales a nivel subdérmico y analizar su capacidad angiogénica, su biodegradabilidad y el nivel de inflamación. En bibliografía existen numerosos artículos en los que se realizan implantes subdérmicos [224, 225].

El plano anestésico y analgésico se mantuvo a lo largo de todo el procedimiento quirúrgico como se describe en la Tabla 6.

Tras afeitar y limpiar la zona dorsal se realizó una incisión de 3 cm de longitud en el lomo del animal y se colocó el BM de 3 cm de largo por 2 de ancho de manera subdérmica (entre la dermis y la musculatura) (Figura 25). Los BM mostraron tener buena adherencia a la zona subdérmica del animal y no hizo falta realizar ningún tipo de sujeción. Posteriormente, la incisión se cerró con sutura reabsorbible de 3/0. Los animales se sacrificaron 15 días post-implante del BM y se extrajeron las muestras para realizar el estudio histológico.



Figura 24. Implante del biomaterial a nivel subdérmico en la zona dorsal de ratas Wistar.

5.2.5. Modelo xenotrasplante en ratón

Una vez los ratones fueron anestesiados se procedió a iniciar el proceso quirúrgico. Se extirpó una porción de 6 cm² de epidermis de la parte superior del animal. Con el trozo de piel escindida se procedió a su desvitalización por congelación y descongelación en nitrógeno líquido. La finalidad de este procedimiento es que esta piel desvitalizada pueda servir posteriormente como una cobertura natural del equivalente dérmico una vez éste esté injertado en el animal.

En el trozo de herida abierta se depositó el BM y encima de éste el ED humano generado *in vitro*. Ambos se suturaron al animal con sutura Premilene® 6/0. Para proteger el injerto de la deshidratación y de la manipulación del propio animal, se cubrió con la piel desvitalizada del propio ratón y se suturó con sutura reabsorbible VICRYL RAPIDE 3/0. Dicha cobertura se desprendió espontáneamente en los primeros 15 días de su aplicación. Para finalizar el procedimiento se sellaron los bordes con vaselina estéril de uso clínico (Figura 25).

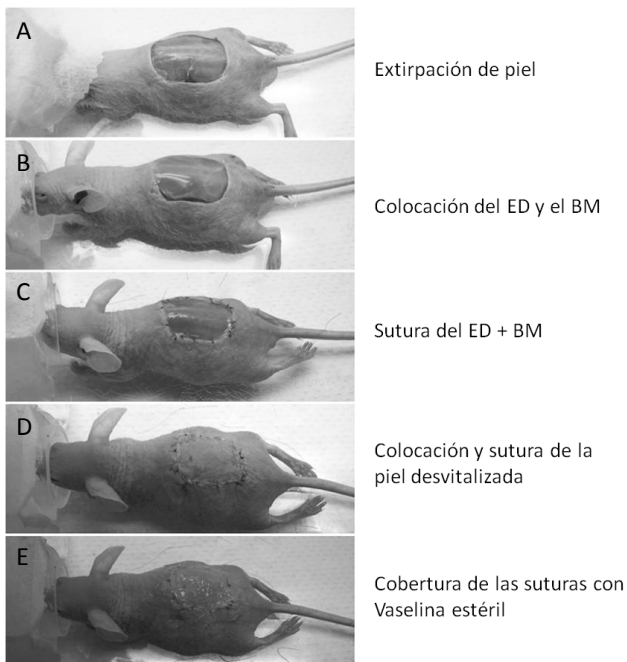


Figura 25. Procedimiento del modelo de xenotrasplante en ratón.

Los ratones fueron sacrificados a uno y dos meses después de realizar el implante de los injertos de piel humana generados *in vitro*. Se extrajo la piel del dorso del animal para su estudio histológico.

5.3. Análisis ecocardiográfico

La ecocardiografía es una prueba fundamental para ver la evolución de la función cardíaca en el tiempo. Con ella se obtiene información muy detallada, en tiempo real, de la morfología cardíaca y además es una técnica no invasiva.

Las adquisiciones se realizaron 1 día antes del infarto (función cardíaca basal) y a los 15, 30 ó 60 días post-infarto (función cardíaca post-IAM), según el experimento.

Para ello la rata se anestesió, se colocó en posición decúbito supino y se rasuró la zona izquierda del pecho donde se coloca la sonda. Las imágenes se adquirieron con un ecógrafo General Electric modelo Vivid 5 equipado con una sonda lineal de 10 MHz.

A cada uno de los tiempos indicados se realizó una ecocardiografía transtorácica (corte transversal del corazón) a nivel de los músculos papilares (Figura 26 A y B), adquiriéndose imágenes tanto en modo M (imagen lineal a la que se le ha introducido la variable tiempo) (Figura 26D) como en 2D (imagen bidimensional en tiempo real) (Figura 26C). Los parámetros funcionales se calcularon en tres ciclos cardíacos consecutivos utilizando métodos estándares. En el modo-M se midieron el diámetro del ventrículo izquierdo y el grosor de la pared anterior y pared posterior tanto en diástole como en sístole. En las imágenes 2D se midió el área interna del ventrículo izquierdo en diástole y en sístole [222, 223].

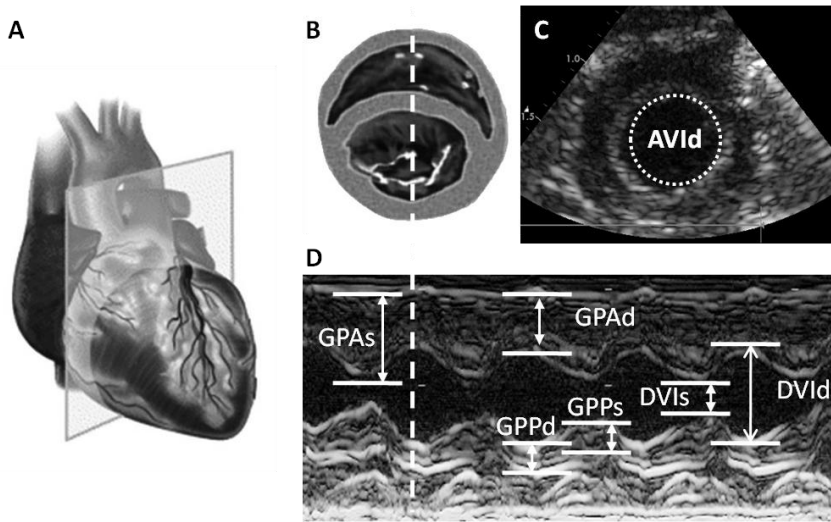


Figura 26. Parámetros ecocardiográficos. **A.** Plano ecocardiográfico del corazón. **B.** Corte trasversal del corazón a nivel de los músculos papilares. **C.** Imagen representativa de una imagen en modo 2D donde se delimita con la línea de puntos el área del ventrículo izquierdo en diástole (AVId). **D.** Imagen representativa de una imagen modo-M donde se indican los diferentes parámetros a medir: **GPAd**, grosor pared anterior en diástole; **DVId**, diámetro ventrículo izquierdo en diástole; **GPPd** grosor pared posterior en diástole; **GPAs**, grosor pared anterior en sístole; **DVIs**, diámetro ventrículo en sístole; **GPPs**, grosor pared posterior en sístole.

A partir de estas medidas se calcularon los siguientes parámetros de función cardíaca:

- **Cambio Porcentual de Área (CPA):** $[(AVId - AVIS) / AVId] \times 100$
- **Fracción de Acortamiento (FA):** $[(DVId - DVIs) / DVId] \times 100$
- **Engrosamiento de la Pared Anterior (EPA):** $(GPAs - GPAd - 1) \times 100$

6. Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el software SPSS 17.0 para Windows y el software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EEUU). La normalidad de las muestras se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilks. En aquellas muestras que seguían una distribución normal, las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron utilizando un ANOVA, y las comparaciones entre dos grupos, utilizando el T test para dos muestras independientes o pareadas. En aquellas muestras en las que fue necesario utilizar estadística no paramétrica, las comparaciones entre grupos

se realizaron utilizando el test de Kruskal-Wallis, y para las comparaciones entre dos grupos, utilizando el test de U de Mann-Whitney. Para las comparaciones no paramétricas de dos muestras apareadas se utilizó el test de Wilcoxon. En todos los casos, las diferencias entre los grupos se consideraron significativas para $p < 0,05$, y muy significativas para $p < 0,01$. Los datos se mostraron como media \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

1. Caracterización de biomateriales para el estudio

Para la realización de este trabajo se han analizado 17 biomateriales (BM) que fueron proporcionados por el Instituto Tecnológico AITEX: 2 variantes de poli (3-hidroxibutirato) (PHB), 5 variantes de poli (ε-caprolactona) (PCL), 2 de Seda, 4 de ácido poli-láctico (PLA), 2 de poliamida (PA) y 2 de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Se realizó un primer cribado para seleccionar un biomaterial de cada tipo que pudiera ser utilizado con fines terapéuticos para el tratamiento del IAM y de lesiones cutáneas. Una vez seleccionados los BM idóneos, se caracterizaron con más profundidad para conocer su capacidad de proliferación y su respuesta inflamatoria a nivel celular.

1.1. Evaluación de la biocompatibilidad celular, de la hidrofobicidad y del comportamiento mecánico

Los BM se seleccionaron en función de su fácil manejabilidad, resistencia, carácter hidrofílico y por su capacidad de albergar células en su interior. A continuación, se muestran imágenes representativas de experimentos que sirvieron para descartar biomateriales no adecuados para el estudio.

1.1.1. Biocompatibilidad celular

Para evaluar la biocompatibilidad de los BM se sembraron 4×10^4 células/cm² y se dejaron crecer 48 h. Transcurrido ese tiempo las células se fijaron y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI. Posteriormente se observaron al microscopio de fluorescencia. En la figura 27A se observan las células bien adheridas y vivas, demostrando que el BM donde fueron sembradas era biocompatible. Por otro lado, la figura 27B muestra que las células están muertas. Todos los BM donde se observó este resultado fueron descartados.

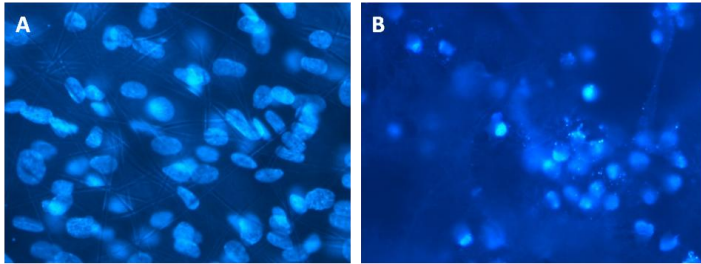


Figura 27: Imagen representativa del aspecto que muestran las células adheridas a un BM biocompatible (A) y a uno que no lo es (B). Células mesenquimales de pulpa dentaria marcadas con DAPI (azul) sembradas en un BM. Imágenes tomadas con el objetivo 40x.

1.1.2. Hidrofobicidad

Para que las células crezcan sobre los BM es necesario que éstos queden embebidos en el medio de cultivo. Para evaluar esta propiedad, los biomateriales fueron colocados en placas de cultivo y se añadió medio de cultivo. Los BM que flotaron mostraron un carácter hidrofóbico (Figura 28A) y los que permanecieron en el fondo de los pocillos mostraron un carácter hidrofílico (Figura 28B). Los BM que presentaron hidrofobicidad al medio de cultivo fueron descartados para el estudio.

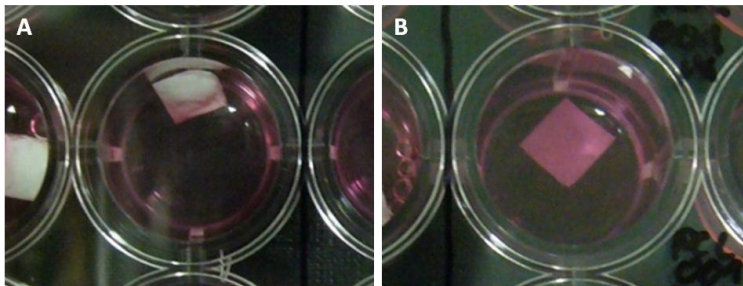


Figura 28: Biomateriales embebidos en el medio de cultivo. A. BM hidrofóbico flotando en el medio de cultivo. B. BM hidrofílico embebido en el medio de cultivo.

1.1.3. Comportamiento mecánico

Para utilizar un BM es necesario que su manipulación sea posible. BM que inicialmente iban a ser estudiados demostraron ser quebradizos en su manipulación (Figura 29).

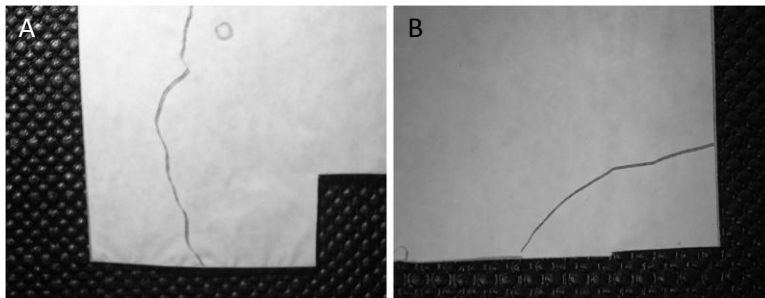


Figura 29: Imágenes representativas de biomateriales quebradizos.

De los 17 BM estudiados, se seleccionó una variante de cada tipo para continuar el estudio. Los BM seleccionados cumplieron las propiedades idóneas para la finalidad del estudio (fácil manejabilidad, resistencia, carácter hidrofílico y biocompatibilidad). Únicamente la seda mostró una capacidad de deformación limitada debido a su naturaleza frágil. En la tabla 3 del apartado 1 de Material y Métodos se resumen los parámetros técnicos de fabricación de los BM seleccionados.

1.2. Ensayos de adhesión y proliferación celular

Con el fin de determinar la adhesión celular a los BM seleccionados, se sembraron células de pulpa dentaria sobre los mismos a una densidad de 4×10^4 células/cm² y se cultivaron durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se fijaron las células y se tiñeron sus núcleos con DAPI.

La visualización de los núcleos por microscopía de fluorescencia (Figura 30 paneles inferiores) mostró una buena adhesión celular a todos los BM. No obstante, se observó un comportamiento de dispersión diferente que dependía del sustrato polimérico. En los biomateriales de colágeno (COL), Matriderm (MD), PCL, PLA y PA las células crecieron y se distribuyeron ocupando toda la superficie del BM. Sin embargo, el crecimiento de las células en los biomateriales PHB y SEDA fue diferente. En la SEDA la distribución fue mucho más heterogénea, llegando a formar agrupaciones de células. En el PHB las células se adhirieron solo en el sitio donde inicialmente se sembraron y no se expandieron.

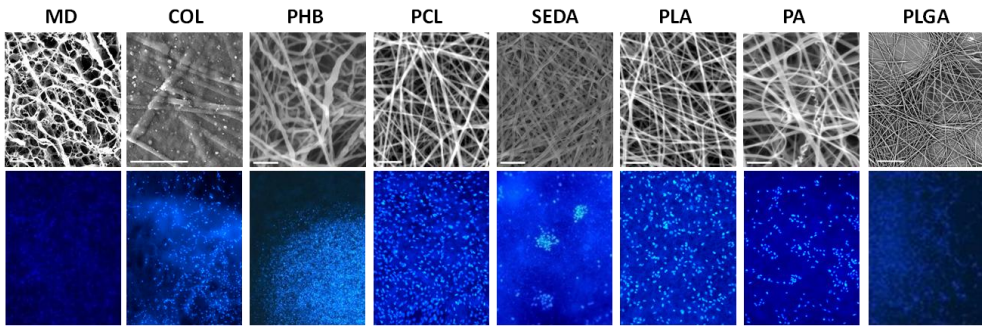


Figura 30. Adhesión de los BM a nivel celular. Microscopía electrónica de barrido de los BM (paneles superiores) y tinción nuclear en azul (DAPI) de células mesenquimales de pulpa dentaria cultivadas en los BM durante 48 horas. Las imágenes se adquirieron con los objetivos de 20x en paneles superiores y a 10x en paneles inferiores. Barra de escala de 50 μm en colágeno (COL) y 10 μm en las demás imágenes.

En conjunto podemos concluir que las diferencias en la composición, el diámetro o la disposición de las fibras en los diferentes tipos de BM influyen en la capacidad de adhesión y expansión de las células.

Tras comprobar que los BM eran aptos para el cultivo celular, procedimos a evaluar si además las células eran capaces de proliferar.

Para ello, se sembraron sobre los BM células de pulpa dentaria previamente transfectadas con un vector que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) y se cultivaron durante 24, 48 y 96 horas. Transcurridos los tiempos determinados, los BM fueron fijados y se observaron al microscopio de fluorescencia (Figura 31).

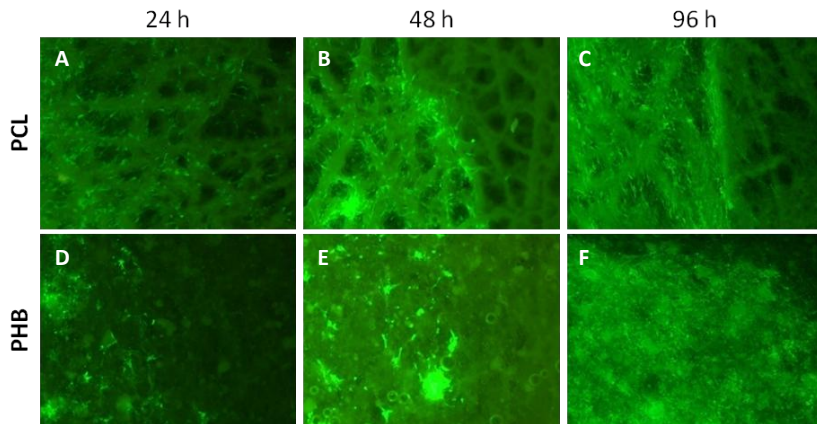


Figura 31: Imágenes de células de pulpa dentaria-GFP creciendo en los biomateriales a lo largo del tiempo. Imágenes tomadas con el objetivo 4x.

La figura 31 representa imágenes de los BM PCL y PHB a las 24, 48 y 96 horas de incubación, en las que se observa un aumento progresivo en el tiempo del número de células que hay sobre cada uno de los BM. Con ello se comprobó que las células no solo pueden permanecer viables en los BM sino que son capaces de proliferar y expandirse a través de las fibras. Este comportamiento se observó en todos los BM.

1.3. Estudio inflamatorio *in vitro*

Para analizar la respuesta inflamatoria inducida por los BM, se cultivaron leucocitos recién aislados de sangre total de pacientes sanos sobre los BM durante 5 horas y posteriormente se extrajo el ARN y se evaluó el perfil inflamatorio mediante qPCR. Se analizó la expresión de interleuquinas relacionadas con procesos pro-inflamatorios como IL-1 β e IL-6 y anti-inflamatorios como IL-10. El test inflamatorio *in vitro* recomendado por la FDA (*Food and Drug Administration*) requiere la medición de IL-6 e IL-1 β como citoquinas pro-inflamatorias. En este caso particular, decidimos incluir la IL-10 como indicador de un efecto anti-inflamatorio potencial.

Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de expresión de **IL-1 β** fueron similares cuando los leucocitos se incubaron con PCL, PLA, PA y PLGA. Los niveles obtenidos fueron superiores con PHB y ligeramente inferiores con SEDA (Figura 32 y tabla 7). Los valores que se obtuvieron de **IL-10** fueron similares en el

caso de PCL, PLA, PA y SEDA y ligeramente superiores en el caso del PHB e inferiores para la SEDA. Si nos fijamos en los valores de la IL-6 para el caso del PHB, se observó un aumento significativo de expresión comparado con los valores del resto de BM ($p < 0,05$ frente a PCL, SEDA, PLA, PA y PLGA).

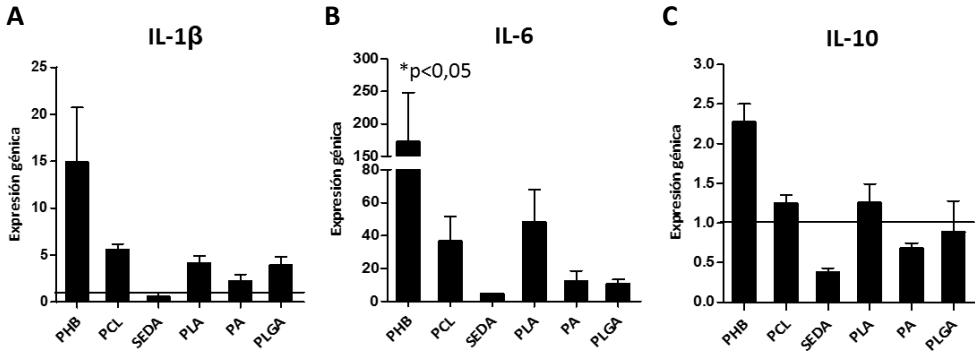


Figura 32. Cuantificación de los niveles de transcripción génica de IL-1 β, IL-6 y IL-10 en leucocitos incubados durante 5 h con los BM indicados. Los datos se expresan como el valor relativo sobre el control (valores normalizados representados como media ± SEM (standard error of the mean) de tres experimentos independientes; * $p < 0,05$).

	PHB	PCL	SEDA	PLA	PA	PLGA
IL-1β	14,93±5,80	5,61±0,57	0,61±0,37	4,18±0,73	2,27±0,64	3,95±0,87
IL-6	172,94±75,33	36,71±14,77	4,78±0,22	48,25±19,70	12,29±6,36	10,83±2,57
IL-10	2,27±0,225	1,25±0,15	0,38±0,04	1,26±0,29	0,68±0,06	0,88±0,39

Tabla 7. Niveles de expresión de genes de leucocitos después de 5 h de cultivo con diferentes BM. Los valores normalizados de IL1-β, IL-6 e IL-10 en leucocitos activados frente a no activados fueron calculados y expresados como media ± SEM de tres experimentos independientes de qPCR.

En concreto, el PHB indujo significativamente la expresión de IL-6 comparado con el resto de BM y fue ligeramente superior para la IL-1β y IL-10. Para los demás BM, los valores de expresión fueron similares en todas las IL. En general, los resultados revelan un patrón de expresión de citoquinas complejo que depende del tipo de BM.

2. Caracterización de la biocompatibilidad de los biomateriales a nivel cardíaco

Después de comprobar que los biomateriales seleccionados (Tabla 3) eran aptos para el cultivo de células (Apartado 1.2 de Resultados), se quiso confirmar si eran compatibles con células de tipo cardíaco y si éstas seguían vivas después de varios días en cultivo. También se realizaron estudios *in vivo* en los que se analizó su biocompatibilidad histopatológica, su capacidad angiogénica o su respuesta inflamatoria en un entorno cardíaco, entre otros ensayos.

Para los estudios descritos a continuación se utilizó una membrana de Colágeno (COL) como BM control.

2.1. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales *in vitro*

Debido a la estructura tridimensional de los BM (Figura 33), el conteaje de las células mediante microscopio tras marcaje con DAPI resulta poco preciso por lo que se empleó un ensayo de viabilidad celular (MTT).

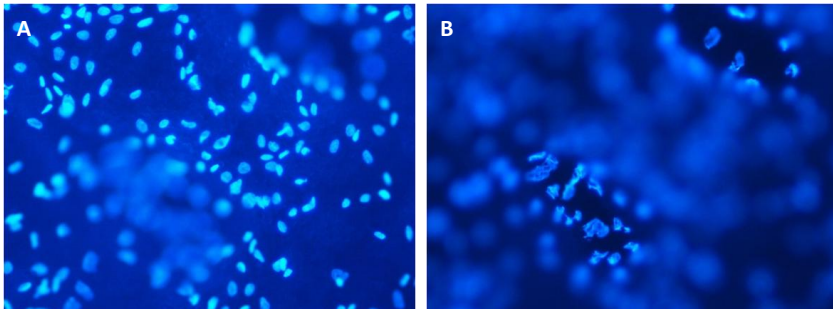


Figura 33: Células mesenquimales (MSC) de pulpa dentaria sembradas en el BM y marcadas nuclearmente con DAPI (azul). La imagen muestra dos planos de enfoque mostrando la tridimensionalidad de los BM. Imagen tomada con el objetivo 20x.

Para ello se sembraron fibroblastos cardíacos, células HL-1 y células de pulpa dentaria en los BM a una densidad de 4×10^4 células/cm² y se dejaron en cultivo durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se realizó el ensayo de viabilidad celular mediante MTT (Apartado 4.4.1 de Material y Métodos). Los valores de absorbancia observados mostraron una mayor viabilidad celular en el material PCL comparado con COL en los tres tipos de células (Figura 34). Los demás materiales se comportaron igual que la membrana control excepto la SEDA que

demostró un mayor crecimiento cuando se sembró con pulpa dentaria y el PA, que demostró un menor crecimiento cuando se sembró con las células HL-1. Estos resultados indican una buena biocompatibilidad de los biomateriales con células relacionadas con un entorno cardíaco y destaca de manera significativa una mayor proliferación celular para el caso del PCL. Por tanto, concluimos que el PCL es el BM que presenta los mejores valores para cada tipo celular.

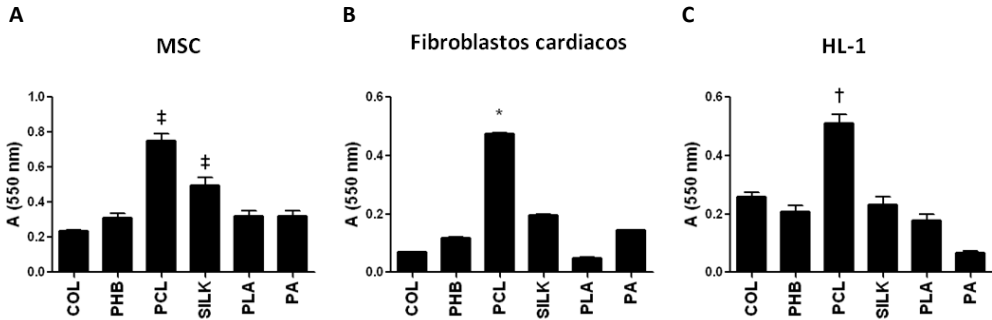


Figura 34. Proliferación de MSC de pulpa dentaria, fibroblastos cardíacos y células HL-1 en diferentes BM evaluada mediante el ensayo de MTT. La reacción colorimétrica se midió a 550 nm y se expresó como unidades arbitrarias. * $p < 0,05$, † $< 0,01$, ‡ $< 0,001$. Los resultados mostrados representan la media de tres experimentos independientes.

2.2. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales *in vivo*

Una vez implantado, el BM óptimo ha de incrementar la angiogénesis en el tejido en contacto, ha de ser degradado y no ha de provocar una fuerte reacción inflamatoria que desencadene el rechazo. Con este objetivo se evaluó la degradación de los materiales y se analizó mediante técnicas histológicas la respuesta a cuerpo extraño con respecto a la inflamación, reacción granulomatosa, congestión vascular, hemorragia y fibrosis epicárdica.

Para el análisis de la adhesión y reabsorción de los BM con el tejido cardíaco y su estudio histopatológico, se implantaron los seis tipos de biomateriales (COL, PHB, PCL, SEDA, PLA, PA) en el corazón de ratas sanas mediante dos puntos de sutura. Se trasplantaron 6 animales con cada tipo de membrana y para cada tiempo de estudio y se sacrificaron a las 2 y 8 semanas post-implante.

2.2.1. Análisis de la adhesión y reabsorción de los biomateriales en el corazón *in vivo*

El día del implante todos los BM mostraron una buena adhesión y se adaptaron a la anatomía del corazón. No obstante, aunque después de 8 semanas todos los BM se mostraron visibles (Figura 35), cada uno se comportó de manera diferente en términos de degradación.

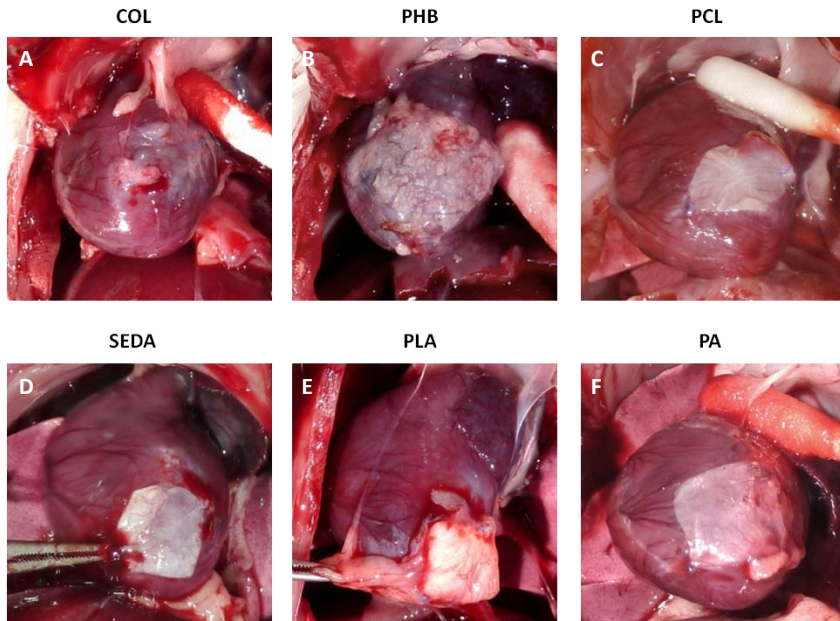


Figura 35. Examen macroscópico de los BM en la superficie epicárdica de ratas sanas, 8 semanas después de su implante.

El PCL, la PLA, la PA y la SEDA no presentaron ninguna degradación a nivel macroscópico y únicamente el PHB mostró una biodegradación similar al control, que también se observó histológicamente (Figura 36). Cabe destacar que el PLA además de no reabsorberse incrementó su volumen.

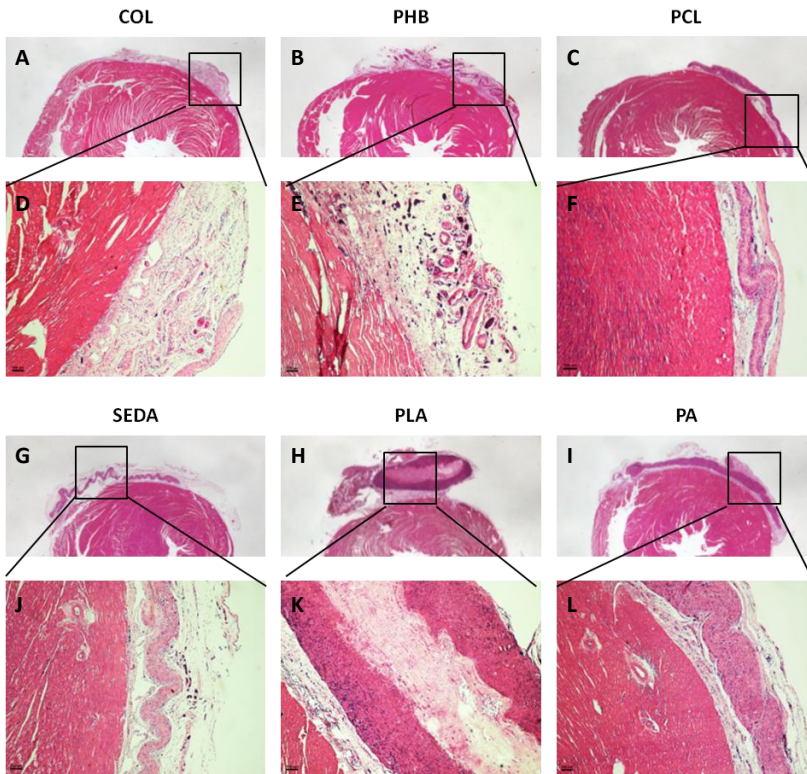


Figura 36. Corte transversal de tejido cardíaco teñido con H/E mostrando parches cardíacos 8 semanas después del implante. Recuadros D-F y J-L: imágenes del detalle de la región del BM tomadas con el objetivo de 40X.

Este ensayo destaca al PHB como el material más interesante en términos de degradación.

2.2.2. Análisis histopatológico de los biomateriales en corazón *in vivo*

Se realizó un estudio histopatológico en el que se analizó la respuesta a la presencia de cuerpo extraño. Se valoró la inflamación, la reacción granulomatosa, la congestión vascular, la presencia o no de hemorragia y fibrosis epicárdica.

Los resultados observados en el apartado anterior se correlacionan con el estudio histopatológico de los BM (Tabla 8) realizado 2 y 8 semanas tras su implante en el tejido cardíaco.

Factores evaluados	COL		PHB		PCL		SEDA		PLA		PA	
	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8
Integridad del BM	++	-	+	-	+	+	++	++	+	++	-	-
Reacción granulomatosa	+	-	+	-	++	++	+	+	+++	+++	+++	++
Infiltrados celulares inflamatorios	++	-	+	+	++	+	++	++	+	+	++	-
Congestión vascular	+	-	+++	++	-	++	+	++	++	++	-	-
Hemorragia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis epicárdica	-	-	+	-	++	-	+	-	-	-	-	-

Tabla 8. Análisis histopatológico de BM implantados en corazones de ratas sanas. Estudio realizado a las 2 y 8 semanas pos-trasplante. Según el grado de presencia del factor evaluador: (+++) elevada, (++) moderada, (+) leve, (-) no se detecta.

El PLA mostró un aumento de volumen poco después de su implantación en el tejido cardíaco y siguió aumentando a lo largo del período de tiempo analizado. Este fenómeno se acompañó de una elevada presencia de infiltrados celulares, compuesta predominantemente por células mononucleares, lo que responde a una respuesta de rechazo del biomaterial por parte del corazón. Por el contrario, el PCL, la SEDA y la PA fueron rápidamente encapsulados y degradados siguiendo un patrón de reacción a cuerpo extraño, con la acumulación de células gigantes multinucleadas. Esto indica que estos materiales no están siendo rechazados, pero necesitan más tiempo para la degradación y la resolución de la inflamación (Figura 37).

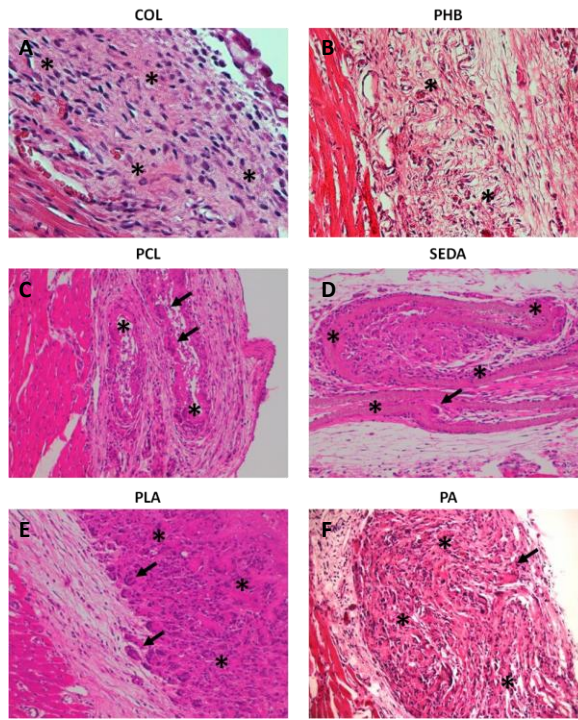


Figura 37. Tinción de H/E de las secciones de tejido cardíaco del corazón 2 semanas después del implante de los biomateriales. Los asteriscos (*) señalan las fibras de los BM. Las flechas apuntan a las células gigantes multinucleadas. Imágenes tomadas con el objetivo de 20x.

La histología del PHB revela un comportamiento similar al control (Figura 37). A las dos semanas de su implante no mostró apenas fragmentos de biomaterial ni células gigantes multinucleadas fagocíticas. Este fenómeno provocó una respuesta inflamatoria leve que se resolvió del todo a las 8 semanas, dando como conclusión la aceptación del PHB por el organismo.

2.2.3. Análisis de la respuesta inflamatoria de los biomateriales *in vivo*. Cuantificación de macrófagos con perfil M1 y M2

Dada la importancia de los macrófagos como moduladores de la cicatrización en zonas de lesión, se quiso analizar el perfil de polarización de los mismos en respuesta al implante de los biomateriales en corazones con y sin infarto. El

estudio se realizó utilizando 6 ratas por grupo experimental y condición y tuvo una duración de 2 semanas.

Para ello se cuantificaron los macrófagos con perfil M1 y M2 realizando una inmunofluorescencia doble positiva utilizando los marcadores de superficie CCR7/CD68 para la identificación de los macrófagos tipo M1 y CD163/CD68 para los macrófagos tipo M2. El estudio se realizó en la interfase entre el biomaterial y el tejido cardíaco (Figura 38). La inmunofluorescencia y su análisis fue realizada por la Dra. Beatriz Pelacho Samper y el Dr. Felipe Prósper Cardoso.

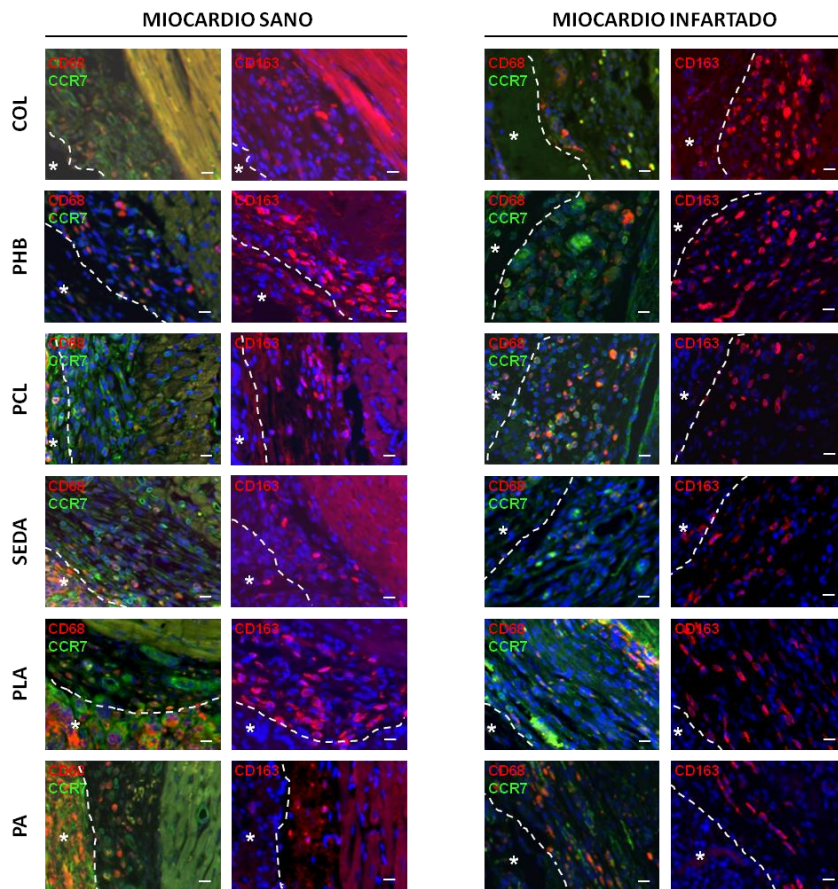


Figura 38. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para la identificación de los macrófagos con perfil M1 y M2 en corazones de ratas sanas e infartadas. Los marcadores de macrófagos CCR68+ se tiñeron de rojo y los marcadores de macrófagos M1 CCR7+ (verde) y M2 CD163+ en rojo. Los asteriscos (*) señalan los restos de BM. La línea discontinua de puntos indica la zona de estudio situada entre el BM y el tejido cardíaco. Barra de escala: 50 µm.

Tras el análisis cuantitativo de los macrófagos M1 y M2 en el tejido cardíaco de ratas sin infarto, se pudo observar que el implante de los biomateriales PCL, SEDA y PA desencadenó una respuesta pro-inflamatoria de tipo M1 y anti-inflamatoria de tipo M2 en los biomateriales COL, PHB y PLA. Con la excepción del polímero de seda, se encontró un patrón de polarización similar en el grupo de ratas infartadas (Figura 39).

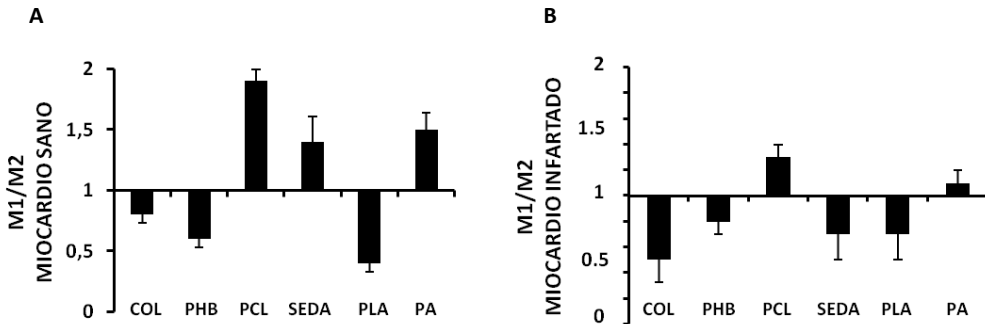


Figura 39. Representación del ratio de macrófagos M1/M2. Cuantificación de macrófagos M2 (CD163 + / CD68 +) y M1 (CCR7 + / CD68 +) presentes en la interfase entre el tejido cardíaco y el biomaterial 2 semanas después del implante en ratas con y sin infarto. (n=6 por grupo experimental y condición).

2.3. Estudio angiogénico de los biomateriales

Los biomateriales fueron evaluados según su capacidad para formar nuevos vasos (neovascularización). La finalidad fue identificar un biomaterial altamente angiogénico que ayude en la revascularización del tejido cardíaco tras un IAM. Para ello se implantaron los biomateriales en corazones de ratas con y sin infarto durante dos semanas. Después de este tiempo se cuantificó el nivel de angiogénesis en los biomateriales mediante el recuento de capilares y arteriolas marcados con un anticuerpo anti-caveolina (Figura 40).

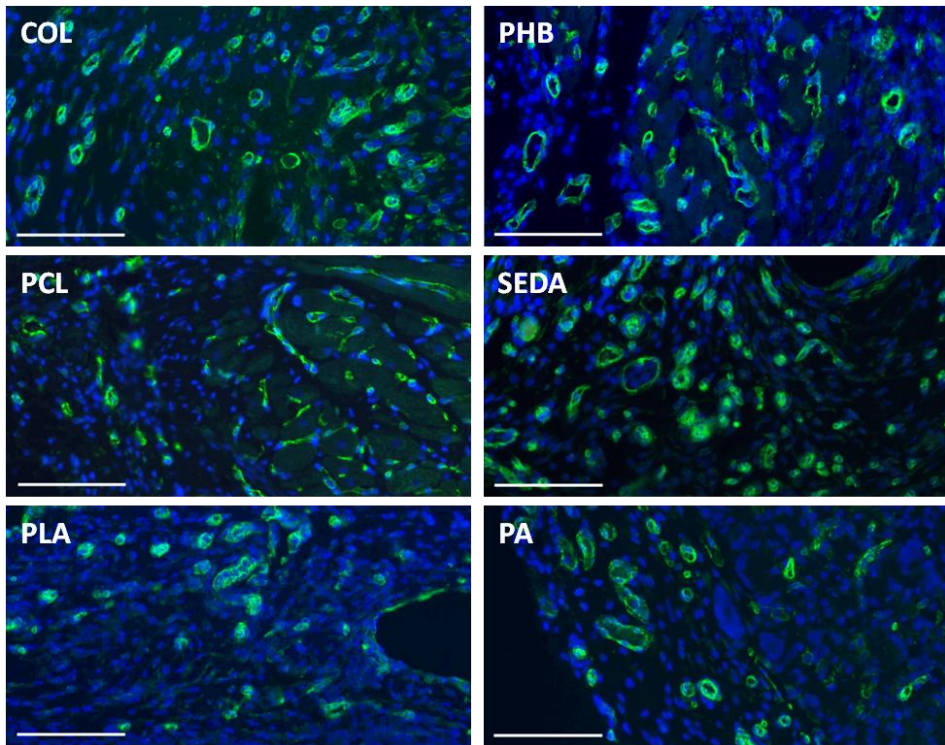


Figura 40. Imágenes de inmunofluorescencia marcando vasos sanguíneos en la zona del BM implantado en corazones sanos de rata. Los vasos se marcaron con un anticuerpo anti-caveolina-1 (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Imágenes tomadas con el objetivo de 20X. Barra de escala: 100 μ m.

El análisis de la angiogénesis en los biomateriales implantados en ratas sanas mostró una mayor densidad de vasos en el interior del PHB. Los valores obtenidos fueron $219,8 \pm 12,39$ vasos/ mm^2 para COL, $372,4 \pm 24,90$ para PHB, $275,2 \pm 10,63$ para PCL, $230,6 \pm 12,75$ para SEDA, $129,2 \pm 14,32$ para PLA y $131,1 \pm 9,52$ para PA; $P < 0,05$ para PHB frente a COL, PCL, SEDA, PLA y PA (Figura 4B). Y lo mismo ocurrió cuando los biomateriales fueron implantados en los corazones de ratas infartadas. Los valores obtenidos fueron $181,4 \pm 11,56$ vasos/ mm^2 para COL, $253,4 \pm 18,73$ para PHB, $194,8 \pm 17,11$ para PCL, $149,4 \pm 12,15$ para SEDA, $105,1 \pm 9,5$ para PLA y $166,0 \pm 12,95$ para PA; $P < 0,05$ para PHB frente a COL, PCL, SEDA, PLA y PA (Figura 41).

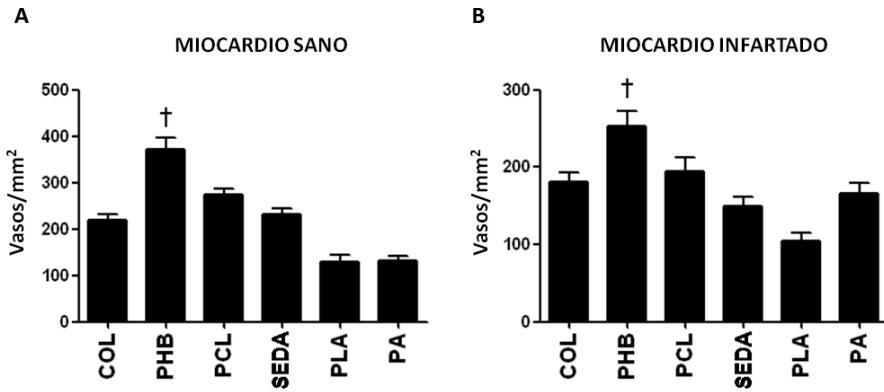


Figura 41. Cuantificación del número total de vasos en ratas sanas e infartadas 2 semanas después de su implante. $n = 6$ por grupo experimental y condición, † $p < 0,01$.

Por lo tanto, el PHB fue el biomaterial que mostró una capacidad angiogénica significativamente mayor que el resto de los BM tanto en el miocardio sano como infartado.

2.4. Estudio de la remodelación y la función cardíaca

Se quiso estudiar el efecto de los BM sobre el remodelado ventricular y la función cardíaca después de un IAM. Para la realización de este estudio se implantaron los BM en corazones de ratas con IAM durante dos semanas. El estudio se realizó con 6 ratas por grupo experimental.

El efecto de los BM sobre el remodelado ventricular se analizó mediante la medición del tamaño de infarto en los corazones. Para ello se obtuvo el porcentaje de tejido cicatricial en la zona infartada a partir de la histología (Figura 42).

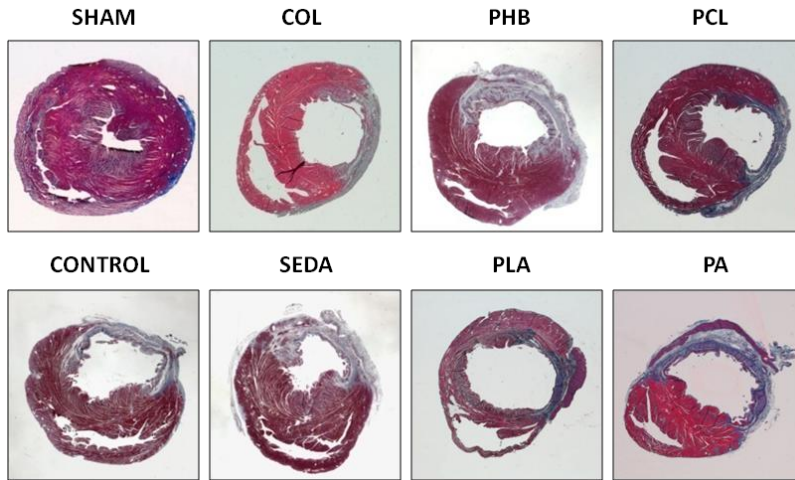


Figura 42. Tinción de Masson de secciones de corazón de ratas con IAM y biomaterial en el epicardio. Control: corazón con IAM sin BM.

El área fibrótica en el ventrículo izquierdo se calculó mediante la cuantificación de las secciones teñidas con tricrómico de Masson en cada grupo y se comparó con un grupo control de ratas infartadas sin BM. El porcentaje de tejido cicatricial fue $27,84 \pm 1,55\%$ en el grupo control, $16,93 \pm 1,80\%$ en el grupo COL, $17,47 \pm 2,26\%$ en el grupo PHB, $13,86 \pm 1,09\%$ en el grupo PCL, $19,14 \pm 1,27\%$ en el grupo de SEDA, $24,31 \pm 5,24\%$ en el grupo PLA y $22,39 \pm 4,11\%$ en el grupo PA ($p < 0,01$ en COL y PCL frente al grupo control; $p < 0,05$ en PHB frente al grupo control) (Figura 43).

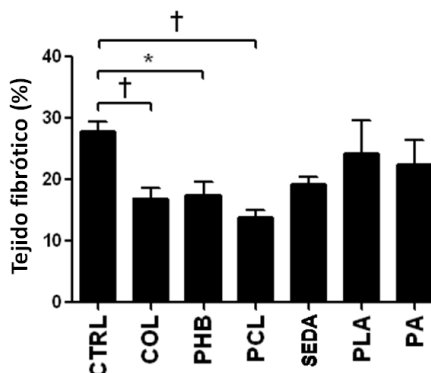


Figura 43. Porcentaje del tejido cicatricial de los corazones con IAM y BM. Se comparó con el grupo control de ratas infartadas sin BM (* $p < 0,05$ en PHB frente a control, † $p < 0,01$ en COL y PCL vs Control). (n=6 por grupo experimental).

Se observó una reducción significativa del tejido cicatricial y previno a su vez el remodelado negativo después del IAM cuando se implantó COL, PHB o PCL, pero no en los casos de los corazones con SEDA, PLA y PA.

Por otro lado, para comprobar si el implante de los biomateriales mejoraba la función cardíaca en los corazones infartados, se realizaron ecocardiografías antes de realizar el IAM y dos semanas después.

Los valores obtenidos para cada parámetro ecocardiográfico se encuentran representados en la figura 44.

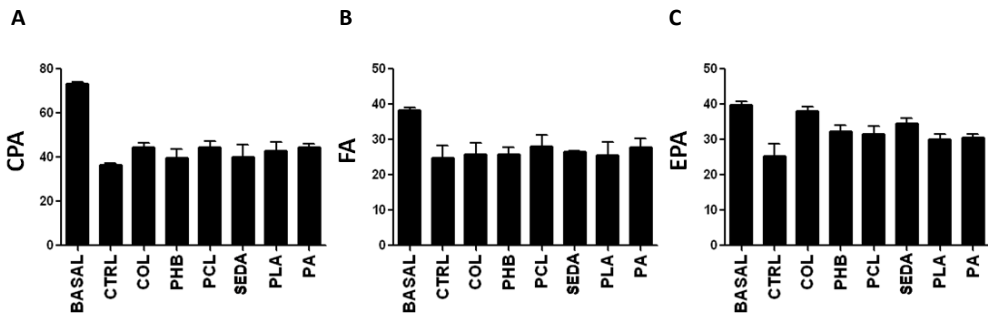


Figura 44. Medición de la función del ventrículo izquierdo en animales control y tratados. Se dan valores cuantificados en porcentaje del Cambio Porcentual de Área (CPA), Fracción de Acortamiento (FA) y Engrosamiento de la Pared Anterior (EPA), (n = 6 por grupo experimental).

Los parámetros de función cardíaca no mostraron una recuperación ni un perjuicio significativos de la función sistólica en los corazones que estuvieron en contacto con ninguno de los BM.

Por lo que la utilización de los BM estudiados no perjudica en el rendimiento cardíaco cuando éstos se aplican en el epicardio de corazones infartados.

3. Caracterización de los biomateriales a nivel dérmico

En vista de los buenos resultados obtenidos de los biomateriales PHB y PCL a nivel de biocompatibilidad y reparación cardiaca, se escogieron éstos para el posterior estudio en el campo de la regeneración dérmica. Además, se añadió el PLGA, un BM menos estudiado en el campo de regeneración dérmica.

Los BM fueron añadidos a los equivalentes dérmicos (ED) de origen humano generados *in vitro* y se realizaron estudios de viabilidad celular. A su vez, estos ED con los BM sirvieron de injertos cutáneos en ratones inmunodeprimidos y se estudió su capacidad angiogénica y respuesta inflamatoria.

Como control para los siguientes ensayos se eligió la membrana comercial Matriderm® (MD).

3.1. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales *in vitro*

La siembra de los biomateriales y el ensayo de viabilidad celular por cck-8 se realizaron de manera similar al análisis de biomateriales en entorno cardíaco. Se sembraron fibroblastos dérmicos y células endoteliales (HUVEC) en los BM a una densidad de 4×10^4 y 5×10^4 células/cm² respectivamente.

Los valores de absorbancia observados mostraron una viabilidad celular significativamente menor en PCL respecto al control. Sin embargo, el crecimiento celular fue similar entre MD, PHB y PLGA (Figura 45).

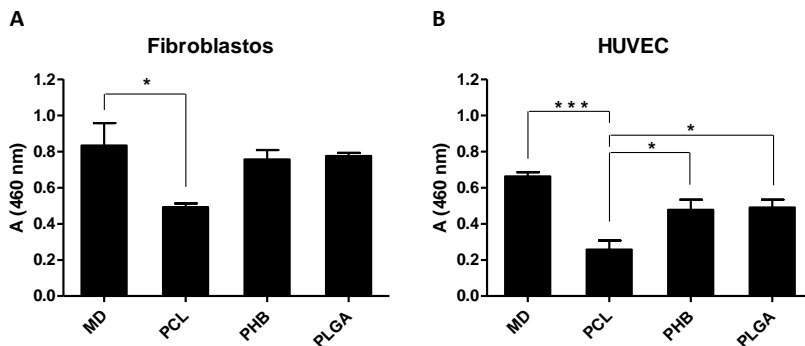


Figura 45. Proliferación de fibroblastos dérmicos humanos y células endoteliales humanas en BM evaluada mediante el ensayo de cck-8. Los resultados mostrados representan la media de tres experimentos independientes. * $P < 0,05$ en PCL vs PHB y PLGA.

Con estos resultados se comprobó la buena biocompatibilidad del PHB y PLGA.

3.2. Análisis de la biocompatibilidad de los biomateriales *in vivo*

Para el análisis de biocompatibilidad de los BM a nivel dérmico, se implantaron los BM a nivel subcutáneo en ratas sanas. Los animales se sacrificaron a las 2 semanas post-implante y se obtuvieron las muestras para su estudio histológico.

Se evaluó la degradación de los materiales y se analizó la respuesta a cuerpo extraño con respecto a la inflamación, reacción granulomatosa, congestión vascular, hemorragia y necrosis.

3.2.1. Análisis de la reabsorción y estudio histopatológico de los biomateriales implantados a nivel subdérmico en ratas sanas

Se evaluó el grado de reabsorción de los BM dos semanas tras el implante subdérmico. Todos los BM mostraron una buena adhesión en el momento de ser implantados. En el momento del sacrificio ninguno de los BM se mostró visible a nivel macroscópico. No obstante, a nivel microscópico sí se observaron diferencias (Figura 46).

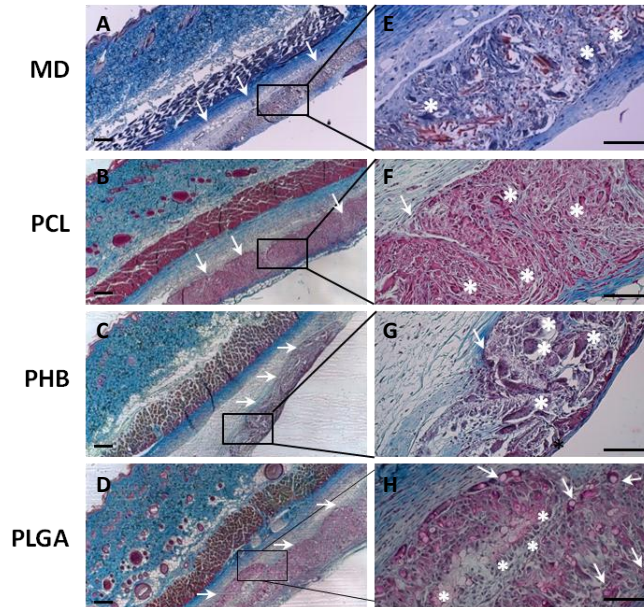


Figura 46. Corte transversal del tejido dermo-epidérmico teñido con tricrómico de Masson. Las flechas blancas apuntan a la zona donde está implantado el BM y los asteriscos blancos apuntan a las células multinucleares gigantes. Imágenes A-D tomadas con el objetivo de 4x y barra de escala de 100 μm . Recuadros E-H: imágenes del detalle de la región del BM tomadas a con el objetivo de 20X; barra de escala 100 μm . (n=4 por grupo experimental).

MD y PCL se mostraron en su mayoría intactos y sin apenas degradación. Destacó el encapsulamiento de las fibras de PCL haciendo evidente la necesidad de más tiempo para su degradación. Sin embargo, se observó una mayor reabsorción en el caso del PHB y el PLGA.

Posteriormente se realizó el estudio histopatológico de estos animales (Tabla 9).

Factores evaluados	MD	PCL	PHB	PLGA
Integridad del BM	+++	+++	+	+
Reacción granulomatosa	+++	++/+++	+++	+++
Infiltrados celulares inflamatorios	+++	++	++	++
Congestión vascular	-	-	+	+
Hemorragia	-	-	-	-
Necrosis	-	+	+	+

Tabla 9. Análisis histopatológico de los BM implantados subcutáneamente en ratas durante 2 semanas. Según el grado de presencia del factor evaluado: (+++) elevada, (++) moderada, (+) leve, (-) no se detecta.

El análisis mostró que todos los biomateriales indujeron una reacción granulomatosa a cuerpo extraño con abundantes células multinucleadas e infiltrado de células mononucleares, aunque la presencia de este último factor fue moderada para los velos de PCL, PHB y PLGA. En cuanto a la congestión vascular, fue particularmente evidente en los animales donde se les implantó el PHB y PLGA, indicando una buena angiogénesis en la zona de su implante. El implante subcutáneo de PCL, PHB y PLGA condujo a un ligero grado de necrosis presumiblemente debido a la remodelación activa, lo que se ha observado en otros estudios utilizando velos similares [226]. No se observó hemorragia inducida por la presencia de ninguno de los biomateriales.

3.2.2. Análisis de la respuesta inflamatoria de los biomateriales. Cuantificación de macrófagos con perfil M1 y M2

De la misma manera que se analizó el perfil inflamatorio de los macrófagos en el epicardio de corazones de rata con los biomateriales, se realizó también el estudio a nivel subdérmico. Esta vez el biomaterial se depositó a nivel subdérmico en 4 ratas por grupo experimental y se analizó el perfil de polarización de los macrófagos infiltrados a los 14 días después de su implante.

Se realizó una inmunofluorescencia donde se identificaron a los macrófagos tipo M1 caracterizados por tinción inmuno-histoquímica doble positiva para CCR7 / CD68, y macrófagos de tipo M2 caracterizados por tinción con CD206 / CD68. El estudio se realizó en la zona del tejido dérmico en contacto con el biomaterial (Figura 47). La inmunofluorescencia y su análisis fue realizada por la Dra. Beatriz Pelacho Samper y el Dr. Felipe Prósper Cardoso.

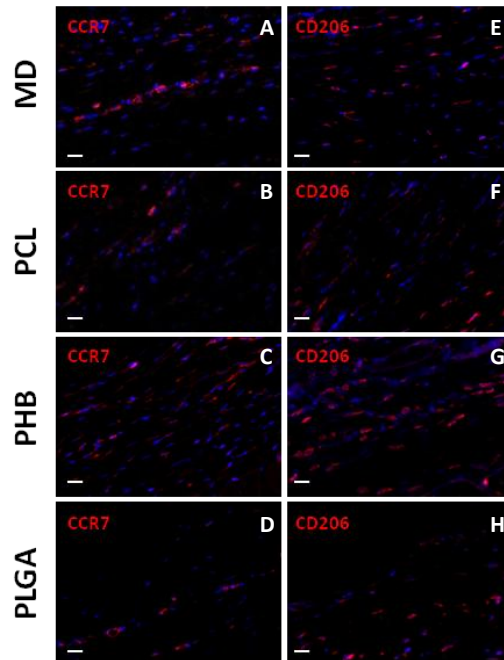


Figura 47. Imágenes representativas a los 14 días de la inmunofluorescencia de tejido dérmico para la identificación de los macrófagos con perfil M1 y M2. Teñidos en rojo para CCR7 (macrófagos M1) y CD206 (macrófagos M2) y en verde para el marcador de macrófagos CD68. Los núcleos se tiñeron en azul con DAPI. Barra de escala: 50 μ m. (n=4 por grupo experimental).

Tras el análisis cuantitativo de los macrófagos M1 y M2 en el tejido dérmico de ratas (Figura 48), se pudo observar que el implante de los biomateriales MD desencadenó una respuesta pro-inflamatoria de tipo M1 y anti-inflamatoria de tipo M2 en el resto de los biomateriales PCL, PHB y PLGA. Así pues, la relación M1 / M2 fue de $1,95 \pm 0,07$ en MD, $0,57 \pm 0,28$ en PCL, $0,82 \pm 0,14$ en PHB y $1,04 \pm 0,28$ en PLGA a los 14 días. Estos datos indican que los BM estudiados inducen un remodelado constructivo *in vivo*.

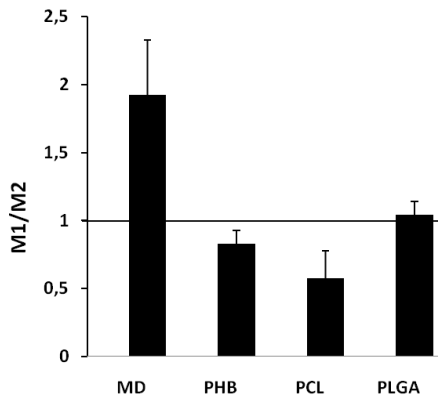


Figura 48: Estudio en el tiempo de la modulación del perfil inflamatorio M1 /M2 después del implante de biomateriales a nivel subdérmico en ratas. Cuantificación de los macrófagos M1 y M2 14 días tras el implante. (n=4 por grupo experimental).

3.3. Estudio de los equivalentes dérmicos con biomaterial en su base

Los equivalentes dérmicos (ED) fueron obtenidos tal y como se detalla en el apartado 3.2 de Material y Métodos. Así pues, el ED se compone de una capa de queratinocitos sobre un gel de fibrina donde se encuentran los fibroblastos integrados en su interior (Figura 49).

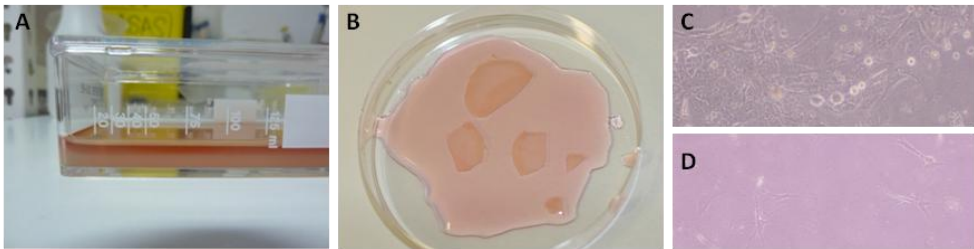


Figura 49. Imagen de un ED. **A.** Placa de cultivo con el equivalente dérmico en su interior. Se puede observar en amarillo la fibrina y en rojo el medio de cultivo con el que se nutre. **B.** Equivalentes dérmicos en flotación en medio de cultivo. **C.** Capa de queratinocitos sembrados encima de la fibrina. **D.** Fibroblastos embebidos en la matriz de fibrina.

A partir de este concepto se prepararon los ED donde se le añadió un BM en su base (Figura 50).

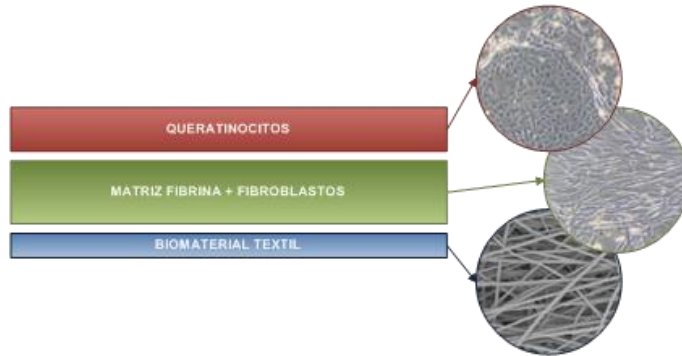


Figura 50. Esquema de un equivalente dérmico con un biomaterial de base.

A continuación, se evalúan los ED en función de la formación de sus capas dermo-epidérmicas, su resistencia y su flexibilidad dependiendo del tipo de BM depositado en su base.

3.3.1. Generación de un equivalente dérmico con propiedades mecánicas

Se obtuvo un ED con un BM en su base. La observación de su histología desveló una estructura de tres capas bien diferenciadas, capa de queratinocitos (simulando la epidermis), capa tridimensional de fibroblastos (simulando la dermis) y el biomaterial (Figura 51).

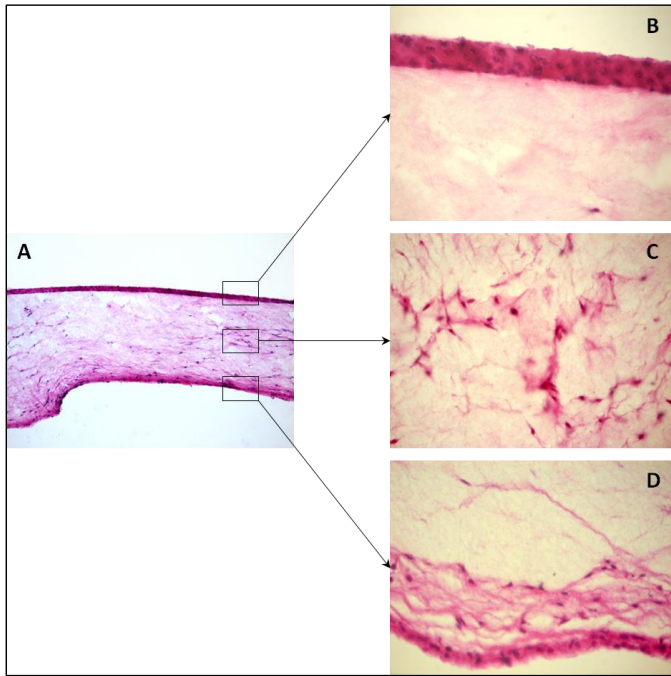


Figura 51. Evaluación histológica mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina de cortes de 10 μm del ED. A. Imagen en la que se muestran las tres capas del ED con BM. Tomada con el objetivo 4x. **B.** Imagen de la capa de queratinocitos **C.** Matriz de fibrina con fibroblastos **D.** Biomaterial PLGA con fibroblastos. Las imágenes B, C y D fueron tomadas con el objetivo de 40 x.

Se fabricaron ED con los diferentes BM estudiados depositados en su base y se manipularon.

Los ED que no llevaban BM en su estructura fueron más vulnerables en cuanto a su manipulación e integridad física. Además, al ser despegados de la base de la placa de cultivo redujeron notablemente su área (Figura 52A). Sin embargo, los ED fabricados con BM en su base fueron fácilmente despegados de la placa, conservaron toda su superficie y se manipularon con facilidad sin que perdieran su estructura física (Figura 52B y C).



Figura 52. Imágenes manipulando el ED con y sin BM. A) Imagen del equivalente dérmico sin biomaterial. B) ED con PLGA en su base. C) Imagen del manejo del ED con PLGA.

Todos los BM estudiados, PCL, PHB y PLGA, permitieron una mejor manipulación del ED sin que éste perdiera su estructura física ya que les aportó resistencia y flexibilidad. Con ello se demostró que la utilización de un BM integrado en el ED preserva la superficie del cultivo después de ser retirado de la placa y le confiere unas propiedades mecánicas adecuadas para su manipulación.

3.3.2. Evaluación de los equivalentes dérmicos con biomaterial en su base

Para evaluar la viabilidad de los ED con y sin BM, así como el nivel de organización a la hora de formar la estructura dermo-epidérmica, los ED se analizaron histológicamente (Figura 53).

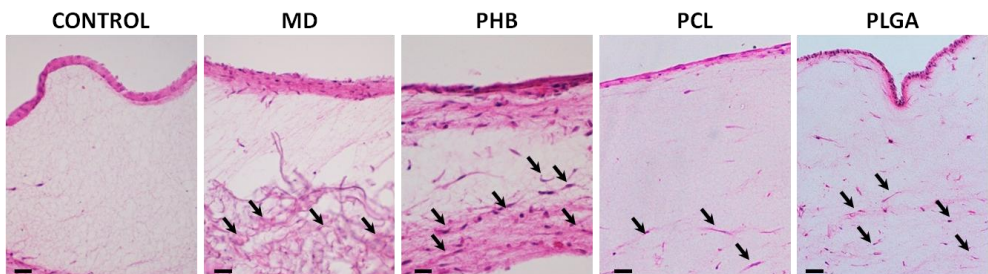


Figura 53. Tinción de Hematoxilina/Eosina de los ED cultivados durante 10 días con y sin BM en su base. Las flechas negras apuntan a los fibroblastos integrados en la fibrina y en las fibras de los BM. Imágenes tomadas con el objetivo 10x. Barra de escala: 50 μ m. (n=5 ED por BM).

Se observó que los equivalentes dérmicos control (sin BM), con MD, con PHB y con PLGA permitieron un crecimiento óptimo de los fibroblastos en la capa dérmica del equivalente además de observarse una correcta estratificación en sus capas (epidermis y dermis) (Figura 53). También se observó que en los equivalentes con MD y PHB la dermis estaba más invadida de fibroblastos, lo que le confería más consistencia y rigidez. Por el contrario, los ED cultivados con el PCL en su base mostraron una estructura en las capas de queratinocitos y fibroblastos distorsionada. Debido a esto, el PCL se excluyó de los análisis siguientes.

3.4. Evaluación de los equivalentes dérmicos injertados en ratones inmunodeprimidos

Después de obtener los ED *in vitro* (Apartado 3.2 de Material y Métodos) se implantaron en la región dorsal de ratones inmunodeprimidos (Apartado 5.2.6 de Material y Métodos). Ver Anexo 3 para visualizar un resumen gráfico del procedimiento general.

Se realizó un seguimiento de los injertos en los ratones durante la duración del experimento. Posteriormente, mediante el estudio histológico se analizó la viabilidad de los injertos, la calidad de la piel generada y la generación de vasos sanguíneos debida a los BM y se caracterizó a nivel celular para comprobar su origen humano.

Para ello se implantaron ED con y sin BM a cinco ratones inmunodeprimidos por grupo experimental y se estudió su histología dos y cuatro semanas tras su cirugía.

3.4.1. Evaluación macroscópica

Se obtuvieron imágenes de los injertos a las 2 y 4 semanas post-injerto (Figura 54). A las dos semanas se pudo observar que en la mayoría de los animales los injertos permanecían cubiertos todavía con la piel desnaturalizada autóloga. A las cuatro semanas post-injerto esta piel se desprendió y quedó al descubierto el injerto de piel humano pudiendo así realizar un análisis preliminar.

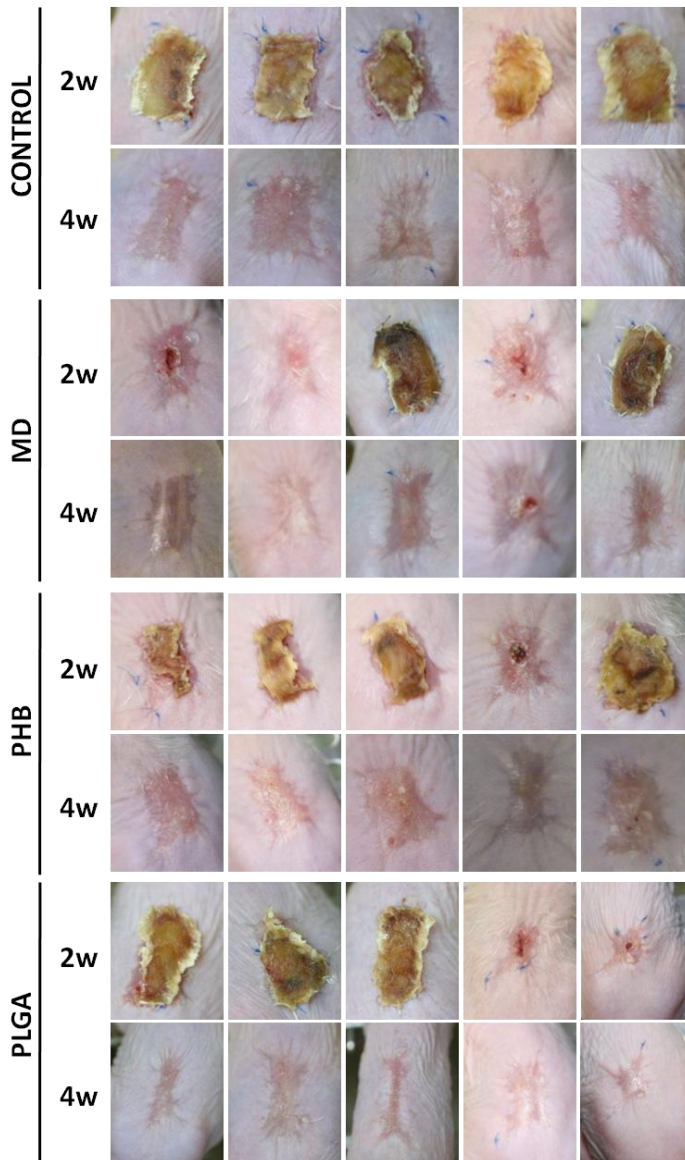


Figura 54. *Imágenes macroscópicas del área injertada dos y cuatro semanas post-implante de ED humano con BM. Los animales con ED pero sin BM se usaron como control.*

Todos los animales mostraron un buen injerto del ED y no se observaron diferencias macroscópicas entre los grupos.

3.4.2. Evaluación microscópica

Para evaluar más profundamente la calidad de los injertos se analizó su histología. Mediante la tinción de H/E y tricrómico de Masson se identificaron las capas del injerto y se cuantificó la calidad de la piel nueva generada. También se realizó inmunohistoquímica para la detección de estructuras más precisas como la lámina basal y para la identificación de queratinocitos humanos.

Las diferencias entre la piel del ratón y la zona de injerto fueron claramente visibles con la tinción H/E (Figura 55). En la piel de ratón se observa la presencia de folículos pilosos y abundantes glándulas sebáceas mientras que en la zona de injerto no aparecen estas estructuras y el número de papilas epidérmicas también es más bajo en comparación con las áreas no injertadas.

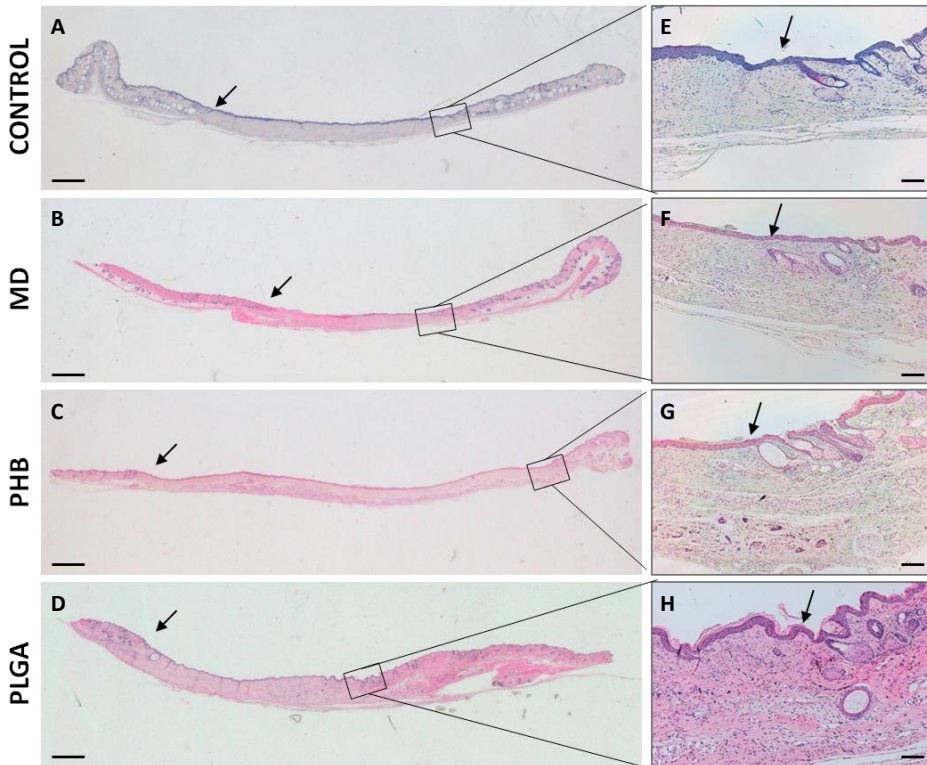


Figura 55. Tinción de HE de los cortes histológicos de los injertos en ratones. Las flechas indican los límites entre el injerto de piel humana cultivada in vitro y la piel del ratón. CONTROL: ratones con injerto de ED sin biomaterial. A-D. Imágenes tomadas con lupa LEICA DMD108, barra de escala 1mm. E-H. Imágenes tomadas con el objetivo 10x, barra de escala de 100 μ m.

Con la tinción de H/E se observó que los biomateriales MD y PHB aún estaban presentes (flechas en negro en la Figura 56) y en pleno proceso de biodegradación, como lo demuestra la presencia de células granulomatosas. Sin embargo, no había casi restos de BM ni presencia de células granulomatosas en el caso del PLGA. Además, en la zona epidérmica de los injertos con PLGA se empezaba a ver la formación de las crestas dermo-epidérmicas propia de una piel más madura.

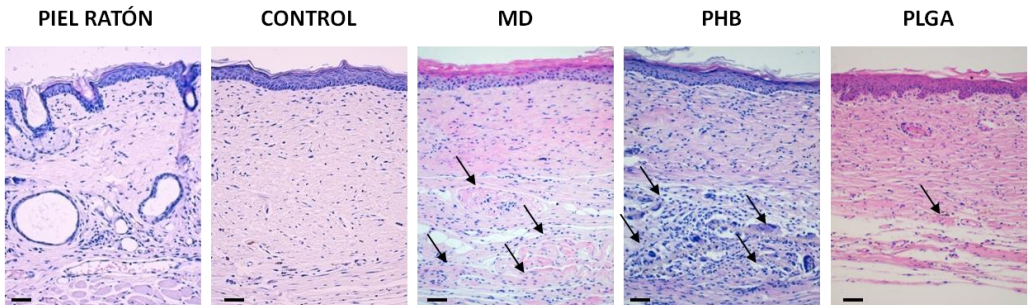


Figura 56. Tinción de H/E del ED injertado durante cuatro semanas, con o sin BM, en la región dorsal de ratones NOD/SCID. Imágenes tomadas con objetivo 10x. Barra de escala: 50 μm .

También se midió el grosor de la epidermis. Ésta fue de $27,78 \pm 9,37 \mu\text{m}$ en los animales implantados con MD, de $46,55 \pm 18,80 \mu\text{m}$ en los animales implantados con PHB y de $26,35 \pm 10,40 \mu\text{m}$ en los animales con PLGA, lo cual es comparable al espesor de $30 \mu\text{m}$ medido en la piel de ratón sana.

Con la tinción del Tricómico de Masson (Figura 57) se observó la orientación de las fibras de colágeno en la dermis de los ratones con injerto de piel con y sin biomaterial y se calculó su alineación mediante la transformada de Fourier.

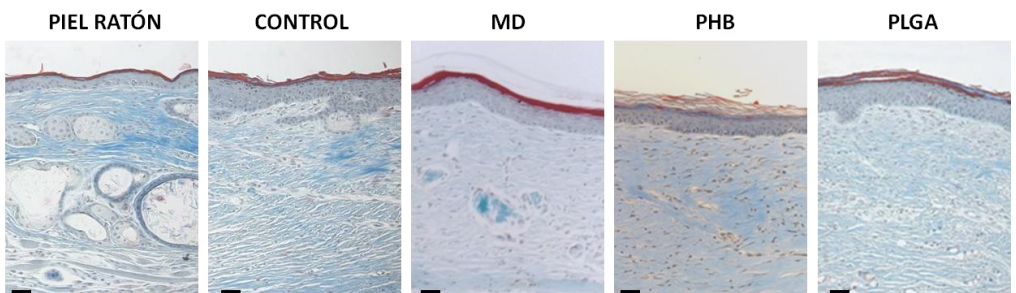


Figura 57. Tricómico de Masson del ED injertado en la región dorsal de ratones NOD/SCID. Imágenes tomadas con objetivo 10x. Barra de escala: 50 μm .

RESULTADOS

Los cálculos dieron unos valores de $0,68 \pm 0,13$ en los animales control (ED injertado sin biomaterial), $0,57 \pm 0,04$ en los animales con MD, $0,66 \pm 0,17$ en los animales con PHB y $0,68 \pm 0,1$ en los animales con PLGA, lo que indicó que no había cicatrices o alineación fibrótica de fibras de colágeno después de la implantación de los biomateriales.

Mediante inmunofluorescencia usando anti-citoqueratina 5 (CK5) se marcaron los queratinocitos humanos de la capa basal y de las capas más próximas a ésta (Figura 58). Además, se identificaron los queratinocitos humanos de las capas más queratinizadas (las más externas) mediante inmunofluorescencia con anti-involucrina. Se observaron queratinocitos humanos marcados en todos los injertos humanos y no se vio tal marca en la piel de ratón, asegurando de esta manera el injerto humano en los ratones.

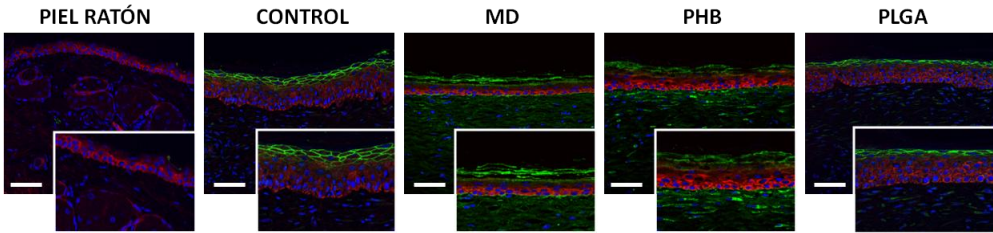


Figura 58. Inmunofluorescencia doble de involucrina/citoqueratina 5 del ED injertado en la región dorsal de ratones NOD/SCID. CK5 en rojo; involucrina en verde. Imágenes tomadas con objetivo 40x. Barra de escala: 50 μ m.

Mediante inmunohistoquímica con anti-laminina se detectó en todos los ratones la lámina basal (Figura 59). Con ello se verificó la buena adhesión dermo-epidérmica conseguida de los injertos humanos realizados *in vitro* y, por lo tanto, el sostén del epitelio.

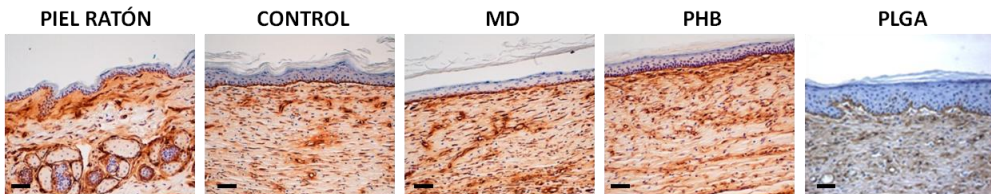


Figura 59. Inmunohistoquímica anti-laminina del ED injertado durante cuatro semanas, con o sin BM, en la región dorsal de ratones NOD/SCID. Imágenes tomadas con objetivo 10x. Barra de escala: 50 μ m.

Para un mejor análisis de la zona de unión entre la epidermis y la dermis de los injertos de piel, se realizaron cortes ultrafinos y se analizaron por microscopía electrónica (Figura 60).

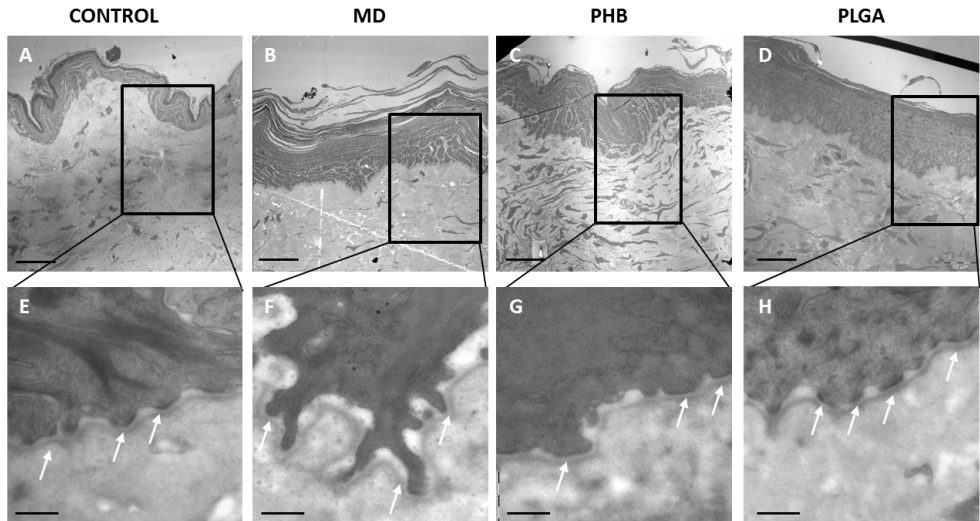


Figura 60. *Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de secciones ultradelgadas correspondientes a injertos de piel humana. Las flechas blancas apuntan a hemidesmosomas en la lámina basal. La barra de escala en A-D es de 20 μm y en E-H de 500 nm.*

Se identificaron las uniones hemidesmosomas en el sitio de la lámina basal y no hubo diferencias entre los grupos (Figuras 60 E-H). La presencia de una lámina basal y la existencia de las uniones celulares validó el modelo de injerto de ED en ratón y confirmó la buena sujeción entre la dermis y la epidermis.

3.4.3. Estudio de la viabilidad del injerto del equivalente dérmico con biomaterial. Proliferación de queratinocitos

Con el fin de determinar la viabilidad del injerto hasta el fin del experimento, se quiso medir la proliferación epidérmica de queratinocitos *in vivo* mediante la incorporación de BrdU en células en proliferación. Para ello una hora antes de su sacrificio se inyectó una solución de BrdU (1mg/ml) a los ratones injertados.

Tras la realización de la inmunohistoquímica con anti-BrdU en las muestras histológicas extraídas de los injertos (Figura 61), se procedió al conteo de las células BrdU positivas localizadas en la capa basal, caracterizada por su capacidad proliferativa.

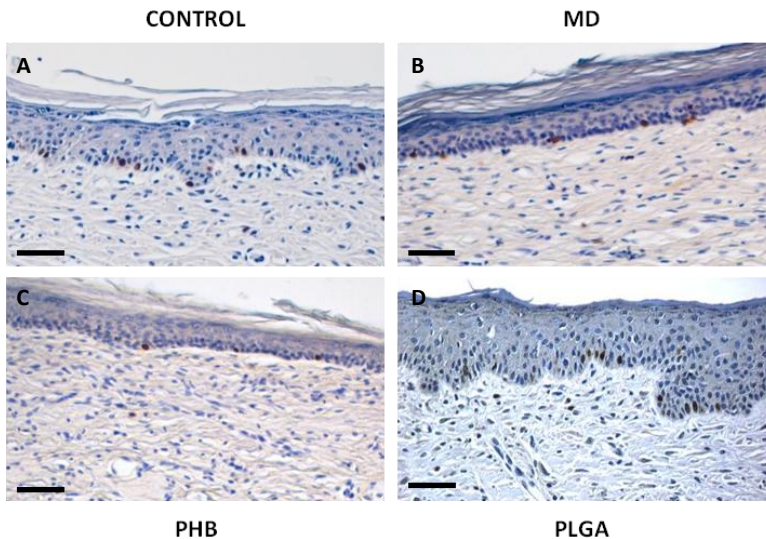


Figura 61. Proliferación de queratinocitos epidérmicos en los injertos de piel humanos con o sin biomateriales, 4 semanas después de su implante en los ratones. Imágenes representativas de la incorporación de BrdU en queratinocitos en proliferación en la capa basal de la epidermis del injerto humano (objetivo de 20x). Barra de escala: 50 μ m.

Tras el recuento, no se observaron diferencias entre los grupos. El porcentaje de células positivas para BrdU se calculó como $13 \pm 1,95\%$ en control, $12,18 \pm 2,04\%$ en grupo MD, $11,39 \pm 0,74\%$ en grupo PHB y $12,38 \pm 4\%$ en grupo PHB (Figura 62), lo que indica ausencia de neoplasia después de los injertos de los ED con los biomateriales.

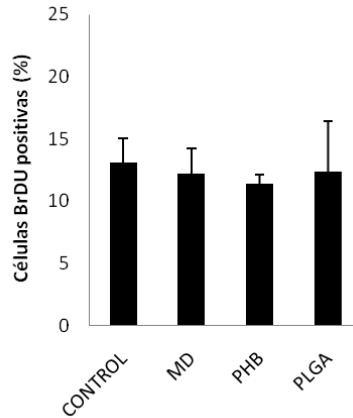


Figura 62. Cuantificación de células BrdU+ en cada grupo expresada como porcentaje de células positivas respecto del total. (n=5 por grupo experimental).

3.4.4. Estudio angiogénico del injerto del equivalente dérmico con biomaterial

El estudio angiogénico se realizó mediante la cuantificación de los vasos sanguíneos en la dermis de los ED con y sin biomateriales un mes después de su injerto en los ratones. Para la detección de los vasos se realizó inmunofluorescencia con anti-CD31 (Figura 62).

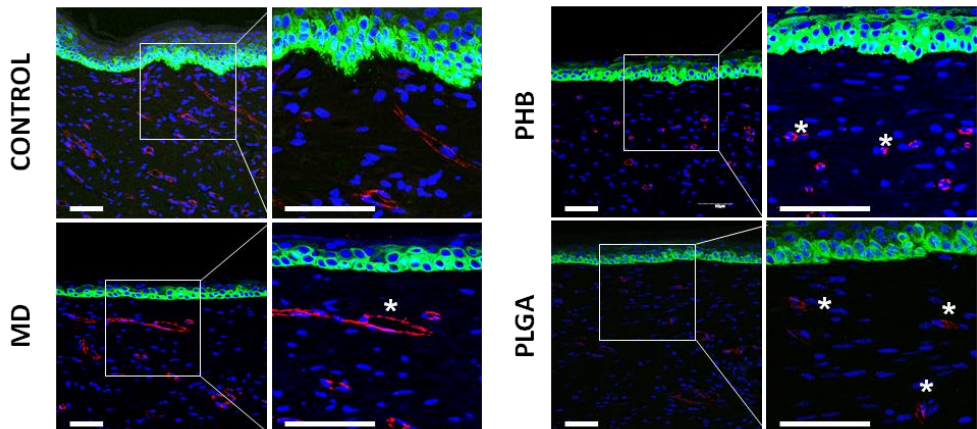


Figura 63: Imágenes representativas de la inmunofluorescencia con anti-CD31 para la detección de los vasos sanguíneos en la dermis del injerto de piel humana en ratones NOD/SCID. Los vasos CD 31 + se muestran en rojo (asteriscos blancos). Los queratinocitos en la epidermis se marcaron con citoqueratina 5 (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Las imágenes se tomaron con un objetivo de 40 ×. Barra de escala: 50 μm.

El recuento de los vasos sanguíneos mostró una densidad significativamente superior en los implantes de PHB y PLGA sobre los injertos de los grupo control y MD (Figura 64), indicando una mayor angiogénesis en los ED injertados con el PHB y PLGA.

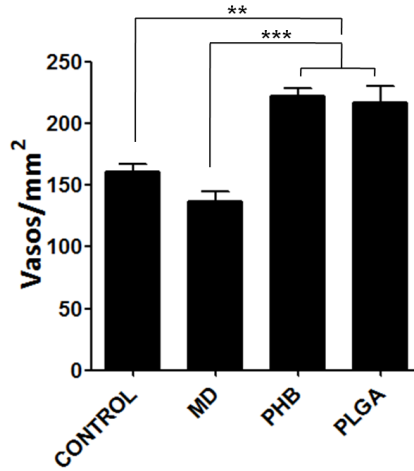


Figura 64: Cuantificación de los vasos sanguíneos en la dermis del injerto cuatro semanas después de su implante. (n = 5 en cada grupo, *** p < 0,001).

DISCUSIÓN

No existe el biomaterial ideal y no se trata de descartar o desechar los no válidos, se trata de caracterizar bien los biomateriales y conocer sus limitaciones y propiedades. Es posible que un biomaterial no sea válido para un posible uso en el que previamente se había pensado, pero puede ser muy útil en otro ambiente o para otra aplicación. En ocasiones, que un biomaterial se degrade en un corto espacio de tiempo puede resultar beneficioso. Es el caso de los polímeros biodegradables sintéticos o naturales utilizados para la síntesis de suturas reabsorbibles [227]. Sin embargo, para la utilización de materiales con aplicación en prótesis esta propiedad no será la mejor ya que se pretende que el biomaterial y la prestación que aporta dure lo máximo posible. Es el caso de los metales, usados para la fabricación de las prótesis metálicas, pilar principal de los ortopedistas, traumatólogos o dentistas [228]. Por ello se puede decir que hay tantos tipos de biomateriales como necesidades se consideren.

En el tema que nos ocupa, nos beneficia que los biomateriales sean degradables en un corto espacio de tiempo, compatibles a nivel celular y con una baja inmunorreactividad. El objetivo de este trabajo ha sido encontrar un biomaterial que, a través de su estructura, composición y naturaleza, permita establecer un equilibrio entre estos parámetros.

Hemos querido identificar soportes que sirvan para: cultivar células y facilitar el transporte celular hasta la región dañada; evitar o disminuir el remodelado ventricular que termina conduciendo a insuficiencias cardíacas y elaborar un equivalente dérmico que facilite su manejo y proporcione un alto porcentaje de supervivencia del injerto en el lecho del paciente. La evaluación de los biomateriales en este trabajo se ha enfocado hacia su aplicación en dos tipos de afecciones, la patología cardíaca isquémica y la abrasión cutánea centrada en pacientes con una gran área de superficie corporal quemada. Ambas afecciones persiguen reparar, reconstruir o regenerar tejido dañado para que vuelva a ser funcional. Aunque son dos campos de estudio diferentes, para ambas la ingeniería tisular se presenta como una alternativa terapéutica.

1. Los biomateriales y su compatibilidad a nivel celular

En un empeño por identificar materiales que cumplan con alguno de los criterios citados, se eligieron cinco materiales de uso común y que pueden sintetizarse en el campo científico como son el PCL, PLA, PA, SEDA y PLGA, y uno menos estudiado el PHB [229, 230]. Más concretamente se analizó la compatibilidad celular de los biomateriales cuando estaban en contacto con las células de interés, la capacidad angiogénica, la biodegradación en el entorno de aplicación y la modulación de la respuesta inmune a huésped entre otros parámetros.

En primer lugar, se realizaron unas pruebas preliminares a todos los biomateriales (BM), con la finalidad de seleccionar los más idóneos de cada tipo y que sirvieran de prototipo para cumplir con el objetivo del estudio. En este primer cribado se descartaron los biomateriales poco consistentes o quebradizos, ya que se buscaban biomateriales resistentes que pudieran soportar el movimiento del corazón, ser susceptibles de procesos quirúrgicos o ser manipulables. También se descartaron los biomateriales que mostraban un comportamiento hidrofóbico, ya que debían integrarse en un entorno fisiológico y celular. A los biomateriales que mostraban este comportamiento no se les había realizado el tratamiento de modificación de la superficie de las nanofibras mediante plasma a baja presión de N₂. Este tratamiento confiere la propiedad de hidrofiliidad a los materiales, propiedad óptima para que el medio de cultivo penetre bien en el material y proporcione alimento a las células. También las células aparecían muertas pocas horas después de ser sembradas sobre algunos biomateriales. Coincidió que a los biomateriales que mostraron este comportamiento no se les había realizado el tratamiento de lavados sucesivos posterior a su fabricación. Todos estos hechos evidenciaron la importancia de realizar ambos tratamientos al finalizar la fabricación de biomateriales con fines biológicos. Con dichos tratamientos se consiguió eliminar la toxicidad de los biomateriales producida por los solventes utilizados en el proceso de fabricación y se aumentó la hidrofiliidad de los mismos.

Con estas pruebas preliminares, se establecieron los parámetros de fabricación de los biomateriales que iban a ser usados a lo largo de toda la investigación (Tabla 3).

Se comprobó la buena biocompatibilidad de los BM con las células ya que éstas mostraron una buena adhesión y proliferación cuando fueron sembradas sobre los BM. Esto se observó cuando los BM se sembraron con MSC-GFP y se tomaron imágenes de fluorescencia del crecimiento de las células a diferentes tiempos. Las células no solo permanecieron en los biomateriales 24 horas después de su siembra, sino que también fueron capaces de proliferar y expandirse por el biomaterial a través de sus fibras durante el tiempo que duró el ensayo. Curiosamente, el marcaje de los núcleos con DAPI reveló una distribución celular diferente según el BM del que se tratara. La distribución celular en los biomateriales PCL, PLA, PLGA y PA fue homogénea y abarcó toda la superficie del BM. Sin embargo, en el caso de la SEDA y el PHB la distribución fue diferente, creciendo las células formando agrupaciones celulares para el primero o permaneciendo estáticas en lugar exacto de siembra en el caso del segundo. Las diferencias en la composición, el diámetro de las fibras o la disposición de éstas en los diversos tipos de biomateriales pudieron influir en la diferente expansión de las células en los biomateriales. El hecho de que las células permanecieran inmóviles creciendo en el centro del PHB podría suponer una característica ventajosa sobre los demás en cuanto a cumplir los requisitos de seguridad en los protocolos clínicos.

Un reto importante para la aplicación de BM para la cirugía reparadora es conocer la reacción a cuerpo extraño de los tejidos cuando están en contacto con el BM o sus productos de degradación. La activación de los linfocitos Th1 produce citoquinas inflamatorias, como IL-2, TNF- α e IFN- γ , mientras que los linfocitos Th2 producen citoquinas IL-4, IL-6 e IL-10, asociadas a una respuesta anti-inflamatoria e involucradas en la resolución de la inflamación y la curación de tejidos [231]. Varios estudios han optado por el uso de BM anti-inflamatorios para eludir las reacciones negativas del cuerpo a agentes extraños [232]. Por esta razón, la identificación de BM que minimicen esta reacción adversa es de gran interés para la ingeniería de tejidos.

Con objeto de identificar el perfil inflamatorio de los BM estudiados, se pusieron en contacto con leucocitos durante un tiempo para después analizar la activación de interleuquinas pro y anti-inflamatorias. Los resultados mostraron que el PHB indujo la expresión de la IL-6 e IL-10 en leucocitos, lo que nos sugiere una respuesta Th2 y una mayor probabilidad de aceptación del BM por parte del tejido implantado [232].

Una vez seleccionados y caracterizados los biomateriales que presentaban las propiedades idóneas para la finalidad del estudio (fácil manejabilidad, resistencia, carácter hidrofílico y biocompatibilidad), se sometieron a pruebas más específicas tanto *in vitro* como *in vivo* dirigidas al entorno donde iban a ser implantados, tejido cardíaco y dérmico.

2. Los biomateriales y su biocompatibilidad con el tejido cardíaco

La bioingeniería de tejidos en el campo de la regeneración cardiaca ha progresado de una manera exponencial llegando a ser una investigación de naturaleza multidisciplinar y cuyo objetivo es solucionar los problemas que ocurren tras un infarto de miocardio alargando así la vida del paciente [233].

Una de las líneas de investigación abiertas para solventar tal problema ha sido la terapia celular. Aunque se han demostrado sus efectos beneficiosos [234, 235], presenta una serie de limitaciones como es el bajo grado de injerto celular y la baja supervivencia, haciendo que disminuya su efectividad. Uno de los factores a tener en cuenta para el éxito del trasplante celular es el procedimiento utilizado, entre los que destaca la inyección intramiocárdica. Sin embargo, se ha comprobado que la inyección intramiocárdica no solo hace que el número de células trasplantadas tenga que ser mayor para ejercer el efecto beneficioso esperado, sino que no asegura que las células permanezcan en el sitio diana, acabando por migrar a otros órganos.

Así pues, nuestro objetivo fue la búsqueda de BM que puedan servir como vehículo de administración de las células, de forma que éstas tengan una mayor supervivencia y se favorezca la prolongación de su efecto paracrino, además de prevenir el remodelado ventricular. Con esta idea, se ha realizado la siguiente investigación en la que se han testado diferentes tipos de biomateriales en función de su biocompatibilidad en el entorno cardíaco. Su afinidad celular se analizó utilizando células cardíacas y se utilizó un modelo de infarto agudo de miocardio en rata para analizar la seguridad y eficacia de los biomateriales en el sitio del implante. Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron la capacidad de albergar células, su degradabilidad, el efecto inflamatorio y la neovascularización producida.

Cuando fueron sembrados con células cardíacas, todos los BM mostraron un crecimiento positivo de las células, analizado mediante los ensayos de proliferación celular, pero cabe destacar que el PA y el PLA mostraron un menor crecimiento y el PCL fue el que destacó de manera significativa sobre todos los demás. Sería conveniente estudiar más a fondo las propiedades fisicoquímicas del PCL para poder trasladar esta característica al resto de BM [236].

Una vez comprobada la biocompatibilidad *in vitro*, se quiso saber el efecto que ejercían los BM cuando éstos eran implantados en el tejido cardíaco. Para ello, se implantaron los cinco tipos de BM en corazones de ratas sanas durante 2 y 8 semanas. Todos los BM mostraron una buena manejabilidad y adherencia al tejido en el momento del implante, lo cual les confiere buenas propiedades que los hace susceptibles de ser usados en procesos quirúrgicos. Sin embargo, la visión macroscópica 8 semanas post-implante mostró diferencias entre los biomateriales. Todos ellos se mostraron visibles en el momento del sacrificio, pero se observó una mayor reabsorción en PHB en comparación con el PCL, PA, PLA y SEDA que no mostraron ninguna degradación a nivel macroscópico. Además, de manera llamativa el biomaterial PLA no solo no se reabsorbió sino que mostró un aumento de volumen poco después del implante que persistió a lo largo del tiempo analizado. Así pues, el único material que mostró degradación después de 8 semanas en contacto con el corazón fue el PHB.

El análisis histopatológico corroboró lo observado a nivel macroscópico y dio una explicación más profunda de lo acontecido. El análisis histopatológico 2 semanas post-implante mostró para el PLA una elevada presencia de infiltrados celulares, compuesta principalmente por células mononucleadas. El PCL, la SEDA y el PA fueron encapsulados e invadidos por células gigantes multinucleadas. Sin embargo, en PHB la histología reveló que en ese tiempo apenas quedaban fragmentos de BM ni células fagocíticas. El análisis a las 8 semanas reveló que todos estos hallazgos se veían incrementados para el caso del PLA, permanecían igual en PCL, SEDA y PA y para PHB había disminuido.

Todo ello se traduce en que la reacción provocada por el PLA responde a una respuesta de rechazo por parte del corazón. El PCL, la SEDA y la PA provocan una respuesta inflamatoria moderada, no están siendo rechazados y es posible que necesiten más tiempos para ser degradados y para la resolución de la inflamación. Sin embargo, el PHB provocó una respuesta leve que se resolvió a las 8 semanas, evidenciando la aceptación de estos BM en el corazón. Es probable que una degradación más lenta haga que los BM permanezcan durante un periodo de

tiempo más prolongado en contacto con el tejido, haciendo que éstos no se integren en el mismo y que induzcan una respuesta inflamatoria mayor y duradera [237]. Todo ello perjudicaría en la adecuación del BM como vehículo celular, ya que podría influir en la fagocitosis de las células sembradas antes de realizar su papel de efecto paracrino. En este sentido, nos replanteamos la idoneidad del PLA e incluso de PCL, SEDA o PA como vehículos transportadores de células, seleccionando por tanto, al PHB como posible candidato.

Para los siguientes estudios *in vivo* se usó el modelo experimental de IAM en rata. Aunque ningún modelo animal puede reproducir completamente la complejidad de las condiciones patológicas humanas, los modelos animales son la herramienta para comprender los mecanismos de la enfermedad y son de utilidad para evaluar las tecnologías de diagnóstico y tratamiento. A lo largo de la historia se han propuesto diferentes modelos animales para IAM [238-240]. En este estudio se eligió el modelo de ligadura permanente de la ACDA, ya que resulta muy adecuado para simular la obstrucción a la que se ve sometida dicha arteria como consecuencia de un proceso aterotrombótico [241]. El hecho de no haber reperfusión, permite evaluar más fácilmente si los cambios en la estructura o funcionalidad del tejido cardíaco son debidos a la terapia experimental. La especie de elección también constituyó una ventaja, ya que nos permitió realizar un número elevado de ensayos con un bajo coste y nos ofreció comodidad en el manejo de los animales.

Estudios previos han demostrado que los BM en combinación con células o factores de crecimiento mejoraron la función cardíaca de corazones de rata con IAM además de asociarse a un remodelado positivo del corazón [203, 242, 243]. Estos estudios apoyan la idea de que, aunque era conocido el potencial regenerativo cardiovascular de las células trasplantadas [140-142, 233, 244], su efecto no fue visible hasta que fueron sembradas y trasplantadas con los BM [167, 245]. Esto se confirmó cuando las células fueron trasplantadas con un bajo número de células y en cambio, cuando el mismo número de células fue implantado sobre los BM, éstas sí fueron capaces de generar el efecto beneficioso esperado. Hizo falta triplicar el número de células trasplantadas sin BM para que produjera el mismo efecto positivo y cuando este número mayor fue trasplantado con el BM el efecto además se detectó a largo plazo [133, 142]. Con estos estudios se constató que los BM eran capaces de prolongar la acción beneficiosa de las células y conseguían obtener dicho beneficio con un número menor de

ellas, destacando así la influencia positiva de la presencia de los BM en el trasplante de células.

En nuestro estudio, se implantaron los BM en corazones de ratas con IAM. Como cabía esperar, las ecocardiografías revelaron que los BM no produjeron por ellos mismos una mejora en la función cardíaca. Por otro lado, pudimos observar que la utilización de BM en el epicardio de corazones infartados tampoco perjudicaba al rendimiento cardíaco, ya que los valores obtenidos tanto en el cambio porcentual de área como en la fracción de acortamiento no se vieron afectados. Estos resultados están acordes con otros estudios donde se observó que la utilización de BM en el epicardio de ratas no perjudicaba al movimiento de la pared cardíaca [167]. Cabe destacar que el parámetro estudiado que hace referencia al engrosamiento de la pared anterior mejoró en los corazones que fueron implantados con BM. Esta evidencia puede sugerir que los BM ofrecieron consistencia a la pared del VI adelgazada tras el IAM y sugiere que el uso de BM puede impedir la dilatación ventricular que ocurre tras un IAM y prevenir el remodelado ventricular. Habría que realizar más estudios a largo plazo e indagar sobre las propiedades elásticas de cada BM. Otro hallazgo que resultó curioso fue que el porcentaje de tejido cicatricial disminuyó en los corazones infartados con BM, destacando en este sentido de manera significativa PHB y PCL. Es posible que la presencia de estos BM en el tejido cardíaco, influya en el reclutamiento de tipos celulares o en la angiogénesis, como más adelante comentaremos, evitando la formación del tejido cicatricial consecuente tras un IAM. Podemos concluir que los BM estudiados no ayudan por ellos mismos a mejorar la función cardíaca, aunque su presencia tampoco perjudica. Además, también podrían disminuir a largo plazo el remodelado ventricular dando consistencia a la pared adelgazada del VI. En todo caso, ayudan a disminuir el tejido fibrótico formado en el corazón tras un IAM, siendo PCL y PHB los BM que destacan al respecto.

La búsqueda de BM con fines regenerativos presenta un gran interés de cara a su uso en clínica. El comprender la respuesta inflamatoria del tejido a los diferentes BM en estudio es esencial para mejorar la seguridad y eficacia de los futuros procedimientos a los que irán destinados. Para definir el perfil inflamatorio de los BM estudiados, se implantaron en corazones de rata con y sin IAM y se analizaron los macrófagos infiltrados en el tejido que estaba en contacto con el BM. Se observó que los implantes de PHB y PLA indujeron la proliferación de macrófagos M2 en el miocardio sano e infartado. Este resultado concuerda con los obtenidos en el estudio pirógeno donde se observó la inducción por parte de

estos BM de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. El estudio resultó interesante ya que se pudo ver que existe una polarización de los macrófagos dependiendo del BM del que se trate. Esto tiene relevancia a la hora de descartar BM que a priori parecían adecuados para su uso en ingeniería de tejido cardíaco y que posteriormente al estudio se observó que provocaron una respuesta crónica de tipo M1, pudiendo no cumplir los criterios de seguridad [246]. Éste ha sido el caso del PCL. De hecho, en otros estudios se ha determinado que el PCL puro es menos favorable que cuando está combinado con otros polímeros como por ejemplo el polietilén glicol (PEG). Cuando se encuentra como co-polímero PCL-PEG, se ha demostrado que contribuye al mantenimiento de la viabilidad de las células madre embrionarias y a la diferenciación de los cardiomiocitos [247]. Uno de los resultados que no pudimos explicar es por qué los macrófagos inducidos por la SEDA demostraron tener un perfil pro-inflamatorio de tipo M1 cuando fue implantada en corazones sanos, mientras que el perfil de los macrófagos cambió a tipo M2 en corazones con IAM. Este fenómeno requiere de una mayor investigación. En cualquier caso, este estudio demostró que el perfil inflamatorio de los macrófagos dependía del BM, destacando al PHB como BM inductor de macrófagos tipo M2 anti-inflamatorios.

Otro aspecto que se estudió, fue la capacidad angiogénica de los BM. El hecho de que los BM tengan la capacidad de formar nuevos vasos allí donde sean implantados sería de relevancia para mantener la buena irrigación del tejido lesionado, asegurando de este modo el aporte de oxígeno y nutrientes a las células y favoreciendo así la reparación de los tejidos que estén en contacto. De todos los BM estudiados, fue el PHB el que indujo mayor grado de proliferación vascular y esto se observó tanto en el miocardio sano como en el infartado. Ello puede estar relacionado con la capacidad del PHB de inducir la expresión de la IL-6 en las células inmunitarias, pudiendo así ejercer una acción paracrina en el área donde esté implantado [246].

Así pues, entre todos los BM estudiados, el PHB mostró una mayor biocompatibilidad tanto a nivel celular como en términos de biodegradación *in vivo*. También presentó una mayor capacidad angiogénica y dados los resultados obtenidos de su implante en corazones con IAM, cabe esperar que prevenga el remodelado negativo en el tejido infartado. Además, el PHB indujo una respuesta de las citoquinas anti-inflamatorias demostrando tener una respuesta inflamatoria que corresponde a la aceptación por parte del tejido. El PCL demostró tener propiedades óptimas para contener células e inducir su

proliferación celular, pero otros aspectos, como la capacidad para inducir la proliferación de macrófagos de perfil inflamatorio en el lugar del implante, nos hacen pensar que no sería un BM adecuado para la reparación cardíaca, al menos en su forma pura.

Por lo tanto, en vista de todos estos resultados, podemos concluir que el PHB es un buen candidato para ser usado como vehículo de células y ser implantado en miocardio pudiendo ser una alternativa eficaz para la protección y regeneración del tejido cardíaco lesionado.

3. Los biomateriales y su biocompatibilidad con el tejido dérmico

El tratamiento de los grandes quemados se enfrenta a dos grandes retos para mantener con vida a estos pacientes, uno de ellos es la gran superficie corporal a cubrir y el otro la escasez de áreas donantes del propio paciente. Hoy en día, gracias a los avances en el campo de la anestesia, estos pacientes pueden permanecer estables más tiempo. Esto proporciona una ventaja a los cirujanos ya que cuentan con un tiempo del que antes no disponían y pueden poner en práctica nuevas estrategias para reemplazar las áreas quemadas. Aún así, estos pacientes siguen siendo considerados de alto riesgo y su estancia hospitalaria por término medio se encuentra entre los 4 y 6 meses, durante los cuales los pacientes son sometidos a múltiples operaciones y a curas traumatizantes.

Aunque se han dedicado muchos esfuerzos a mejorar los tratamientos para este tipo de pacientes, pocos avances se han producido en la práctica clínica y el trasplante de piel autóloga sigue siendo el único tratamiento definitivo. Debido a la escasez de piel donante de estos pacientes, los cirujanos recurren a coberturas temporales como la piel de cadáver o apósitos comerciales, con la finalidad de evitar la deshidratación, disminuir la respuesta inflamatoria sistémica del paciente y ganar tiempo para la obtención de piel del propio paciente. Una de las formas para obtener piel autóloga es a través de los cultivos de piel fabricada *in vitro* también llamados equivalentes dérmicos (ED). Esta técnica permite obtener en tres semanas injertos de aproximadamente 75 cm² a partir de una muestra de piel de 1 cm² [248]. Sin embargo, presenta unas limitaciones y es que esta piel cultivada *in vitro* o ED es una estructura gelatinosa y estrecha que resulta difícil de

manejar y de aplicar en áreas de flexura como la axila o el cuello y no siempre aseguran el prendimiento.

El uso de BM para el injerto de piel humana *in vivo* no se ha investigado en profundidad [249]. Sin embargo, sí se ha abierto un campo de estudio en la utilización de BM y su aplicación en la cicatrización de heridas en la piel [250]. Entre los mejor caracterizados se encuentran el PLGA [251, 252], el PCL [253, 254], el quitosano [255, 256] y la gelatina [253, 257]. Así pues, nuestro objetivo fue realizar una búsqueda de BM que sirvieran como base de la piel cultivada *in vitro*, suponiendo que podrían ofrecer mejores propiedades mecánicas y aportar otras características que favorecieran el prendimiento, como la angiogénesis. En vista de los buenos resultados obtenidos a nivel de biocompatibilidad y reparación cardíaca con los biomateriales PHB y PCL, se escogieron éstos para el estudio en el campo de la regeneración dérmica y se añadió el PLGA para profundizar su aplicación en el campo de los injertos cutáneos. Se realizaron estudios de viabilidad celular *in vitro* utilizando células dérmicas humanas y se midió su capacidad angiogénica y su respuesta inflamatoria *in vivo*. Además, se evaluó su seguridad y eficacia como base polimérica de los cultivos de piel *in vitro* utilizando un modelo de xenotrasplante de piel en ratón inmunodeprimido.

Como cabía esperar, el PCL, el PHB y el PLGA mostraron buena compatibilidad cuando fueron sembrados con células dérmicas. Sin embargo, los niveles de proliferación celular fueron significativamente mayores con el PHB y el PLGA.

Para conocer el comportamiento de los BM en un entorno dérmico, fueron implantados a nivel subdérmico en el lomo de ratas. El estudio histopatológico de este ensayo mostró que todos los BM indujeron una reacción granulomatosa a cuerpo extraño con abundantes células multinucleadas e infiltrado de células mononucleares, aunque la presencia de este último factor fue moderada para los velos de PCL, PHB y PLGA. Sin embargo, el PHB y el PLGA presentaron una mejor degradación en comparación con el PCL y la membrana control Matriderm (MD). Por tanto, se deduce que el tiempo que estuvieron los biomateriales PHB y PLGA a nivel subdérmico fue suficiente para generar una respuesta inflamatoria controlada resolviéndose con la degradación de los mismos.

Al mismo tiempo, se analizó la respuesta inflamatoria de los velos *in vivo*. En estudios previos se había demostrado que la presencia de macrófagos con un perfil anti-inflamatorio M2 en heridas, se considera un factor crítico para estimular la regeneración e incitar su cicatrización [258-260]. Se observó que en el

caso del PCL, el PHB y el PLGA el perfil inflamatorio de los macrófagos estudiados fue de M2 anti-inflamatorio a los 14 días después de su implante. Esta observación ya se advirtió cuando el PHB se implantó en la superficie de corazones de rata [261]. Esto puede estar relacionado con el tiempo de degradación. BM que en un principio pueden tener un perfil pro-inflamatorio, conforme van degradándose y desapareciendo del entorno donde están situados, pueden disminuir sus efectos inflamatorios. Tal efecto podría deberse a la combinación de varios factores, como la propia composición del BM, el tamaño de fibra y el entorno donde es aplicado. En todo caso, los resultados obtenidos nos sugieren que las propiedades del PCL, PHB y PLGA favorecen la regeneración del tejido cuando son implantados en un entorno dérmico.

Otro de los problemas que se ha comentado respecto al trasplante de láminas de queratinocitos y fibroblastos cultivadas *in vitro* sobre la superficie del paciente es la fragilidad de las mismas. Los injertos son extremadamente frágiles y pueden dañarse con la manipulación. Cuando los BM estudiados fueron situados en la base de los ED, éstos demostraron ser más resistentes que cuando fueron sintetizados sin BM y gracias a ello mejoró la manipulación de los mismos. Por otro lado, cuando el ED se desprende de la placa de cultivo para ser implantado al paciente, se reduce notablemente su área (entre 10-50%). En este sentido la utilización de los BM integrados en el ED preservó la superficie del cultivo después de ser retirado de la placa, sin distinción entre ellos.

No obstante, en el estudio histológico se observó que el ED con el PCL en su base mostró una estructura desorganizada a nivel celular, no correspondiéndose con la imagen estratificada propia del equivalente dérmico (fibroblastos diseminados por la fibrina bajo una capa de queratinocitos estratificada y continua). En este sentido, ha habido otros estudios donde se observó la mezcla entre las capas epidérmicas y dérmicas en estructuras formadas con PCL [262]. Esto no sucedió en los ED con bases de PHB y de PLGA, donde aparecieron con sus capas bien definidas emulando una piel con dermis y epidermis. Debido a esto, el PCL se excluyó de las pruebas posteriores y el estudio se centró en ratificar el PHB y el PLGA como BM candidatos para ser usados en los injertos de ED.

Una vez se tuvieron los ED con BM en su base, se implantaron en la región dorsal de ratones inmunodeprimidos. Se validó el modelo realizando la inmunohistoquímica correspondiente y se confirmó que el injerto fuera humano, la presencia de una lámina basal que asegurara el sostén entre la dermis y la

epidermis y la existencia de las uniones celulares. Además, se comprobó que el injerto era viable, mediante marcaje con BrdU. Todas estas pruebas aseguraron la calidad del injerto. El estudio de viabilidad del injerto con marcaje anti-BrdU también sirvió para indicar que no hubo cambios en la tasa de proliferación a nivel epidérmico, lo que indica ausencia de hiperplasia y un proceso de epitelización adecuado. Todo ello respalda la seguridad en la utilización de PHB y PLGA en los ensayos clínicos.

Otro aspecto que se estudió fue la capacidad angiogénica del BM en el injerto. Como hemos mencionado anteriormente, la angiogénesis y por lo tanto una buena irrigación de la zona lesionada, es un factor determinante para que un injerto prenda de manera exitosa en su lecho. Por ello, que un BM promueva la angiogénesis será una característica notable para ser usado como acompañante del ED injertado, asegurando la supervivencia del mismo. Tras los estudios realizados, se observó que el recuento de vasos fue significativamente superior en los ED implantados con PHB y PLGA frente a los grupos controles. Por lo que los ED injertados con PHB y PLGA mostraron una mayor angiogénesis.

En general, se puede decir que los BM no han acertado los tiempos de cultivos necesarios para la síntesis del ED. En cambio, sí que pensamos que gracias al BM el ED mejora en manejabilidad y preserva su tamaño desde el momento que se despegó de la placa de cultivo hasta que es puesto en el paciente. Por lo que se espera que con un número menor de ED se cubrirá más superficie corporal que cuando el ED es sintetizado sin BM. Además, pensamos que la calidad del ED con un BM aumentará el porcentaje de prendimiento una vez puesto en el paciente, ya que se ha visto las propiedades angiogénicas y de proliferación celular que le aporta el BM. Así pues, pensamos que un ED sintetizado con el BM apropiado, mejorará las perspectivas de éxito en la utilización del ED como cobertura definitiva en el paciente quemado. Esto supone menos intervenciones en el paciente.

Recopilando toda la información, se pudo comprobar la biocompatibilidad y afinidad del PHB y del PLGA a nivel celular, la mejora en el manejo de los ED cuando están presentes en su estructura, su capacidad angiogénica y su degradabilidad en un tiempo adecuado para la formación de la estructura dermoepidérmica. Todo ello hace que el PHB y el PLGA sean buenos candidatos para ser usados en los injertos de ED, haciendo que mejoren la implantación de los mismos y por tanto, la reparación de la piel.

En vista de los resultados, podemos concluir que de todos los BM ensayados, el que ha demostrado mejores prestaciones para ser utilizado como parche cardíaco es el PHB. Debido al método de obtención del propio PHB a partir de microorganismos podría ser complicada su traslación a la clínica. De hecho este material no puede adquirirse en grado médico por lo que será necesario desarrollar un método de síntesis de PHB que no requiera el uso de microorganismos. En caso de no conseguirlo, el siguiente BM que se propone para su aplicación como parche epicárdico es el PCL ya que con él se han obtenido resultados similares.

Para el caso de la elección de un BM para mejorar el ED como injerto cutáneo en pacientes quemados, los BM más indicados han sido el PHB y PLGA. Dado que el PLGA ha demostrado tener las mismas propiedades que el PHB y que sí se encuentra comercializado en grado médico, se propone la utilización del PLGA como BM para ser usado como base en la síntesis del ED. Los resultados de esta tesis se han utilizado para la elaboración del manual del investigador de un ensayo clínico para evaluar la eficacia y seguridad de los velos de nanofibras con base de PLGA para el tratamiento de quemaduras. Tras su evaluación, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ha solicitado cambios menores en el protocolo y estamos en vías de que el estudio sea aprobado para dar comienzo a un ensayo clínico en el que se empleará el PLGA como mejora en los procesos de injerto de piel.

Por último, con la realización de este trabajo de investigación, hemos podido determinar los ensayos que son adecuados tanto *in vitro* como *in vivo* para caracterizar BM de nueva síntesis que quieran ser empleados con fines regenerativos en el campo de la biomedicina. Es decir, que hemos diseñado un panel de validación preclínica que está siendo ya explotado por empresas biotecnológicas que contratan los servicios de nuestro laboratorio, lo que facilitará en un futuro la participación en nuevos proyectos, generación de fondos y participación en procesos de propiedad industrial.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo son las siguientes:

- 1- Los biomateriales estudiados, PCL, PLA, PLGA, PHB, PA y SEDA (Tabla 3), demuestran tener, independientemente de su naturaleza, buena compatibilidad a nivel celular en cuanto a términos de adhesión y proliferación. Además, demuestran ser biomateriales con un comportamiento hidrofílico lo que permite su uso en el desarrollo de experimentos *in vitro*.
- 2- El comportamiento mecánico de los biomateriales estudiados es suficiente para soportar procesos de manipulación, el cultivo de células y procedimientos quirúrgicos. La SEDA es el único material que demuestra tener una capacidad de deformación limitada debida a su naturaleza frágil.
- 3- Las células de tipo cardíaco (HL-1 y fibroblastos cardíacos) presentan una mejor capacidad de proliferación sobre los biomateriales (PHB, PLA, SEDA, PA) destacando el PCL sobre todos los demás. Sin embargo, las células de tipo dérmico (fibroblastos) y endoteliales (HUVEC) presentan una mejor capacidad de proliferación en los biomateriales PHB y PLGA sobre el PCL. Dicho aspecto confirma la biocompatibilidad de los materiales en dichas células.
- 4- El PHB indujo significativamente la expresión de IL-6 comparado con el resto de BM. Lo que nos sugiere una respuesta Th2 y una mayor probabilidad de aceptación del BM por parte del tejido implantado.
- 5- *In vivo*, el trasplante de los biomateriales sobre el epicardio de corazones con y sin IAM induce una inflamación en el tejido de tipo leve para el caso del PHB, moderada para el PCL, PA y SEDA y grave para el PLA. Además, el PHB presenta una reabsorción en el corazón no observada en los otros biomateriales.

- 6- El trasplante de biomateriales en el epicardio de corazones con IAM no mejora la función cardiaca en un modelo de IAM en rata, pero tampoco perjudica al rendimiento cardíaco. Sin embargo, sí se detecta una reducción significativa del tejido cicatricial tras dos semanas del IAM en el caso de corazones implantados con PCL y PHB pero no en los implantados con PLA, PA, SEDA ni en los controles (corazones con IAM sin biomateriales).
- 7- Los trasplantes de PHB y de PLA inducen la proliferación de macrófagos con perfil anti-inflamatorio de tipo M2 en el miocardio sano e infartado.
- 8- El trasplante de PHB induce de forma significativa la revascularización del miocardio sano y del infartado.
- 9- *In vivo*, el implante de los biomateriales a nivel subdérmico induce una respuesta inflamatoria moderada que acaba resolviéndose con la reabsorción total del PHB y PLGA. El PLC presenta una menor degradación.
- 10- Los implantes de PCL, PHB y PLGA a nivel subdérmico inducen la proliferación de macrófagos con perfil anti-inflamatorio de tipo M2, lo que induce un remodelado constructivo *in vivo*.
- 11- Los equivalentes dérmicos con PCL, PHB o PLGA en su base son más resistentes que los equivalentes sin biomaterial y preservan toda su superficie de cultivo. Sin embargo, la calidad de los equivalentes dérmicos en términos histológicos es mejor con PHB y PLGA.
- 12- Los equivalentes dérmicos con PHB o PLGA injertados utilizando el modelo de xenotrasplante de piel en ratones inmunodeprimidos, demuestran tener un proceso de epitelización adecuado, además de mostrar una mayor angiogénesis comparado con los equivalentes dérmicos control.

BIBLIOGRAFÍA

1. Viladot Voegeli, A., *Biomateriales*, in *Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor*, S.-V. Ibérica, Editor. 2001: Barcelona. p. 291.
2. Ito, Y., et al., *A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material*. J Biosci Bioeng, 2005. **100**(1): p. 43-9.
3. Fujimoto, K.L., et al., *In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(2): p. 648-54.
4. Livingston, T., P. Ducheyne, and J. Garino, *In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res, 2002. **62**(1): p. 1-13.
5. Hutmacher, D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives*. J Biomater Sci Polym Ed, 2001. **12**(1): p. 107-24.
6. Davis, M.E., et al., *Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 8-15.
7. Lanza, R.P., R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering, 2nd edition* 2000, San Diego, California.
8. Taravel, M.N. and A. Domard, *Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I*. Biomaterials, 1993. **14**(12): p. 930-8.
9. Jakob, M., et al., *Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro*. J Cell Biochem, 2001. **81**(2): p. 368-77.
10. Martin, I., et al., *Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue*. Exp Cell Res, 1999. **253**(2): p. 681-8.
11. Gugala, Z. and S. Gogolewski, *In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(2): p. 183-91.
12. Yang, X.B., et al., *Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification*. Bone, 2001. **29**(6): p. 523-31.
13. Jeong, S.I., et al., *In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffolds*. Biomaterials, 2004. **25**(28): p. 5939-46.

14. Cho, H.J., et al., *Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3257-69.
15. Corre, Y.M., et al., *Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study*. Polymer Testing, 2012. **31**(2): p. 226-235.
16. Pitt, C.G., et al., *Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo*. Biomaterials, 1981. **2**(4): p. 215-20.
17. Kweon, H., et al., *A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(5): p. 801-8.
18. Agarwal, S., J.H. Wendorff, and A. Greiner, *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer, 2008. **49**(26): p. 5603-5621.
19. García García, N., *Electrospinning: una Técnica Fascinante para la Obtención de Nanofibras Poliméricas*. Revista de Plásticos Modernos, 2013. **105** (677): p. 166-173.
20. Duque Sánchez, L.M., L. Rodriguez, and M. López, *Electrospinning: La era de las nanofibras*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2013. **14**(1): p. 10-27.
21. Oviedo, J., *Polímeros biodegradables con aplicaciones en suturas quirúrgicas*, in *Polímeros y Suturas*. 2012. p. 32.
22. Brode, G.L. and J.V. Koleske, *Lactone Polymerization and Polymer Properties*. Journal of Macromolecular Science: Part A-Chemistry, 1972. **6**(6): p. 1109-1144.
23. Hiltunen, K., et al., *The biodegradation of lactic acid-based poly(ester-urethanes)*. Journal of environmental polymer degradation, 1997. **5**(3): p. 167-173.
24. Tyler, B., et al., *Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **107**: p. 163-175.
25. Kulkarni, R.K., et al., *Polylactic acid for surgical implants*. Arch Surg, 1966. **93**(5): p. 839-43.
26. Zong, H., et al., *Mosaic analysis with double markers in mice*. Cell, 2005. **121**(3): p. 479-92.
27. Flege, C., et al., *Development and characterization of a coronary polylactic acid stent prototype generated by selective laser melting*. J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(1): p. 241-55.
28. Lancheros, R.J., et al., ***PLGA nanoparticles production by emulsion and evaporation to encapsulate N-acetylcysteine (NAC)***. Universitas Scientiarum, 2014. **19**(2): p. 161-168.

29. Jain, R.A., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2475-90.
30. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. Polymers (Basel), 2011. **3**(3): p. 1377-1397.
31. Averous, L., *Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review*. Polymer Reviews, 2004. **44**(3): p. 231-274.
32. Shishatskaya, E.I., et al., *Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair*. J Mater Sci Mater Med, 2016. **27**(11): p. 165.
33. Oliveira, F.C., et al., *Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by Cupriavidus necator in solid-state fermentation*. Bioresour Technol, 2007. **98**(3): p. 633-8.
34. Rockwood, D.N., et al., *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*. Nat Protoc, 2011. **6**(10): p. 1612-31.
35. Wray, L.S., et al., *Effect of processing on silk-based biomaterials: reproducibility and biocompatibility*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011. **99**(1): p. 89-101.
36. Sah, M.K. and K. Pramanik, *Regenerated Silk Fibroin from B. mori Silk Cocoon for Tissue Engineering Applications*. International Journal of Environmental Science and Development, 2010. **1**(5): p. 404-408.
37. Eisoldt, L., et al., *The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins*. J Struct Biol, 2010. **170**(2): p. 413-9.
38. Sobajo, C., et al., *Silk: a potential medium for tissue engineering*. Eplasty, 2008. **8**: p. e47.
39. Garcia-Fuentes, M., et al., *Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering*. Biomaterials, 2009. **30**(28): p. 5068-76.
40. Deng, J., et al., *A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee*. J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(8): p. 2037-46.
41. Wei, Y., et al., *Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(8): p. 1947-64.
42. Zeng, C., et al., *Silk fibroin porous scaffolds for nucleus pulposus tissue engineering*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **37**: p. 232-40.
43. *The global burden of disease : 2004 update, 2008*. 2008: The World Health Report 2001 to 2004 and World Health Statistics 2006 to 2008.

44. Anand, S.S., et al., *Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study*. Eur Heart J, 2008. **29**(7): p. 932-40.
45. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *El corazón. Músculo cardíaco: el corazón como bomba y la función de las válvulas cardíacas*, in *Tratado de fisiología médica*, S.A.E. ESPAÑA, Editor. 2012: Barcelona. p. 101-114.
46. Brobeck, J.R., C.H. Best, and B. Taylor, *Best & Taylor's Physiological basis of medical practice*. 11 ed. 1979.
47. Fawcett, D.W. and R.P. Jensch, *Bloom & Fawcett : concise histology*. 1997, New York.
48. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
49. Napoli, C., *MMP inhibition and the development of cerebrovascular atherosclerosis: The road ahead*. Stroke, 2002. **33**(12): p. 2864-5.
50. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
51. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. Circulation, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
52. Mann, D.L., *Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 999-1008.
53. Heusch, G., R. Schulz, and S.H. Rahimtoola, *Myocardial hibernation: a delicate balance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H984-99.
54. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(6): p. 1281-92.
55. Ertl, G. and S. Frantz, *Healing after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 22-32.
56. Nian, M., et al., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
57. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
58. Frangogiannis, N.G., et al., *IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2798-808.
59. Kumar, V., A.K. Abbas, and J.C. Aster, *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 2009, Philadelphia.
60. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. **344**(23): p. 1750-7.

61. PRINZMETAL, M. and L.L. SCHWARTZ, *Studies on the coronary circulation; loss of myocardial contractility after coronary artery occlusion*. *Ann Intern Med*, 1949. **31**(3): p. 429-49.
62. Anderson, J.L., et al., *2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *Circulation*, 2011. **123**(18): p. e426-579.
63. Van de Werf, F., et al., *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(23): p. 2909-45.
64. Antman, E.M., et al., *2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee*. *Circulation*, 2008. **117**(2): p. 296-329.
65. Kjekshus, J.K., *Importance of heart rate in determining beta-blocker efficacy in acute and long-term acute myocardial infarction intervention trials*. *Am J Cardiol*, 1986. **57**(12): p. 43F-49F.
66. Sakai, S., et al., *Morphologic changes in infarct-related plaque after coronary stent placement: a serial angiography study*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **42**(9): p. 1558-65.
67. Lindenfeld, J., et al., *Drug therapy in the heart transplant recipient: Part III: common medical problems*. *Circulation*, 2005. **111**(1): p. 113-7.
68. Formiga, F.R., et al., *Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model*. *J Control Release*, 2010. **147**(1): p. 30-7.
69. Chung, Y.I., et al., *Efficient revascularization by VEGF administration via heparin-functionalized nanoparticle-fibrin complex*. *J Control Release*, 2010. **143**(3): p. 282-9.
70. Scott, R.C., et al., *Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function*. *FASEB J*, 2009. **23**(10): p. 3361-7.

71. Matsusaki, M., et al., *Controlled release of vascular endothelial growth factor from alginate hydrogels nano-coated with polyelectrolyte multilayer films*. J Biomater Sci Polym Ed, 2007. **18**(6): p. 775-83.
72. Freeman, I. and S. Cohen, *The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization*. Biomaterials, 2009. **30**(11): p. 2122-31.
73. Ruvinov, E., J. Leor, and S. Cohen, *The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction*. Biomaterials, 2011. **32**(2): p. 565-78.
74. Laham, R.J., et al., *Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Circulation, 1999. **100**(18): p. 1865-71.
75. Lopez, J.J., et al., *VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 272-81.
76. Ylä-Herttuala, S., J.E. Markkanen, and T.T. Rissanen, *Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(8): p. 295-300.
77. Zaiss, A.K. and D.A. Muruve, *Immune responses to adeno-associated virus vectors*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(3): p. 323-31.
78. Al Sabti, H., *Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease*. J Cardiothorac Surg, 2007. **2**: p. 49.
79. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-76.
80. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
81. van Laake, L.W., et al., *Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction*. Stem Cell Res, 2007. **1**(1): p. 9-24.
82. Laflamme, M.A., et al., *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(9): p. 1015-24.
83. Mauritz, C., et al., *Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2008. **118**(5): p. 507-17.
84. Duckers, H.J., et al., *Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial*. EuroIntervention, 2011. **6**(7): p. 805-12.

85. Dib, N., et al., *One-year follow-up of feasibility and safety of the first U.S., randomized, controlled study using 3-dimensional guided catheter-based delivery of autologous skeletal myoblasts for ischemic cardiomyopathy (CAuSMIC study)*. JACC Cardiovasc Interv, 2009. **2**(1): p. 9-16.
86. Martin-Rendon, E., et al., *Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review*. Eur Heart J, 2008. **29**(15): p. 1807-18.
87. Zhang, C., et al., *Efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow-derived cell transplantation in patients with acute myocardial infarction: insights from randomized controlled trials with 12 or more months follow-up*. Clin Cardiol, 2010. **33**(6): p. 353-60.
88. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
89. Martinez-Fernandez, A., et al., *c-MYC independent nuclear reprogramming favors cardiogenic potential of induced pluripotent stem cells*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(1): p. 13-23.
90. Dawn, B., et al., *Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3766-71.
91. Rota, M., et al., *Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function*. Circ Res, 2008. **103**(1): p. 107-16.
92. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12313-8.
93. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
94. Liu, J.W., et al., *Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(4): p. 826-34.
95. Lozito, T.P., et al., *Mesenchymal stem cell modification of endothelial matrix regulates their vascular differentiation*. J Cell Biochem, 2009. **107**(4): p. 706-13.
96. Mirotsoy, M., et al., *Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 280-9.
97. Kinnaird, T., et al., *Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences*. Circ Res, 2004. **95**(4): p. 354-63.
98. Mirotsoy, M., et al., *Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating*

- myocardial survival and repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1643-8.
99. Ohnishi, S., et al., *Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions*. FEBS Lett, 2007. **581**(21): p. 3961-6.
100. Guo, J., et al., *Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction*. Inflammation, 2007. **30**(3-4): p. 97-104.
101. Yagi, H., et al., *Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing*. Cell Transplant, 2010. **19**(6): p. 667-79.
102. Le Blanc, K. and O. Ringdén, *Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience*. J Intern Med, 2007. **262**(5): p. 509-25.
103. Ren, G., et al., *Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1954-62.
104. Puissant, B., et al., *Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells*. Br J Haematol, 2005. **129**(1): p. 118-29.
105. Yañez, R., et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2582-91.
106. González, M.A., et al., *Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1006-19.
107. Huang, X.P., et al., *Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair*. Circulation, 2010. **122**(23): p. 2419-29.
108. Eliopoulos, N., et al., *Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4057-65.
109. Poncelet, A.J., et al., *Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo*. Transplantation, 2007. **83**(6): p. 783-90.
110. Hatzistergos, K.E., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation*. Circ Res, 2010. **107**(7): p. 913-22.
111. Mazo, M., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat*. Cell Transplant, 2010. **19**(3): p. 313-28.
112. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-5.

113. Rota, M., et al., *Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(45): p. 17783-8.
114. Nygren, J.M., et al., *Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 494-501.
115. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 664-8.
116. Casteilla, L., et al., *Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases?* Arch Mal Coeur Vaiss, 2005. **98**(9): p. 922-6.
117. Prunet-Marcassus, B., et al., *From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences*. Exp Cell Res, 2006. **312**(6): p. 727-36.
118. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
119. Katz, A.J., et al., *Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 412-23.
120. Corre, J., et al., *Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors*. J Cell Physiol, 2006. **208**(2): p. 282-8.
121. Rodeheffer, M.S., K. Birsoy, and J.M. Friedman, *Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo*. Cell, 2008. **135**(2): p. 240-9.
122. Miranville, A., et al., *Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells*. Circulation, 2004. **110**(3): p. 349-55.
123. Chang, S.A., et al., *Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation*. Stem Cells, 2008. **26**(7): p. 1901-12.
124. Planat-Bénard, V., et al., *Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells*. Circ Res, 2004. **94**(2): p. 223-9.
125. Sliwa, A., et al., *Differentiation of human adipose tissue SVF cells into cardiomyocytes*. Genes Nutr, 2009. **4**(3): p. 195-8.
126. Bai, X., et al., *Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(3): p. 665-71.
127. Di Rocco, G., et al., *Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 14): p. 2945-52.

128. Han, J., et al., *Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells*. *Blood*, 2010. **115**(5): p. 957-64.
129. Rehman, J., et al., *Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells*. *Circulation*, 2004. **109**(10): p. 1292-8.
130. Kilroy, G.E., et al., *Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors*. *J Cell Physiol*, 2007. **212**(3): p. 702-9.
131. Yamada, Y., et al., *Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **342**(2): p. 662-70.
132. Premaratne, G.U., et al., *Stromal vascular fraction transplantation as an alternative therapy for ischemic heart failure: anti-inflammatory role*. *J Cardiothorac Surg*, 2011. **6**: p. 43.
133. Mazo, M., et al., *Adipose stromal vascular fraction improves cardiac function in chronic myocardial infarction through differentiation and paracrine activity*. *Cell Transplant*, 2012. **21**(5): p. 1023-37.
134. Schenke-Layland, K., et al., *Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction*. *J Surg Res*, 2009. **153**(2): p. 217-23.
135. Dicker, A., et al., *Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue*. *Exp Cell Res*, 2005. **308**(2): p. 283-90.
136. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
137. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. *Cell Physiol Biochem*, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.
138. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. *Stem Cells*, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
139. Noël, D., et al., *Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(7): p. 1575-84.
140. Kim, Y., et al., *Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia*. *Cell Physiol Biochem*, 2007. **20**(6): p. 867-76.
141. Valina, C., et al., *Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2007. **28**(21): p. 2667-77.

142. Mazo, M., et al., *Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(5): p. 454-62.
143. Li, B., et al., *Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction*. Coron Artery Dis, 2007. **18**(3): p. 221-7.
144. Constantin, G., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2624-35.
145. Mitchell, J.B., et al., *Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 376-85.
146. Collins, C.A., et al., *Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche*. Cell, 2005. **122**(2): p. 289-301.
147. Chiu, R.C., A. Zibaitis, and R.L. Kao, *Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(1): p. 12-8.
148. Reinecke, H., V. Poppa, and C.E. Murry, *Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 241-9.
149. Reinecke, H., et al., *Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells*. Circ Res, 2004. **94**(6): p. e56-60.
150. Reinecke, H., et al., *Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair*. J Cell Biol, 2000. **149**(3): p. 731-40.
151. Leobon, B., et al., *Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7808-11.
152. Rubart, M., et al., *Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 775-83.
153. Menasché, P., et al., *Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(7): p. 1078-83.
154. Jain, M., et al., *Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction*. Circulation, 2001. **103**(14): p. 1920-7.
155. Menasché, P., *Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2004. **2**(1): p. 21-8.

156. Perez-Illarbe, M., et al., *Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(11): p. 1065-72.
157. Wollert, K.C. and H. Drexler, *Clinical applications of stem cells for the heart*. Circ Res, 2005. **96**(2): p. 151-63.
158. Liechty, K.W., et al., *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1282-6.
159. Reyes, M., et al., *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 337-46.
160. Alvarez-Dolado, M., et al., *Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 968-73.
161. Pelacho, B., et al., *Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(1): p. 51-9.
162. Christman, K.L. and R.J. Lee, *Biomaterials for the treatment of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(5): p. 907-13.
163. Duncan, D.A., et al., *Prevention of postoperative pericardial adhesions with hydrophilic polymer solutions*. J Surg Res, 1988. **45**(1): p. 44-9.
164. Kohanna, F.H., et al., *Use of autologous fascia lata as a pericardial substitute following open-heart surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1977. **74**(1): p. 14-9.
165. Minale, C., et al., *Closure of the pericardium using expanded polytetrafluoroethylene GORE-TEX-Surgical Membrane: clinical experience*. Thorac Cardiovasc Surg, 1987. **35**(5): p. 312-5.
166. Sakuma, K., et al., *Closure of the pericardium using synthetic bioabsorbable polymers*. Ann Thorac Surg, 2005. **80**(5): p. 1835-40.
167. Cortes-Morichetti, M., et al., *Association between a cell-seeded collagen matrix and cellular cardiomyoplasty for myocardial support and regeneration*. Tissue Eng, 2007. **13**(11): p. 2681-7.
168. Ryu, J.H., et al., *Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium*. Biomaterials, 2005. **26**(3): p. 319-26.
169. Madden, L.R., et al., *Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15211-6.
170. Simpson, D., et al., *A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling*. Stem Cells, 2007. **25**(9): p. 2350-7.

171. Leor, J., et al., *Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?* Circulation, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III56-61.
172. Kellar, R.S., et al., *Scaffold-based three-dimensional human fibroblast culture provides a structural matrix that supports angiogenesis in infarcted heart tissue.* Circulation, 2001. **104**(17): p. 2063-8.
173. Kellar, R.S., et al., *Cardiac patch constructed from human fibroblasts attenuates reduction in cardiac function after acute infarct.* Tissue Eng, 2005. **11**(11-12): p. 1678-87.
174. Francis, M.P., et al., *Human placenta hydrogel reduces scarring in a rat model of cardiac ischemia and enhances cardiomyocyte and stem cell cultures.* Acta Biomater, 2017. **52**: p. 92-104.
175. Okano, T., et al., *A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide).* J Biomed Mater Res, 1993. **27**(10): p. 1243-51.
176. Asakawa, N., et al., *Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering.* Biomaterials, 2010. **31**(14): p. 3903-9.
177. Sekine, H., et al., *Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts.* Circulation, 2008. **118**(14 Suppl): p. S145-52.
178. Kawamura, M., et al., *Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart.* Circulation, 2013. **128**(11 Suppl 1): p. S87-94.
179. Homma, J., et al., *Myoblast cell sheet transplantation enhances the endogenous regenerative abilities of infant hearts in rats with myocardial infarction.* J Tissue Eng Regen Med, 2017. **11**(6): p. 1897-1906.
180. Godier-Furnémont, A.F., et al., *Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 7974-9.
181. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a biologic scaffold material.* Biomaterials, 2007. **28**(25): p. 3587-93.
182. Wang, Q., et al., *Functional engineered human cardiac patches prepared from nature's platform improve heart function after acute myocardial infarction.* Biomaterials, 2016. **105**: p. 52-65.
183. Wang, L., et al., *Transplantation of Isl1.* Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 230.
184. Gilpin, S.E., et al., *Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale.* J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(3): p. 298-308.

185. Kagan, R.J., E.C. Robb, and R.T. Plessinger, *Human skin banking*. Clin Lab Med, 2005. **25**(3): p. 587-605.
186. Burke, J.F., et al., *Temporary skin transplantation and immunosuppression for extensive burns*. N Engl J Med, 1974. **290**(5): p. 269-71.
187. Subrahmanyam, M., *Amniotic membrane as a cover for microskin grafts*. Br J Plast Surg, 1995. **48**(7): p. 477-8.
188. Ganatra, M.A. and K.M. Durrani, *Method of obtaining and preparation of fresh human amniotic membrane for clinical use*. J Pak Med Assoc, 1996. **46**(6): p. 126-8.
189. Quinby, W.C., et al., *Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care*. Plast Reconstr Surg, 1982. **70**(6): p. 711-17.
190. Haberal, M., et al., *The use of silver nitrate-incorporated amniotic membrane as a temporary dressing*. Burns Incl Therm Inj, 1987. **13**(2): p. 159-63.
191. Palao Doménech, R., *Quemados : valoración y criterios de actuación*. 2009.
192. Zawacki, B.E., *Reversal of capillary stasis and prevention of necrosis in burns*. Ann Surg, 1974. **180**(1): p. 98-102.
193. Demling, R.H., *Fluid replacement in burned patients*. Surg Clin North Am, 1987. **67**(1): p. 15-30.
194. Hart, D.W., et al., *Determinants of skeletal muscle catabolism after severe burn*. Ann Surg, 2000. **232**(4): p. 455-65.
195. Palmieri, T.L., et al., *A multicenter review of toxic epidermal necrolysis treated in U.S. burn centers at the end of the twentieth century*. J Burn Care Rehabil, 2002. **23**(2): p. 87-96.
196. Herndon, D.N., *Perspectives in the use of allograft*. J Burn Care Rehabil, 1997. **18**(1 Pt 2): p. S6.
197. Hansbrough, J.F., *Wound Coverage with Biologic Dressings and Cultured Skin Substitutes*. 1992: R G Landes Co.
198. Herndon, D., *Coberturas alternativas de las heridas*, in *Tratamiento integral de las quemaduras*. 2009. p. 97-103.
199. Ryssel, H., et al., *The use of MatriDerm in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns--a pilot study*. Burns, 2008. **34**(1): p. 93-7.
200. Burke, J.F., et al., *Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury*. Ann Surg, 1981. **194**(4): p. 413-28.
201. Heimbach, D., et al., *Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial*. Ann Surg, 1988. **208**(3): p. 313-20.

202. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-43.
203. Araña, M., et al., *Preparation and characterization of collagen-based ADSC-carrier sheets for cardiovascular application*. Acta Biomater, 2013. **9**(4): p. 6075-83.
204. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol, 1976. **4**(5): p. 267-74.
205. Le Blanc, K. and M. Pittenger, *Mesenchymal stem cells: progress toward promise*. Cytotherapy, 2005. **7**(1): p. 36-45.
206. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
207. Armiñán, A., et al., *Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(20): p. 2244-53.
208. Claycomb, W.C., et al., *HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2979-84.
209. Sumpio, B.E., J.T. Riley, and A. Dardik, *Cells in focus: endothelial cell*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1508-12.
210. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
211. Nanchahal, J. and C.M. Ward, *New grafts for old? A review of alternatives to autologous skin*. Br J Plast Surg, 1992. **45**(5): p. 354-63.
212. Pellegrini, G., et al., *The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin*. Transplantation, 1999. **68**(6): p. 868-79.
213. Meana, A., et al., *Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels*. Burns, 1998. **24**(7): p. 621-30.
214. Tang, Y., et al., *microRNA-451 inhibited cell proliferation, migration and invasion through regulation of MIF in renal cell carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(12): p. 15611-21.
215. Zhang, J.X., et al., *Notch1/3 and p53/p21 are a potential therapeutic target for APS-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma cell lines*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(8): p. 12539-47.
216. Zhou, T., et al., *Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting Proliferation of Epidermal Keratinocytes via Erk/Akt Signaling Pathway*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(3): p. 959-68.

217. Mizutani, M. and T. Matsuda, *Liquid photocurable biodegradable copolymers: in vivo degradation of photocured poly(epsilon-caprolactone-co-trimethylene carbonate)*. J Biomed Mater Res, 2002. **61**(1): p. 53-60.
218. Chin, L., et al., *Characterization of and host response to tyramine substituted-hyaluronan enriched fascia extracellular matrix*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(6): p. 1465-77.
219. Marcos-Garcés, V., et al., *Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study*. J Anat, 2014. **225**(1): p. 98-108.
220. van Zuijlen, P.P., et al., *Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment*. J Pathol, 2002. **198**(3): p. 284-91.
221. Cerrada, I., *Efecto de la citoquina pro-inflamatoria Interleuquina-1b (IL-1b) y del factor de transcripción inducible por hipoxia-1a (HIF-1a) en la supervivencia y potencial terapéutico de las células madre mesenquimales*, in *Ciencias Biomédicas*. 2012, Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad Cardenal Herrera (CEU).
222. Gao, X.M., et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 330-8.
223. Morris, F. and W.J. Brady, *ABC of clinical electrocardiography: Acute myocardial infarction-Part I*. BMJ, 2002. **324**(7341): p. 831-4.
224. De Castro, M., et al., *Biocompatibility and in vivo evaluation of oligochitosans as cationic modifiers of alginate/Ca microcapsules*. J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(4): p. 1119-30.
225. Veisoh, O., et al., *Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates*. Nat Mater, 2015. **14**(6): p. 643-51.
226. Bryan, N., N.P. Rhodes, and J.A. Hunt, *Derivation and performance of an entirely autologous injectable hydrogel delivery system for cell-based therapies*. Biomaterials, 2009. **30**(2): p. 180-8.
227. Elvira, C., et al., *Polímeros biodegradables en medicina: diseño estructural y desarrollo de materiales*. Revista de Plásticos Modernos, 1999. **77**(511): p. 49-59.
228. Reyes Melo, M.E., *Ingeniería y biomateriales*. Vol. 16. 2013.
229. Rane, A.A. and K.L. Christman, *Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: a 5-year update*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(25): p. 2615-29.
230. Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.

231. Duque Correa, M.A. and M. Rojas López, *Alternative macrophage activation: the diversity of one cell involved in innate immunity in response to its environmental complexity*. *Inmunología*, 2007. **26**(2): p. 73-86.
232. Heo, D.N., et al., *Development of nanofiber coated indomethacin-eluting stent for tracheal regeneration*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011. **11**(7): p. 5711-6.
233. Piao, H., et al., *Effects of cardiac patches engineered with bone marrow-derived mononuclear cells and PGCL scaffolds in a rat myocardial infarction model*. *Biomaterials*, 2007. **28**(4): p. 641-9.
234. Sekiya, N., et al., *Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. **138**(4): p. 985-93.
235. Mias, C., et al., *Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction*. *Stem Cells*, 2009. **27**(11): p. 2734-43.
236. Asran, A.S.h., et al., *Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin*. *Biomacromolecules*, 2010. **11**(12): p. 3413-21.
237. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. *Acta Biomater*, 2009. **5**(1): p. 1-13.
238. Zaragoza, C., et al., *Animal models of cardiovascular diseases*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 497841.
239. Dewald, O., et al., *A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **52**(5): p. 305-11.
240. van Amerongen, M.J., et al., *Cryoinjury: a model of myocardial regeneration*. *Cardiovasc Pathol*, 2008. **17**(1): p. 23-31.
241. SELYE, H., et al., *Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat*. *Angiology*, 1960. **11**: p. 398-407.
242. Fujimoto, K.L., et al., *An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(23): p. 2292-300.
243. Chachques, J.C., et al., *Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM trial): clinical feasibility study*. *Ann Thorac Surg*, 2008. **85**(3): p. 901-8.
244. Tan, M.Y., et al., *Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits*. *Biomaterials*, 2009. **30**(19): p. 3234-40.

245. Danoviz, M.E., et al., *Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12077.
246. Freytes, D.O., L. Santambrogio, and G. Vunjak-Novakovic, *Optimizing dynamic interactions between a cardiac patch and inflammatory host cells*. Cells Tissues Organs, 2012. **195**(1-2): p. 171-82.
247. Gupta, M.K., et al., *Combinatorial polymer electrospun matrices promote physiologically-relevant cardiomyogenic stem cell differentiation*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28935.
248. Gallico, G.G., et al., *Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium*. N Engl J Med, 1984. **311**(7): p. 448-51.
249. Lu, G. and S. Huang, *Bioengineered skin substitutes: key elements and novel design for biomedical applications*. Int Wound J, 2013. **10**(4): p. 365-71.
250. Blackwood, K.A., et al., *Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3091-104.
251. Kumbhar, S.G., et al., *Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(30): p. 4100-7.
252. Pan, H., H. Jiang, and W. Chen, *Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide*. Biomaterials, 2006. **27**(17): p. 3209-20.
253. Chong, E.J., et al., *Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution*. Acta Biomater, 2007. **3**(3): p. 321-30.
254. Kobsa, S., et al., *An electrospun scaffold integrating nucleic acid delivery for treatment of full-thickness wounds*. Biomaterials, 2013. **34**(15): p. 3891-901.
255. Duan, B., et al., *Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro*. J Biomater Sci Polym Ed, 2007. **18**(1): p. 95-115.
256. Zhou, Y., et al., *Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration*. Biomacromolecules, 2008. **9**(1): p. 349-54.
257. Powell, H.M. and S.T. Boyce, *Wound closure with EDC cross-linked cultured skin substitutes grafted to athymic mice*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1084-92.
258. Guo, R., et al., *Substrate modulus of 3D-printed scaffolds regulates the regenerative response in subcutaneous implants through the macrophage phenotype and Wnt signaling*. Biomaterials, 2015. **73**: p. 85-95.

259. Lucas, T., et al., *Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3964-77.
260. Mimura, K.K., et al., *Mechanisms underlying heterologous skin scaffold-mediated tissue remodeling*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35074.
261. Castellano, D., et al., *A comparison of electrospun polymers reveals poly(3-hydroxybutyrate) fiber as a superior scaffold for cardiac repair*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(13): p. 1479-90.
262. Powell, H.M. and S.T. Boyce, *Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(8): p. 2177-87.

PUBLICACIONES

Durante la realización de esta tesis doctoral, se han publicado los siguientes artículos, que contienen parte de los resultados expuestos en la misma:

Castellano D, Blanes M, Marco B, Cerrada I, Ruiz-Saurí A, Pelacho B, Araña M, Montero JA, Cambra V, Prosper F, Sepúlveda P. A comparison of electrospun polymers reveals poly(3-hydroxybutyrate) fiber as a superior scaffold for cardiac repair. *Stem Cells Dev*, v. 23, n. 13, p. 1479-90, Jul 2014. ISSN 1557-8534.

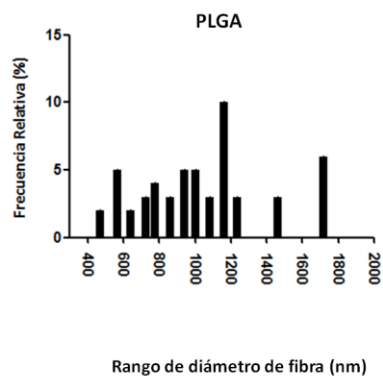
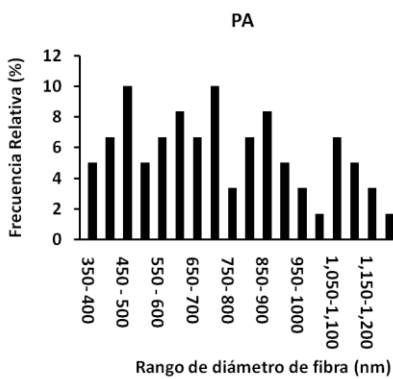
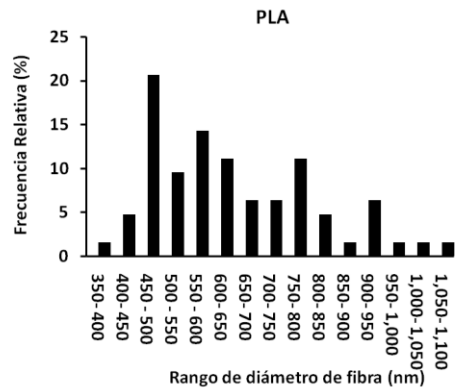
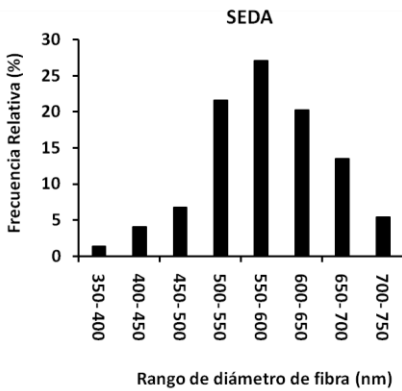
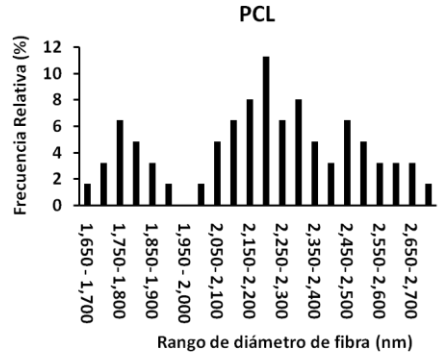
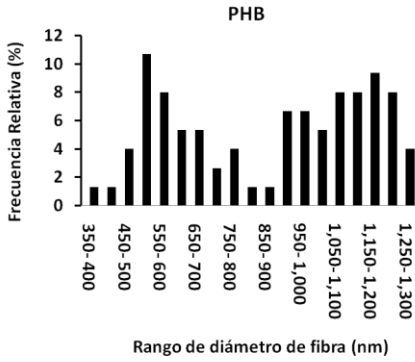
Harvey E, Zhang H, Sepúlveda P, Garcia SP, Sweeney D, Choudry FA, Castellano D, Thomas GN, Kattach H, Petersen R, Blake DJ, Taggart DP, Frontini M, Watt SM, Martin-Rendon E. Potency of Human Cardiosphere-Derived Cells from Patients with Ischemic Heart Disease Is Associated with Robust Vascular Supportive Ability. *Stem Cells Transl Med*, v. 6, n. 5, p. 1399-1411, May 2017. ISSN 2157-6564.

Castellano D, Sanchis A, Blanes M, Pérez Del Caz MD, Ruiz-Saurí A, Piquer-Gil M, Pelacho B, Marco B, Garcia N, Ontoria-Oviedo I, Cambra V, Prosper F, Sepúlveda P. Electrospun poly(hydroxybutyrate) scaffolds promote engraftment of human skin equivalents via macrophage M2 polarization and angiogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*, v. 12, n. 2, p. e983-e994, Feb 2018. ISSN 1932-7005.

Gil-Castell O, J.D. Badia JD, Ontoria-Oviedo I, Castellano D, Marco B, Rabal A, Bou JJ, Serra A, Monreal L, Blanes M, Sepúlveda P, Ribes-Greus A. In vitro validation of biomedical polyester-based scaffolds: Poly(lactide-coglycolide) as model-case. *Polymer Testing*, v. 66, Pages 256-267, April 2018.

ANEXOS

ANEXO 1. Caracterización de los BM. Diámetro de las fibras de cada tipo de BM.



ANEXO 2. Consentimiento para toma de muestras de piel humana

HOJA INFORMATIVA AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS VIVOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE ELECTROHILATURA.

RESPONSABLES INVESTIGACIÓN: Dra. M^a Dolores Pérez del Caz de la Unidad de Quemados del Hospital La Fe de Valencia y la Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis del Centro de Investigación del Hospital La Fe de Valencia.

1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a Ud. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica, en el que se le invita a participar.

Nuestra intención es tan sólo que Ud. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio.

Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar, o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio consiste en generar piel artificial para su posible uso en pacientes con quemaduras graves. Su participación en el estudio solo supondrá la utilización de una muestra dérmica extraída en quirófano y que vaya a ser desechada. La finalidad es obtener queratinocitos y fibroblastos dérmicos a partir de células madre pluripotentes (célula que puede convertirse en varios tipos diferentes de células o tejidos del cuerpo).

El estudio durará 3 años, si bien su participación será solo durante el intervalo de tiempo que permanezca ingresado.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

La participación en este estudio en ningún momento podrá comportar riesgo adicional para su salud.

Se espera obtener un mayor conocimiento de su enfermedad, lo que podría aportar beneficio para otros pacientes y para usted.

5. CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio / colaboradores podrán relacionar dichos datos con Usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones¹, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio / colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país.

Las muestras de tejido permanecerán bajo la responsabilidad de los investigadores del estudio la Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis y la Dra. M^a Dolores

Pérez del Caz, donde se encuentra ubicado el sistema de congelación durante un máximo de 12 meses tras su obtención para el procesamiento.

En caso de que se quieran utilizar los datos obtenidos en el presente estudio para investigaciones futuras (con objetivos diferentes a los del presente estudio) se deberá solicitar en ese momento el consentimiento del paciente, utilizando una hoja informativa independiente, previamente autorizada por el Comité Ético de Investigación Biomédica.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,.....,

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del participante:

ANEXO 3. Resumen gráfico de la obtención de un ED con BM y de su injerto en ratones inmunodeprimidos