

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Estudio de la seguridad de velos de electrohilatura con diferente base polimérica para el tratamiento de úlceras diabéticas

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Laura Martínez Rachadell

TUTOR/A: M^a Desamparados Pascual-Ahuir Giner

COTUTOR/A: Pilar Sepúlveda Sanchís

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, 07/07/17

RESUMEN PARA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

D.^a **Laura Martínez Rachadell**

Del Trabajo Fin de Máster titulado:

**Estudio de la seguridad de velos de electrohilatura con diferente base polimérica
para el tratamiento de úlceras diabéticas**

Aporta el siguiente **RESUMEN**:

Introducción: La piel constituye la primera barrera de defensa frente a los organismos patógenos del ambiente. Cualquier daño que provoque la pérdida de su integridad debe ser resuelto con rapidez en un proceso conocido como cicatrización. En personas sanas, esto ocurre en cuatro etapas relacionadas, aunque diferentes: la coagulación, inflamación, nueva formación de tejido y remodelación, las cuales tienen una duración determinada en el tiempo. Uno de los principales problemas asociados con la diabetes es precisamente la alteración de este proceso, concretamente lo que ocurre es una persistencia de la fase inflamatoria que llega a convertirse en patológica generándose lo que se conoce como úlcera diabética. Las primeras técnicas empleadas se basaban en curas diarias y en el uso de vendajes que no dejaban transpirar la piel y no favorecían la cicatrización de las heridas. En la actualidad y, gracias a los avances en ingeniería tisular junto con el desarrollo de nuevos materiales compatibles con su aplicación dérmica han permitido avanzar en el desarrollo de nuevas metodologías. A esto se le suma el descubrimiento de los compuestos lipídicos pro-resolutivos y su papel en la regeneración tisular que, combinados con los anteriores han permitido crear nuevos apósitos con mejores resultados.

Materiales y métodos: La toxicidad de los compuestos candidatos para su aplicación dérmica, se testó *in vitro* mediante un ensayo colorimétrico en dos tipos celulares: fibroblastos procedentes de biopsias de piel y queratinocitos (HaCat). Para comprobar su efecto *in vivo* se aplicaron de manera subdérmica en un grupo de 9 ratones de la cepa C57BL/6J. Para testar el compuesto lipídico experimental con el propósito de ser utilizado junto con el biomaterial candidato, se realizó de nuevo un estudio, pero en este caso para comprobar si mejoraba los resultados proporcionados por otro ya comercializado. Este compuesto pertenece a la familia de los ácidos grasos $\omega 3$ y no presenta toxicidad conocida. Para determinar tanto su efecto regenerativo como la dosis y el tiempo de administración, se utilizaron cohortes de 15 ratones de la cepa R/BKS.CG-M ++ LEPR DB/J tratados de manera diferencial.

Resultados: De los compuestos candidatos estudiados tanto *in vivo* como *in vitro*, el que mejores resultados presenta en términos de proliferación celular es el alginato. El PVP tampoco muestra toxicidad, aunque sí que promueve menos el crecimiento mientras que el quitosano no ofrece los resultados esperados y en principio no fue considerado como apto para su aplicación. Con respecto al ensayo *in vivo* del compuesto lipídico, determinamos que la dosis de 100ng es la que muestra mejores resultados si la comparamos con el compuesto comercial y con las demás dosis (50 y 300ng) y que debe administrarse a las heridas diariamente.

Conclusiones: Se postula por tanto que el alginato es el precursor candidato para ser utilizado en regeneración tisular junto con el compuesto lipídico a una concentración de 100ng aplicado diariamente.

Palabras clave: úlcera diabética, *wound healing*, biomateriales, compuestos lipídicos

Valencia, 07/07/2014

EL(LA) ALUMNO(A)

Fdo.: D./D.^a **Laura Martínez Rachadell**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.E.T.S.I.A.M.S
Camino de Vera, s/nº. 46022 VALENCIA • Tel +34963877420 • Fax+3463877429

**SUMMARY FOR MASTER'S DEGREE IN BIOMEDICAL BIOTECHNOLOGY FINAL PROJECT
PRESENTATION**

Mrs. Laura Martínez Rachadell

Author of the Master's degree Project entitled

**Study of the safety of electroweave veils with different polymer base for the
treatment of diabetic ulcers**

Presents the following **SUMMARY**:

Background: The skin is the first defence barrier against environmental pathogens. Any damage that causes the loss of its integrity must be solved quickly in a process known as healing. In healthy people, this occurs in four related but different stages: coagulation, inflammation, new tissue formation and remodeling, which have a duration determined in time. One of the main problems associated with diabetes is precisely the alteration of this process, specifically what happens is a persistence of the inflammatory phase that becomes pathological resulting in what is known as diabetic ulcer. The first techniques used were based on daily cures and the use of bandages that did not leave the skin perspiration and did not promote the healing of wounds. Nowadays, thanks to advances in tissue engineering and the development of new materials compatible with dermal application, they have made it possible to develop new methodologies. Added to this is the discovery of the pro-operative lipid compounds and their role in tissue regeneration, which, combined with the previous ones, have allowed the creation of new dressings with better results.

Methods: The toxicity of candidate compounds for dermal application was tested in vitro by a colorimetric assay in two cell types: fibroblasts from skin biopsies and keratinocytes (HaCat). To monitor their in vivo effect, they were applied subdermally

to a group of 9 mice from the C57BL / 6J strain. To test the experimental lipid compound for the purpose of being used together with the candidate biomaterial, a study was again carried out, but in this case, to check whether the results provided by another already commercialized improved. This compound belongs to the family of the fatty acids w3 and does not present known toxicity. To determine both their regenerative effect and dose and time of administration, cohorts of 15 mice of the R / BKS.CG-M + / + LEPR DB / J strain treated differentially were used.

Results: Of the candidate compounds studied both in vivo and in vitro, the best results in terms of cell proliferation is alginate. PVP also shows no toxicity, although it does promote growth less, while chitosan does not offer the expected results and was not considered suitable for its application. With respect to the in vivo test of the lipid compound, we determined that the dose of 100ng is the one that shows the best results if we compare it with the commercial compound and with the other doses (50 and 300ng) and that it should be administered to the wounds daily.

Conclusions: It is postulated therefore that alginate is the candidate precursor to be used in tissue regeneration together with the lipid compound at a concentration of 100ng applied daily.

Key words: Diabetic ulcer, wound healing, biomaterials, lipid compounds

Valencia, 07/07/2014

EL(LA) ALUMNO(A)

Fdo.: D./D.^a: **Laura Martínez Rachadell**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.E.T.S.I.A.M.S
Camino de Vera, s/nº. 46022 VALENCIA • Tel +34963877420 • Fax+3463877429

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1	Cicatrización de heridas.....	1
1.1.1	Fases de la cicatrización.....	1
1.1.2	Mecanismos moleculares.....	4
1.2	Problemas de la cicatrización en diabéticos.....	6
1.3	El papel de los compuestos lipídicos pro-resolutivos.....	7
1.3.1	Fundamento teórico.....	7
1.3.2	Biomateriales.....	8
2	Objetivos.....	10
3	Materiales y métodos.....	11
3.1	Obtención de los precursores.....	11
3.2	Líneas celulares.....	11
3.2.1	Medios de cultivo.....	11
3.3	Estudios <i>in vitro</i>	12
3.3.1	Descongelación celular.....	12
3.4	Mantenimiento de las líneas celulares: pase celular.....	12
3.5	Recuento celular mediante cámara Bürker.....	12
3.6	Ensayo de viabilidad celular.....	13
3.7	Estudios <i>in vivo</i>	14
3.7.1	Animales.....	14
3.7.2	Modelo subdérmico.....	14
3.7.3	Modelo <i>wound healing</i>	14
3.8	Técnicas histológicas.....	15
3.8.1	Fijación, inclusión y seccionamiento de tejidos.....	15
3.8.2	Tinciones.....	16
4	Resultados y discusión.....	16
5	Conclusión.....	36
6	Agradecimientos.....	38
7	Bibliografía.....	38

Abreviaturas

DDA: del inglés, *Degree of Deacetylation*

DHA: del inglés, *Docosahexaenoic acid*

DMEM: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: del inglés, *Dimethyl sulfoxide*

EGF: del inglés, *epidermal growth factor*

EPA: del inglés, *Eicosapentaenoic acid*

FBS: del inglés, *fetal bovine serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF2: del inglés *fibroblast growth factor 2*.

HB-EGF: del inglés, *heparin bindin EGF-like growth factor*

HGF: del inglés, *hepatocyte growth factor*

M.C: Medio de cultivo

ME: Matriz extracelular

MMP's: metaloproteinasas

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

PDGF: del inglés, *platelet-derived growth factor*

PCL: Polycaprolactona

PGA: del inglés, *poly (glycolic acid)*

PLA: del inglés poly (*lactic acid*)

PPAR: del inglés, *peroxisome-proliferator-activated receptors*

PUFAs del inglés, *polyunsaturated fatty acids*

PVP: Polivinilpirrolidona

SPMs: del inglés, *specialized pro-resolution molecules*

T/E: Tripsina/Estreptomicina

TGF- β : del inglés, *Transforming growth factor beta*

OMS: Organización mundial de la salud

FGF2R-IIIb: del inglés, *Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2*

PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*

VEGFA: del inglés, *vascular endothelial growth factor A*

1. Introducción

1.1 *Cicatrización de heridas*

La piel de una persona adulta está constituida por dos capas diferentes de tejido: una epidermis queratinizada con epitelio plano estratificado, y la dermis, más gruesa (20-30 veces más) y situada por debajo de la anterior. Ésta última es rica en colágeno y proporciona soporte y nutrientes al resto de células. La dermis está compuesta a su vez por dos capas: la papilar o superior, constituida por tejido conectivo laxo, y la reticular o profunda, formada por tejido conectivo fibroso y elástico.

Dado que la piel constituye una primera barrera de protección, toda alteración que rompa su integridad, debe ser resuelta con rapidez. Esto último se consigue gracias al proceso de cicatrización que comienza con la formación de un coágulo para taponar la herida. A partir de entonces, se inician una serie de etapas en las que se reconstituye el tejido perdido. Para ello, participa todo el conjunto de células inflamatorias, así como los fibroblastos y capilares, que invaden el coágulo formando un tejido contráctil que delimita la zona de la herida.

Esto da lugar a unos bordes formados por tejido epidérmico nuevo que comienzan a migrar de fuera hacia adentro, hasta cubrir la zona desnuda (Clark, 1988). Al finalizar el proceso, se genera una cicatriz de tejido conectivo con poco contenido de colágeno. La mayoría de las lesiones que sufre la piel, se resuelven eficazmente en un par de semanas. Sin embargo, algunos de los componentes que se han perdido no se regeneran y, como consecuencia, se visualiza un resultado imperfecto y poco estético.

1.1.1 Fases de la cicatrización

El proceso de cicatrización puede ocurrir de dos maneras diferentes: por intención primaria, si se cierra con suturas, o por intención secundaria, si se deja que repare sola. En este último caso, el tejido se restaura gracias a la formación de tejido conectivo nuevo y por recrecimiento de epitelio.

En todos los sistemas de órganos en mamíferos, la respuesta normal al daño ocurre en 4 fases superpuestas, pero distintas, que son: la coagulación, inflamación, nueva formación de tejido y remodelación. Éstas deben tener lugar

en la secuencia y el tiempo apropiado para que el proceso se considere exitoso.

Coagulación: En esta etapa se produce la formación de un coágulo que sirve como escudo protector provisional del tejido descubierto. Proporciona una matriz sobre la cual las células pueden migrar para iniciar la reparación. El coágulo está formado por plaquetas embebidas en fibras entrelazadas de fibrina obtenidas del fibrinógeno por la acción de la trombina, junto con pequeñas cantidades de fibronectina, vitronectina y trombospondina (Clark, 1988). Este coágulo sirve además como reservorio de las citoquinas y factores de crecimiento liberados en la degranulación de las plaquetas que, a su vez, actúan como señales quimiotácticas para reclutar células inflamatorias circulantes al sitio de la herida iniciando así el proceso de reepitelización y contracción del tejido conectivo y la angiogénesis.

Inflamación: El daño producido en el tejido, genera la disrupción de los vasos sanguíneos y la extravasación de leucocitos inflamatorios. Los neutrófilos son las primeras células que llegan a la zona del tejido dañado en respuesta a la

liberación de mediadores vasoactivos y factores de crecimiento por parte de la matriz de fibrina. La activación de la vía del complemento y la degranulación de las plaquetas junto con la consiguiente liberación de mediadores como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y los productos de la degradación bacteriana, también contribuyen a dicho proceso (Grose and Werner, 2004). Aunque inicialmente se pensaba que la función de estas células era únicamente la de limpiar la herida de partículas extrañas y bacterias, hoy en día se sabe que también liberan citoquinas pro-inflamatorias que actúan como señales tempranas que activan a los fibroblastos y queratinocitos locales (Hübner *et al.*, 1996).

A menos que haya infección, el número de neutrófilos cae por la acción fagocítica de los macrófagos. Éstos se van acumulando en el sitio de la herida gracias a la incorporación de monocitos que comienzan a activarse e inician la granulación del tejido (Figura 1a).

Estas células se unen a proteínas específicas de la matriz extracelular a través de integrinas y se encargan de la fagocitosis de organismos patógenos.

Tras ser activados, los macrófagos liberan una nueva batería de citoquinas y factores de crecimiento que amplifican las ya iniciadas por la degranulación de las plaquetas y los neutrófilos.

Formación de tejido nuevo: Es la tercera fase y tiene lugar 2-10 días después del daño. Se caracteriza por la proliferación y la migración de distintos tipos celulares (Figura 1b). Esto último lo inician los queratinocitos localizados por debajo de la dermis dañada. De forma simultánea, se forman nuevos vasos sanguíneos en un proceso conocido como angiogénesis (Werner and Grose, 2003) bajo la acción de dos reguladores positivos importantes: el VEGFA y el FGF2.

Los primeros capilares que se forman, están asociados con fibroblastos y macrófagos y sustituyen la matriz de fibrina granulada por un nuevo sustrato para la migración de más queratinocitos. En la última parte de esta etapa, los fibroblastos que han migrado desde el borde de la herida o de la médula ósea son estimulados por los macrófagos y, algunos de ellos, se diferencian a miofibroblastos (Opalenik and Davidson,

2005). Estos últimos son células contráctiles que interaccionan con los fibroblastos y producen matriz extracelular (ME), principalmente de colágeno, que en última instancia forma la mayor parte de la cicatriz (Werner, Krieg and Smola, 2007).

Remodelación: Es la última etapa y comienza pasadas 2-3 semanas tras originarse el daño. Todos los procesos ya iniciados cesan y la mayoría de las células endoteliales, los macrófagos y miofibroblastos entran en apoptosis o salen de la herida dejando una masa que contiene pocas células y que está compuesta principalmente por colágeno y otras proteínas de la ME (Figura 1c).

Con el paso del tiempo y hasta aproximadamente un año, dicha matriz pasa de estar principalmente compuesta por colágeno tipo III a estarlo por colágeno tipo I (Lovvorn *et al.*, 1999) en un proceso llevado a cabo por metaloproteinasas (MMP's) que son secretadas por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales. Aunque de esta forma el tejido se repara, no recupera sus propiedades iniciales (Levenson *et al.*, 1965).

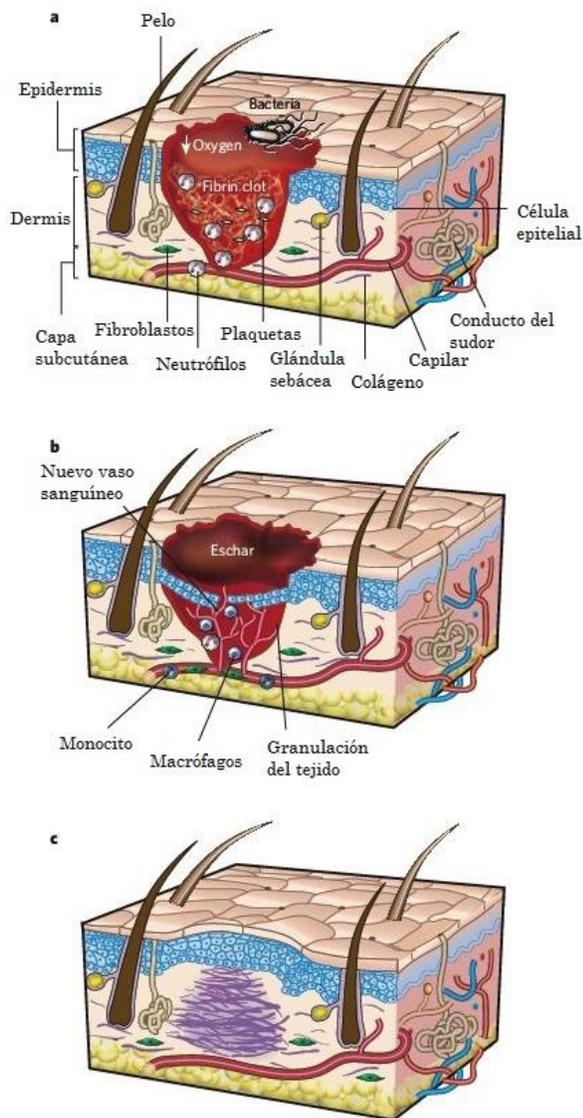


Figura 1: **Fases normales del proceso de cicatrización.** (a) inflamación (b) formación de tejido nuevo (c) remodelación. La formación del coágulo sucede previa a la inflamación (Gurtner *et al.*, 2008).

Las heridas crónicas suelen fallar en el progreso a través de estos 4 estadios y arrastran una fase de inflamación que no se resuelve y avanza hasta convertirse en patológica. Esto genera un bucle descontrolado que es retroalimentado de forma positiva (Figura 2). Los

neutrófilos son activados y se inicia la liberación de enzimas y la degradación del tejido.

Este nuevo ambiente favorece la atracción de nuevos neutrófilos que continúan el ciclo. Además, la concentración de MMP's aumenta y la disfunción de los queratinocitos y fibroblastos es aparente ya que no son capaces de generar ME debido a que la degradación del colágeno es mayor que su síntesis. A esto se le suman las especies de oxígeno reactivas y una neuropatía e hipoxia. Todos estos procesos activos, interrumpen la cicatrización y conducen a un estado crónico conocido como úlcera (Menke *et al.*, 2008)

1.1.2 Mecanismos moleculares

De las proteínas que intervienen en el proceso de reepitelización, destacan algunas procedentes de la ME y sus receptores, proteasas, proteínas del citoesqueleto y enzimas que participan en el balance redox (Raja *et al.*, 2007). Los factores de crecimiento y algunas hormonas también son muy importantes. Ambos actúan sobre dianas que son clave en la reparación de la dermis y epidermis dañadas (Figura 3).

Factores de crecimiento: Destaca el factor de crecimiento hepático (HGF). Éste actúa uniéndose y activando el gen *MET*, que codifica para un receptor tirosina quinasa importante en el desarrollo embrionario, la organogénesis y la cicatrización de heridas (Chmielowiec *et al.*, 2007). Los ratones con queratinocitos deficientes en este gen, tienen una baja reepitelización en respuesta a una herida en la piel.

Otros factores que regulan el proceso de forma positiva (Figura 3), son los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Dentro de estos, destacan los ligandos del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF2_R-IIIb).

Sin embargo, otros compuestos de esta misma familia, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), regulan el proceso negativamente.

Por último, también se ha visto que los queratinocitos muestran niveles elevados de varios miembros de la familia del receptor EGF (EGF_R) los cuales intervienen en la formación de tejido nuevo (Figura 3) siendo particularmente importante el factor de crecimiento ligado a heparina (HB-EGF) (Shirakata *et al.*, 2005). Estos reguladores son asimismo ligandos de diversos receptores tirosina-quinasa, cuya activación es capaz de estimular la migración, proliferación y supervivencia de los queratinocitos.

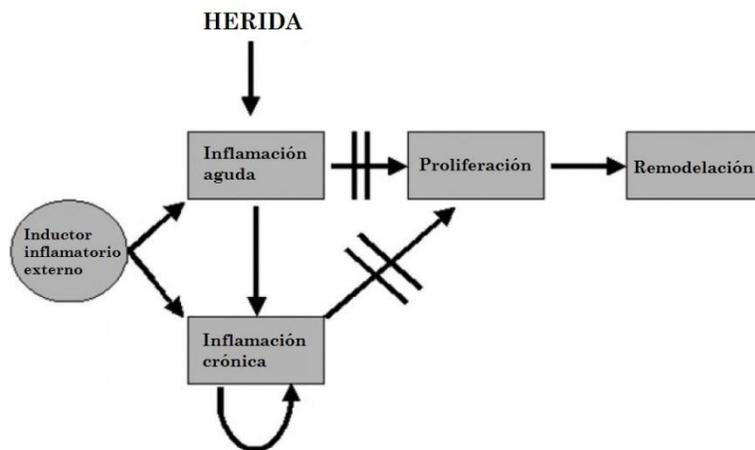


Figura 2: **Bucle inflamatorio.** En las heridas crónicas, el estado de inflamación se arrastra durante el proceso y no progresa a través de las etapas normales de la cicatrización. (Menke *et al.*, 2007)

Hormonas y otros factores: A parte de los factores de crecimiento anteriormente comentados, hay diversas moléculas de baja masa molecular que también actúan como mediadores y reguladores de la reepitelización del tejido dañado. Un ejemplo es la acetilcolina y sus receptores que son producidos por los queratinocitos.

Éstos generan un bucle autocrino que regula positivamente (receptores muscarínicos del subtipo M4) o negativamente (receptores M3) la migración de este tipo celular. Esta regulación autocrina negativa, también es controlada por las catecolaminas y sus receptores producidos por los queratinocitos.

Otras moléculas que participan en este proceso, son los ácidos grasos poliinsaturados y derivados. Ambos son capaces de actuar sobre los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR's) y tienen un papel importante en la regulación de la reepitelización. Concretamente, PPAR- α y PPAR- β (en conjunto PPAR- γ) están sobreexpresados en los queratinocitos tras el daño (Pullar *et al* , 2006).

1.2 Problemas de la cicatrización en diabéticos

La diabetes mellitus es una alteración metabólica crónica cuya prevalencia se ha incrementado muy rápidamente en todo el mundo. Aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no la utiliza eficazmente. En base a esto distinguimos dos variantes de la misma:

- **Diabetes tipo 1:** se produce la destrucción de las células β del páncreas debido a un trastorno autoinmune. Como consecuencia se genera una deficiencia absoluta en la producción de insulina (Katzung and Trevor, 2011).
- **Diabetes tipo 2:** Es la forma más común en la que se manifiesta la enfermedad. Se caracteriza por una hiperglucemia, resistencia a la insulina y deficiencia relativa de la misma. Su desarrollo se debe a factores genéticos y a un estilo de vida sedentario junto con la obesidad y el consumo de sustancias tales como alcohol y tabaco

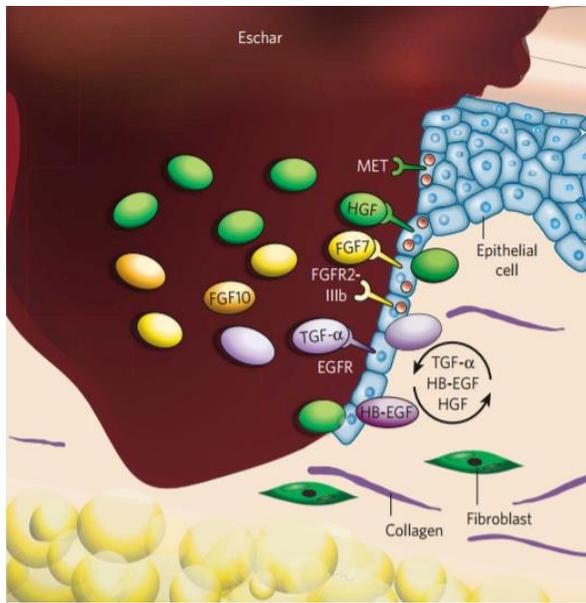


Figura 3: **Proceso de re-epitelización.** Se observan los factores de crecimiento que estimulan la re-epitelización de la herida HGF, que se une a MET; FGF7 y FGF10 que se unen a FGFR2-IIIb, y ligandos del EGFR como el TGF- α y HB-EGF. Las vías de señalización iniciadas activan los factores de transcripción transductor y activador STAT3 y las proteínas AP1), que ayudan a regular la re-epitelización de la herida (Gurtner *et al.*, 2008)

La insulina es una hormona que regula la cantidad de azúcar presente en la sangre y por ello su defecto produce hiperglucemia. Según datos de la organización mundial de la salud (OMS) en 2014, el 8,5% de los adultos tenía diabetes. En el año 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la enfermedad, registraron 2,2 millones más con los niveles de glucemia altos. Todo esto permite afirmar que en 2030 habrá 552 millones más de adultos con la patología, aumentando un 42,4% en América y un 20% en Europa.

La úlcera ha sido la complicación más estudiada de la enfermedad, sobre todo en el tipo 2 por ser en el que más ampliamente se manifiesta. Hoy en día, el diagnóstico y la clasificación de estas úlceras se basa en el sistema Wagner y la universidad de Texas (Eldor *et al.*, 2004). El tratamiento que utiliza se basa en vendajes y curas diarias para eliminar cualquier resto de tejido necrótico. Sin embargo, los resultados no siempre son buenos y un 14-20% de los pacientes con diabetes resultan en la amputación del miembro afectado.

1.3 El papel de los compuestos lipídicos pro-resolutivos

1.3.1 Fundamento teórico

En los últimos años, la inflamación no resuelta de algunos tipos de heridas ha supuesto un grave problema. Tanto es así, que se ha convertido en objeto de estudio tanto a nivel molecular como celular (Samuelsson, 2012). Esto ha hecho posible la identificación de nuevos mediadores químicos como péptidos, los ácidos grasos poliinsaturados y ciertas quimioquinas y citoquinas que modulan y reducen la inflamación aguda (Serhan and Petasis, 2011).

El fin de la inflamación y la consiguiente vuelta a la homeostasis, es regulada por la biosíntesis activa de compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's). Éstos se sintetizan de forma endógena y reciben el nombre de mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs) (Serhan, 2007, 2014). De éstos, la familia de lipoxinas que derivan del ácido araquidónico ($\omega 6$) fue la primera que se descubrió.

Actualmente, se han identificado nuevos SPMs, como las resolvinas, que son biosintetizados a partir de ácidos grasos $\omega 3$ como el ácido eicosapentaenoico (EPA). Dichos mediadores, requieren de la presencia de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa para su síntesis. Las resolvinas de la serie E derivan del EPA (Serhan *et al.*, 2000) mientras que las de la serie D, junto con las protectinas y maresinas, son biosintetizados a partir del ácido docosahexaenoico (DHA) (Dalli *et al.*, 2015).

1.3.2 Biomateriales

Los biomateriales son sustancias no tóxicas y adaptadas a los sistemas vivos. Los hay de distinta naturaleza (Tabla 1) y se utilizan principalmente para

reemplazar tejidos u órganos dañados (Rakhorst and Ploeg, 2008). Son capaces de mantener el contacto con los fluidos y tejidos corporales teniendo adversas mínimas (Henness and Ben-Nissan, 2004).

La cicatrización de heridas y los biomateriales se relacionan entre sí por la respuesta tisular a su implante (Kindt *et al.*, 2007). Esto surge con el nacimiento de la ingeniería de tejidos en 1987 como alternativa al trasplante tradicional de órganos (Lanza, Langer and Vacanti, 2007). El objetivo que persiguen es sanar la herida en el menor tiempo posible reduciendo la infección y el dolor. El tratamiento será efectivo, si se reduce la cantidad de tejido necrótico y la invasión microbiana (Mayet *et al.*, 2014). Esto se intentaba con materiales simples que formaban parte de gasas o vendas para detener la hemorragia.

Actualmente, y gracias a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares y celulares del proceso de cicatrización, la ingeniería de tejidos utiliza nuevas estrategias de regeneración basadas en una mayor comprensión de los mecanismos moleculares y celulares del proceso de cicatrización.

Tabla 1: Clasificación de los biomateriales según su naturaleza en: naturales dentro de los cuales encontramos los polisacáridos y algunas proteínas, sintéticos y compuestos. Adaptada de (Aramwit, 2016)

Naturales	Polisacáridos	Se usan principalmente en forma de hidrogeles para tratar heridas de la piel y quemaduras. Pueden ser neutros, ácidos o básicos destacando la celulosa, el alginato y el quitosano respectivamente.
	Proteínas	Son los más utilizados. Destacan el fibrinógeno y el colágeno. Este último lo producen los fibroblastos y estimula la rápida cicatrización de las heridas.
Sintéticos	Son producidos de forma artificial y mimetizan a los compuestos biológicos. Destacan los poliésteres alifáticos por su elevada fuerza mecánica, propiedades flexibles y ser fáciles de procesar. Los ácidos poliláctico, poliglicólico, policaprolactona (PLA, PGA, PCL) y sus copolímeros, son algunos de los aprobados por la FDA para ser utilizados en el vendaje de heridas y regeneración tisular. Se producen normalmente usando una técnica conocida como <i>electrospinning</i> (Norouzi <i>et al.</i> , 2015)	
Compuestos	Son una mezcla formada por polímeros naturales o sintéticos o la combinación de ambos. Algunos de los que más se utilizan contienen quitosano, alginato o celulosa sobre todo en forma de hidrogeles.	

El objetivo más importante que se persigue es el diseño de los biomateriales como *scaffolds* que soporten las células y moléculas de señalización para la posterior regeneración del tejido.

La *National science fundation* los define como los materiales más apropiados para reparar, mantener y mejorar la función tisular (O'brien, 2011). En base a esto se han desarrollado dos metodologías: la estrategia *in vitro*, implica la siembra celular sobre los *scaffolds* que son posteriormente implantados en el tejido lesionado. El material

es degradado gradualmente y sólo el tejido generado es funcional. En la *in vivo* se busca el mismo resultado, pero en este caso, el biomaterial es implantado en la región dañada para estimular la infiltración de células vecinas responsables de la deposición de ME.

En el presente trabajo, se han utilizado 3 precursores con bases poliméricas diferentes. El quitosano, que es un compuesto de naturaleza polimérica soluble en medio ácido que se obtiene a partir de la desacetilación completa de la quitina. Es catiónico y lineal (Zhang

et al., 2011) y lo podemos encontrar de forma natural en las paredes celulares de las plantas y los hongos, así como en los exoesqueletos de algunos crustáceos (Lárez Velásquez, 2006). La presencia de grupos amina en su cadena polipeptídica, le otorga propiedades que lo convierten en un material muy versátil para su uso en biomedicina (Lárez Velásquez, 2003).

El alginato es un polisacárido localizado en algas como *L. hyperborea*. Está formado el ácido L- gularónico y el D-manurónico. En forma de sal, es soluble en agua (pH 3,5) y solventes orgánicos, pero es insoluble en soluciones con calcio. Su viscosidad aumenta con la concentración y a bajas temperaturas (Avendaño-Romero *et al.*, 2013)

Por último, el PVP, es un polímero soluble en agua, formado por cadenas de diversas vinilpirrolidonas. Se combina con otros biomateriales como el alginato para ser utilizado en cirugía periodontal y regeneración ósea (Macías-Hernández *et al.*, 2014). Favorece el crecimiento de fibroblastos, regula el proceso inflamatorio y acelera la cicatrización de heridas. Se usa de forma

local para las pérdidas cutáneas, úlceras vasculares y quemaduras (Penilla *et al.*, 2008).

La necesidad de materiales para el tratamiento de heridas en las cuales hay pérdida de dermis y epidermis hace necesario conocer las propiedades y los mecanismos de interacción de los mismos (Tabla 2), para así diseñar una buena estrategia de regeneración.

2 Objetivos

- Estudiar la toxicidad *in vitro* de los tres compuestos con los que se sintetizan los biomateriales (quitosano, alginato y PVP y del compuesto experimental.
- Estudiar la degradabilidad y el grado de inflamación que producen los biomateriales en un entorno dérmico, utilizando el modelo subdérmico de ratón.
- Determinar la dosis óptima *in vivo* del compuesto lipídico experimental en el modelo de *wound healing* en ratones diabéticos.

Tabla 2: Ventajas y desventajas de los biomateriales. Tabla adaptada de (Chaudhari *et al.*, 2016)

<i>Tipos</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<i>Porosos</i>	Permiten una buena secreción de la ME y la adhesión de nutrientes.	Las células se distribuyen de forma heterogénea.
<i>Fibrosos</i>	Su estructura permite la correcta adhesión y proliferación celular	Hay que modificar su superficie para poder adherir los compuestos.
<i>Hidrogeles</i>	Son los más biocompatibles y se desintegran de forma controlada	Resistencia mecánica limitada por las partes blandas
<i>Microesferas</i>	Son fáciles de fabricar y favorecen la migración celular	Los métodos empleados en su síntesis reducen la viabilidad celular
<i>Compuestos</i>	Mucha biodegradabilidad y con gran fuerza mecánica.	Con baja afinidad celular. También generan productos ácidos tóxicos
<i>Acelulares</i>	Con poca respuesta inflamatoria e inmune y resistencia mecánica alta.	Descelularización completa para evitar la respuesta inmune

3 Materiales y métodos

3.1 Obtención de los precursores

El alginato y el quitosano (Aitex®) se obtuvieron a partir de la evaporación de un disolvente por secado rápido, usando un gas calentado con un fluido atomizado con una técnica conocida como *spray drying* (Hall, 1988).

Por contra, el PVP (Aitex®), fue obtenido por electrohilatura. Esta metodología permite crear fibras a escala nanométrica gracias a la iteración de cargas eléctricas. Para ello hace uso de un campo eléctrico fuerte que se aplica entre dos polos opuestos, dotados por

un sistema de inyección y una placa metálica de potencial 0, donde se depositan las fibras (Jun *et al.*, 2000).

3.2 Líneas celulares

Se utilizaron dos tipos de células dérmicas: queratinocitos de la línea celular HaCat (Zen Bio Inc®). y fibroblastos obtenidos de la piel desechada de pacientes sanos sometidos a una cirugía de abdominoplastia. Ambas líneas se conservaron en criotubos mantenidos en nitrógeno líquido.

3.2.1 Medios de cultivo

Las células HaCat se crecieron en un medio de cultivo (M.C) compuesto

por DMEM bajo en glucosa (Fisher Scientific ®) suplementado con un 10% de FBS quelado, P/E 1% y gentamicina (50ug/ μ L). En el caso de los fibroblastos se crecieron en M.C con DMEM alto en glucosa suplementado como el anterior, pero con FBS sin quelar.

3.3 Estudios *in vitro*

3.3.1 Descongelación celular

El contenido de los criotubos se descongeló en un baño a 37°C. En condiciones estériles y con una pipeta Pasteur de plástico se añadió el M.C adecuado, gota a gota, hasta llenar el criotubo. Posteriormente, las células fueron trasvasadas a un falcon con 7ml de M.C y se centrifugaron a 400g durante 7min. Tras retirar el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en 5ml de M.C que se trasvasaron a un F75 junto con 10ml de M.C. Las células se incubaron a 37°C y trascurridas 24h, se realizó un cambio de medio.

3.4 Mantenimiento de las líneas celulares: pase celular

El M.C de las placas confluentes, se aspiró con una pipeta de vidrio conectada a una bomba de vacío. Después se añadieron 6mL de PBS para lavar los restos de M.C que pudieran quedar.

A continuación, se añadió 1mL de tripsina/EDTA 1x (T/E) a la placa y se incubó a 37°C (5% CO₂ y saturación de humedad) unos 2-3min para fibroblastos y 5min para HaCat.

A continuación, se añadieron 7mL de M.C por toda la placa, varias veces, para inactivar la T/E, aplicándolo con fuerza sobre la zona de adhesión. Tras resuspender varias veces, las células se recogieron en un falcon de 15ml y se centrifugaron a 400g, 5min. El *pellet* celular resultante se resuspendió en 1ml de M.C. A continuación, se procedió a realizar un recuento celular.

3.5 Recuento celular mediante cámara Bürker

La cámara de recuento utilizada consta de un cuadrado central (1mm²) dividido en 16 cuadrados medianos cada uno de ellos en su interior con 25 cuadrados pequeños (9 de ellos divididos por la mitad). Al colocar la muestra bajo el cubreobjetos, la suspensión celular alcanza una altura de 0,1mm (Figura 4). Si consideramos el cuadrado grande central, el volumen contenido en éste será de: 0,1 mm³ = 10⁻⁴ ml.

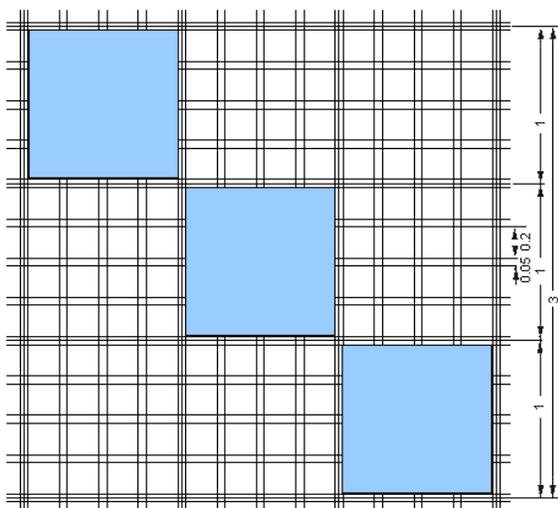


Figura 4: Diagrama de la cámara Bürker utilizada para el recuento celular

Para el recuento se cogieron 10µL de suspensión celular y se le añadió el mismo volumen de azul tripán. De los 20µL resultantes y tras resuspender vigorosamente, se cargaron 10µL en la cámara (dilución 1:2). Con el objetivo 10x se localizó la zona de recuento y con el de 40x se procedió a contar.

El recuento se hizo de acuerdo con el siguiente criterio: se contaron y sumaron todas las células que estaban dentro de dichos cuadros incluyendo las que tocaban los lados superior y derecho de los mismos. Tras contar tres cuadrados se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado} * 10^4 * 2$$

Figura 4: Fórmula para obtener la concentración celular. El resultado obtenido son células/ml

3.6 Ensayo de viabilidad celular

Para estudiar la citotoxicidad de los compuestos precursores de los bio-materiales, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Las células producen la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) gracias a la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Como producto se obtiene un compuesto azul (formazán) que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células. La viabilidad es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células HaCat y los fibroblastos fueron sembradas en placas de 96 pocillos (10.000cél/pocillo) y se crecieron en un incubador húmedo a 37°C (5% de CO₂) durante 24h. Transcurrido el tiempo, se retiró el MC, se lavaron los pocillos con 100µL de PBS y se añadieron los precursores a testar durante otras 24h en las condiciones anteriores. Se realizaron diluciones seriadas de los compuestos (1/5 para el alginato y 1/2 para el quitosano y el PVP). A continuación, se añadieron 100µL/pocillo de una disolución de MTT en M.C (dilución 1:11) y la placa se incubó 2h a 37°C.

Tras este tiempo, se retiró el M.C con el reactivo MTT y se analizó la viabilidad celular por absorbancia a 550nm tras añadir 100µL/pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO),

3.7 Estudios *in vivo*

3.7.1 Animales

Los ratones utilizados en modelo subdérmico y *wound healing* fueron de las cepas C57BL/6J y R/BKS.CG-M +/+ LEPR DB/J respectivamente. En ambos casos machos de 6-8 semanas y 200-250g. Se obtuvieron de la empresa Charles River Laboratories Inc.,

3.7.2 Modelo subdérmico

Para estudiar la reacción de los precursores en un entorno dérmico, se utilizó un total de 9 animales, 3 por cada grupo experimental (alginato, quitosano y PVP).

Todos los procedimientos llevados a cabo fueron previamente aprobados por el comité ético y de bienestar animal. Cada animal fue anestesiado con sevofluorano (1-2,5% y con O₂ 1L/min) administrado de manera inhalatoria a través de una mascarilla durante todo el procedimiento. Seguidamente, se les realizó un bolsillo de 2cm² en la zona

dorsal con ayuda de unas tijeras. A continuación, se les introdujo el compuesto a testar (20mg) pegado a la parte superior de la fascia muscular y no directamente en la musculatura (Castellano D., et al 2017). Al primer grupo se le implantó PVP, al segundo quitosano y al tercero alginato. Por último, la herida se cosió con hilo de sutura (Monosyn 3/0, B/Braun) y se trató con povidona yodada para crear un ambiente aséptico. Los ratones se mantuvieron separados en jaulas de forma individual durante 14 días.

Tras este tiempo los animales fueron sacrificados y se tomaron las muestras de piel que estuvieron en contacto con el compuesto para realizar la histología y su posterior análisis.

3.7.3 Modelo *wound healing*

Para ver el efecto del compuesto lipídico en la regeneración dérmica, se imitó la úlcera diabética en ratones y se estudió su evolución. Los animales fueron depilados 24h antes de la intervención y se alojaron de forma individual.

Al día siguiente se pasó a realizar la herida en el lomo del animal. Durante todo el proceso de la cirugía los

animales estaban anestesiados y analgésicos. Con la piel tensa, se les puso un anillo de silicona fijado con pegamento quirúrgico. A continuación, con un bisturí circular o *punch*, se realizó una escisión circular en la piel de 6mm en el área delimitada por la arandela.

A un grupo (n=3) se le administraron 15µL de una solución salina como control negativo. A otro grupo (n=3) un compuesto lipídico (Solutex®) de distinta concentración, diluido con la misma solución que los controles. Y al último (n=3) RvD1 como control positivo (*Cayman Chemical*). Dada la inestabilidad de este compuesto, se hicieron alícuotas de 4µL, conservadas a -80°. El compuesto se encontraba previamente diluido en EtOH absoluto (10µg en 100µL de etanol). Cada día antes de su uso, dicho disolvente se evaporó exponiéndolo a una corriente suave de N₂. A continuación se añadieron 60µL de suero salino y se homogeneizó con vórtex y sonicando durante 1min.

Las soluciones se aplicaron sobre la herida utilizando una pipeta. Para finalizar, las heridas se cubrieron con

una membrana semipermeable, adheridas al disco de silicona, sin tocar la zona de aplicación, pero manteniendo la humedad. Los compuestos se añadieron hasta el día 10 del ensayo.

Se realizó un seguimiento diario para limpiar las heridas con suero salino y aplicar de nuevo cada compuesto. Además, se tomaron imágenes para ver cómo iban cerrando y se midieron sus áreas para seguir su evolución. Estas tareas se realizaron diariamente hasta el sacrificio de los animales, a día 14. Para cuantificar las áreas se utilizó el programa Image J y los resultados se representaron en GraphPadPrism 5.

3.8 Técnicas histológicas

3.8.1 Fijación, inclusión y seccionamiento de tejidos

Las muestras de tejido (secciones transversales de la zona tratada) se obtuvieron tras el sacrificio de los animales a día 14. Todas ellas se mantuvieron durante 6 días en EtOH 70% que fue cambiado al día siguiente. Posteriormente se realizó el protocolo de inclusión (Tabla 3). Y las muestras quedaron incluidas (inclusor Leica EG 1150 H) en

parafina. Por último, se realizaron dos series de 10 cortes de 5 μm cada uno.

Tabla 3: Protocolo de inclusión para muestras procedentes de biopsias de piel. En cada paso, exceptuando los de parafina, se mantuvo una agitación de 100rpm.

Reactivos	Tiempo (h)
Etanol 80%	(2x)1
Etanol 96%	1
Etanol 96%	1,30
Etanol 100%	2
Etanol 100%	o/n
Xilol I	1,30
Xilol II	2,30
Parafina I	2
Parafina II	2,30

3.8.2 Tinciones

Los portaobjetos con los cortes en parafina, se desparafinaron (Tabla 4) para ser posteriormente teñidos con la tinción de hematoxilina/eosina (H/E) (Tabla 5).

Tabla 4: Protocolo de desparafinar. Tras completarlo, los portaobjetos se deben mantener en agua destilada hasta la tinción. o PBS 1X si se tiñe al día siguiente.

Reactivos	Tiempo (min)
Estufa 60°C	25-30
Xilol	(2x)10
Etanol 100%	(2x)10
Etanol 96%	10
Etanol 70%	10

Tabla 5: Protocolo de tinción para Hematoxilina/Eosina. Tras completar la tinción, los portaobjetos se montaron con DPX o Eukitt. Alcohol clorhídrico 1:200 en EtOH 70%. Agua amoniacal 15-20 gotas de amoniaco en agua del grifo

Hematoxilina de Harris durante 30s
Agua del grifo hasta lavar bien
Dos pases de alcohol clorhídrico
Agua del grifo hasta lavar bien
Cinco pases en agua amoniacal
Agua del grifo hasta lavar bien
Eosina alcohólica durante 30s
Un pase en agua del grifo
20 pases en etanol 96%
20 pases en etanol 100%
3 pases en xilol

4 Resultados y discusión

La toxicidad de los precursores se testó *in vitro* en fibroblastos y HaCat para determinar si había una reacción inflamatoria. Cada compuesto fue administrado a las células ya sembradas en placas de 96 pocillos y, tras 24h en contacto, se analizó la viabilidad mediante un ensayo colorimétrico.

Cuando las células se crecen en presencia de alginato, únicamente se observa toxicidad a una concentración del 3,5% (Figura 5).

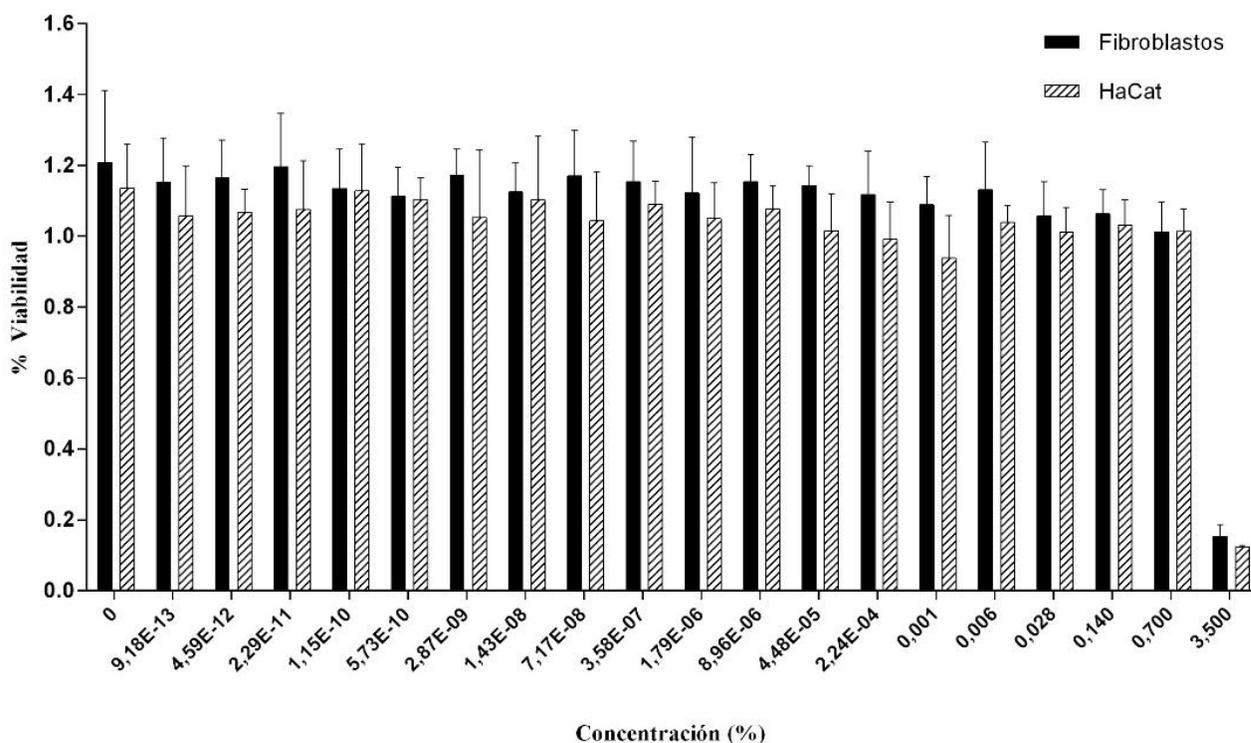


Figura 5: Representación gráfica de la toxicidad del alginato. Se observa que la viabilidad celular cae de forma significativa cuando la concentración del biomaterial es del 3,5%. Esto sigue la línea de los resultados obtenidos por otros autores en los que han visto que la toxicidad del alginato aumenta cuando se aplica a una concentración alta por encima del 2%.

Algunos autores han visto que las células forman esferoides dentro de cápsulas del biomaterial y que eso favorece su proliferación (Mosahebi *et al.*, 2001). Se sabe que esto depende de la concentración de alginato y del número de células sembradas en la placa.

Cuando la densidad celular es alta y la concentración de alginato baja (<2%) la viabilidad es mayor que con una densidad celular baja y la concentración alta (Grover *et al.*, 2011). Esto explica nuestros resultados donde se

observa toxicidad cuando la concentración supera el 2%.

Cuando las células se sembraron en presencia de PVP, la viabilidad celular, en términos de absorbancia, es menor que en el caso del alginato; las células crecen un 50% menos (Figura 6). Este compuesto se ha utilizado para recubrir nanopartículas de plata (AgNPs) las cuales han sido aplicadas en una gran variedad de productos comerciales incluyendo para el cuidado de la salud (Singh *et al.*, 2009).

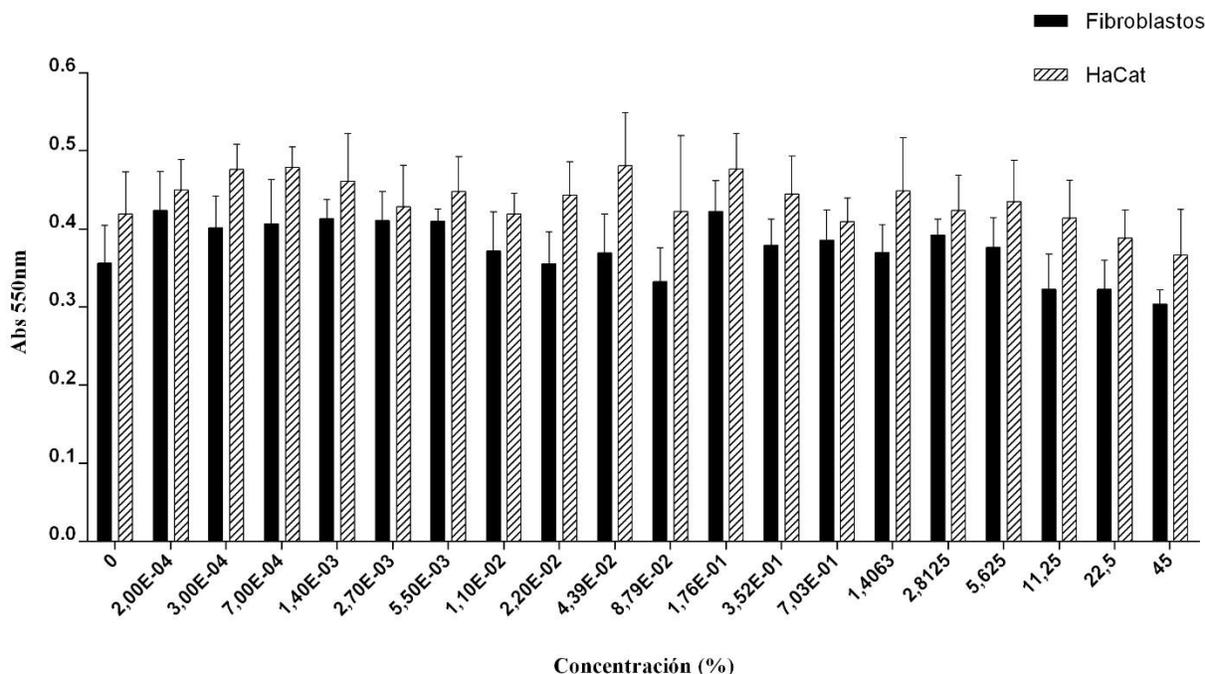


Figura 6: Representación gráfica de la toxicidad del PVP. Se observa que la viabilidad celular cae de forma significativa cuando la concentración del biomaterial es del 45%. En ambos tipos celulares se observa un crecimiento heterogéneo dentro de la misma placa de siembra. Esto es debido a que el PVP utilizado tiene un nivel alto de porosidad y este parámetro influye de forma negativa en el crecimiento haciéndolo heterogéneo

A pesar de los amplios usos del PVP, hay pocos estudios biológicos y toxicológicos de dichas partículas. En un experimento llevado a cabo por el grupo de Nymark (Nymark *et al.*, 2013) analizaron dicha citotoxicidad utilizando células epiteliales humanas BEB 2B. El experimento lo realizaron en placas de 24 pocillos semiconfluentes (área de cultivo 1.9 cm²/pocillo; volumen de medio de cultivo 1 ml/pocillo) expuestas a 500µl/pocillo de distintas dispersiones ultrasónicas de AgNP durante 4, 24 y 48h en un rango de 0,5-48µg/cm². Por

último, analizaron la citotoxicidad de las mismas, utilizando dos metodologías: la técnica de exclusión de colorante azul Trypan, y por el ensayo de viabilidad celular luminescente.

Lo que observaron es que, en ambos ensayos, es crecimiento disminuía en función de la concentración del material siendo más acusada en el caso del ensayo con azul tripán. Estos resultados podrían explicar la bajada de viabilidad celular que obtenemos con respecto al alginato. Aunque el PVP no es

totalmente tóxico, ya que las células crecen en su presencia, dicha disminución podría relacionarse con la concentración del mismo.

Además, la molécula de PVP utilizada tanto en nuestro experimento como en el anteriormente comentado (Sigma Aldrich ®), es la misma, con un peso molecular promedio de 360. Esto último podría ser indicativo de los resultados obtenidos en ambos casos ya que no hay evidencias de toxicidad cuando el PVP que se utiliza tiene un peso molecular menor. Sin embargo, tampoco se han hecho estudios sobre cómo dicho parámetro puede influir en la naturaleza del compuesto y por tanto no es algo indicativo.

Otra posible explicación tiene que ver con la porosidad volumétrica (P_v) del material utilizado. Está descrito que cuando este parámetro es elevado (Tabla 2) las células crecen de forma heterogénea y no se adhieren bien a la estructura. Para analizar este valor, se debe conocer la relación entre el volumen de una porción cualquiera del material en seco (V_0) y cuando está sumergido en agua (V_T) (Figura 7).

$$P_v = \frac{V_0}{V_T}$$

Figura 7: Fórmula para calcular la porosidad volumétrica de un material cualquiera

En nuestro caso, la cantidad de agua que puede absorber el PVP es muy pequeña (menos del 10% de su volumen en seco) y por tanto el volumen que gana cuando es sumergido, es muy baja. Esto hace obtener un valor de porosidad muy grande que, unido al error cometido por la siembra con la pipeta multicanal, podría explicar el bajo crecimiento celular y la heterogeneidad del mismo.

El último de los precursores de los biomateriales que utilizamos fue el quitosano. En este caso, los resultados obtenidos muestran un crecimiento celular aún más heterogéneo que con los precursores anteriores y un error mucho mayor entre réplicas. Además, la viabilidad celular empieza a verse comprometida tras haber diluido el compuesto hasta 6 veces con respecto al puro, no alcanzando tampoco valores muy altos de absorbancia a diluciones mayores (Figura 8).

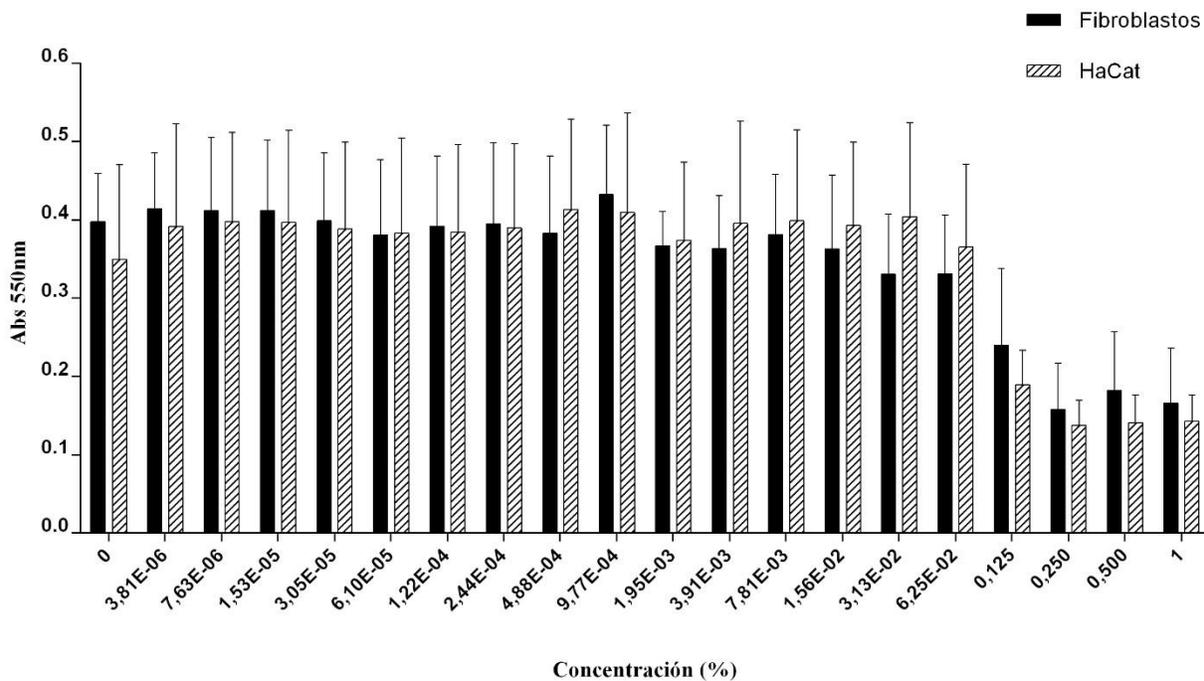


Figura 8: Representación gráfica de la toxicidad del quitosano. Hay toxicidad incluso cuando su concentración se ha diluido hasta 6 veces con respecto a la pura (1%), posiblemente debido al DDA y el peso molecular

Una puntualización del experimento que cabe destacar es que inicialmente se utilizó un tipo de quitosano en polvo a partir del cual se obtuvo una solución, con agua como disolvente, para realizar el ensayo de toxicidad. Como el compuesto no era soluble y se formaban agregados, la empresa nos proporcionó un lote nuevo al 1% en ácido acético glacial de peso molecular medio (Sigma Aldrich 448877) y con un grado DDA del 75-85%. Con este nuevo lote se realizó el ensayo MTT anterior y se obtuvieron dichos resultados que indican toxicidad a nivel celular del compuesto.

En contraposición a lo anterior, son numerosos los estudios que han obtenido resultados positivos para su uso en medicina y que han descartado su toxicidad. De hecho, algunos autores han destacado su capacidad antimicrobiana probablemente debida a la existencia de interacciones entre las cargas positivas del biomaterial y las negativas de la pared celular de los patógenos (Dai *et al.*, 2011). Se sabe que la toxicidad del quitosano *in vitro* está relacionada con el DDA y su peso molecular (J N.G. Schipper *et al.*, 1997).

En un estudio con queratinocitos y mediante un ensayo MTT pudieron ver que con el de mayor peso molecular conseguían el doble de crecimiento (300 µg/ml) que con el de bajo peso. Sin embargo, observaron que ambos eran tóxicos cuando su concentración superaba 1mg/ml (Wimardhani *et al.*, 2014).

El grupo de Wiegand (Wiegand, Winter and Hipler, 2010) también estudió la citotoxicidad en las mismas condiciones usando queratinocitos humanos de la línea celular HaCat. Sus resultados indicaron que el biomaterial ejercía un efecto negativo sobre la viabilidad y la proliferación celular, dependiente de su peso. Además, vieron que también es capaz de estimular la liberación de citoquinas inflamatorias por parte de las células en función del tiempo de incubación y la concentración. Esto se correlaciona con nuestros resultados en los que la molécula de quitosano que utilizamos era de peso molecular medio y no alto.

Howling repitió el experimento anterior, pero usando quitosano con diferente grado de desacetilación (DDA) y peso molecular similar en células de la

misma línea (Howling *et al.*, 2001). Vieron que un DDA alto (89%) estimula la proliferación celular de los fibroblastos, comparado con un DDA bajo. Sin embargo, en queratinocitos ocurrió lo contrario y el biomaterial inhibió la mitogénesis. En nuestro caso, el grado de DDA fue mucho menor y eso podría explicar los resultados obtenidos.

La biocompatibilidad del material ha sido ampliamente estudiada para su uso en distintos tipos de implantes y en regeneración tisular (Campos DM *et al.*, 2015). Su efecto reparador, lo ejerce cuando se aplica al 2% p/v. Para ello es necesario usar disolventes ácidos (1% v/v en ácido acético o láctico) y añadir 4g de glicerol para aumentar su plasticidad (Wimardhani *et al.*, 2014).

Por este motivo hasta que no usamos un disolvente ácido, se nos formaban agregados y obtuvimos una disolución heterogénea que no era viable para su uso. Los nuevos avances en química de biomateriales han permitido modificar la estructura de este compuesto para hacerlo directamente soluble en agua evitando la necesidad de usar disolventes ácidos (Tang *et al.*, 2016).

Para analizar la reacción inflamatoria de los biomateriales *in vivo*. Su integridad se monitorizó durante dos semanas tras haber sido implantados de forma subcutánea en ratones sanos. La realización de un pequeño bolsillo en el lomo de los animales permite implantar los productos y analizar, tras 14 días en contacto con el mismo, si existe infiltración de células multinucleadas presentes en el proceso inflamatorio. Para ello, se hizo el análisis de los cortes histológicos de cada uno de los grupos (alginato, quitosano y PVP) tras haber sido teñidos con H/E.

En la histología de aquellos tratados con alginato, no se observa infiltración de células multinucleadas como macrófagos, eosinófilos, basófilos o neutrófilos, lo cual indica que no hay toxicidad (Figura 9a). Esto se corresponde con los resultados que han obtenido otros autores (Eiselt *et al.*, 2000) en los que han visto que este material es biocompatible (Klöck *et al.*, 1997) y ejerce su máxima eficacia cuando forma hidrogeles en presencia de cationes multivalentes como el Ca^{2+} , a través de interacciones iónicas. Estos hidrogeles se

han usado en biomedicina para el trasplante de células y la liberación controlada de medicamentos (Smidsrød and Skjåk-Braek, 1990).

Además de lo anterior, las características de este compuesto han permitido que actualmente existan apósitos absorbentes de alginato compuestos por fibras de Na^+ y Ca^{2+} derivadas de algas marinas, por la empresa Advanced Tissue. Se utilizan para tratar úlceras de presión o de pie diabético por promover su cicatrización y absorber la mayor parte del drenaje de la herida.

En el caso del quitosano, además de infiltración de células inflamatorias, el biomaterial no se ha implantado bien y ha formado agregados sólidos que se localizan entre la dermis (Figura 9b). A pesar de que dicho biomaterial ha sido aplicado con éxito en el campo médico, su toxicidad es dependiente del peso y su grado de desacetilación (DDA) por lo que cada molécula de quitosano es capaz de actuar de forma diferente. Dado que nuestra molécula tiene características muy distintas a las de otros ensayos, esto podría explicar los resultados obtenidos.

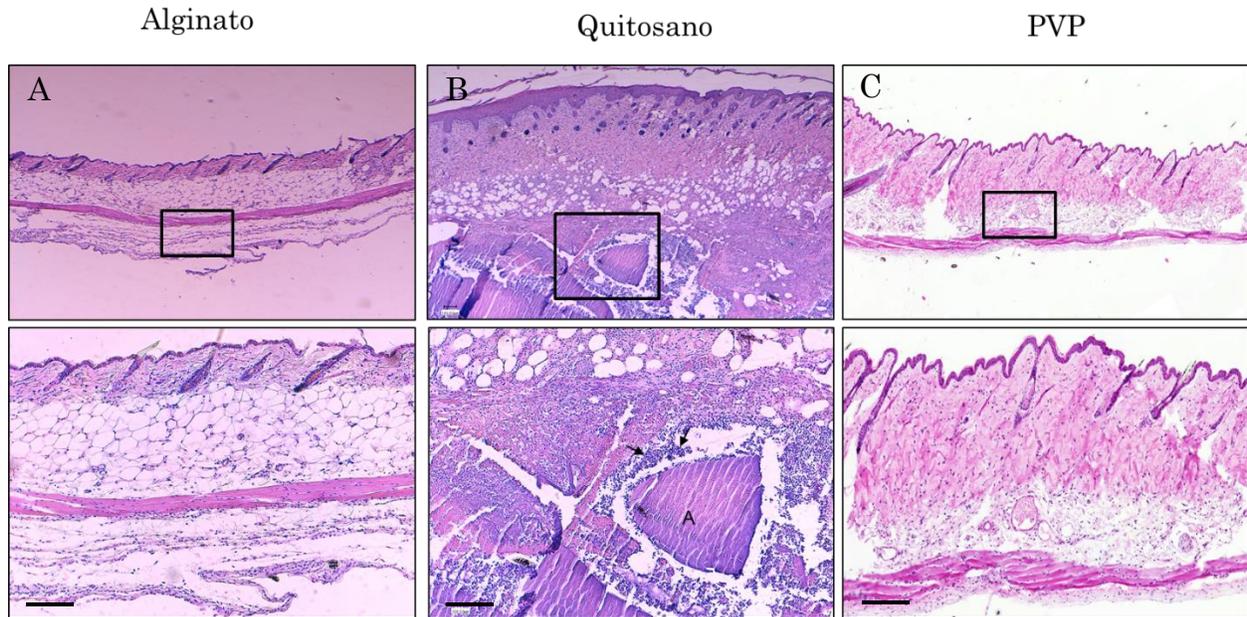


Figura 9: Histología del modelo subdérmico. El alginato y el PVP (A y C) muestran una buena adhesión mientras que el quitosano (B) forma agregados la dermis (A) facilitando que se recluten células inflamatorias (flechas). Solo se muestra la tinción de hematoxilina/eosina.

Con esto podemos afirmar que, habría que utilizar una molécula de quitosano diferente si la queremos aplicar en regeneración tisular.

Con respecto al PVP (Figura 9c) podemos observar resultados similares al alginato. Tampoco hay inflamación donde se ha implantado, ni en zonas adyacentes, tampoco se ven agregados que indiquen su mala absorción. De acuerdo con estos resultados, otros autores también han observado que cuando el PVP se aplica en ratones C57BL/6, tras 10 días, se favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos

más gruesos (Kang *et al.*, 2011). Actualmente hay varios ensayos clínicos en marcha en los que se hace uso del PVP como precursor a la hora de construir *scaffolds*.

Esto es particularmente importante en aquellos pacientes que sufren lesiones orales por estar inmunocomprometidos a consecuencia de alguna enfermedad como cáncer o VIH. Estos estudios han ido ganando relevancia también en el ámbito de la regeneración tisular para analizar de qué manera el PVP puede ayudar a resolver la cicatrización del tejido dañado.

En un ensayo prospectivo, 30 pacientes que sufrían dolor inflamatorio y ulceroso, fueron tratados con un gel hialuronado de PVP aplicado atópicamente (Innocenti *et al.*, 2002). De todos ellos, 6 pacientes, tras 5-7h en contacto con dicho compuesto, observaron que el dolor, valorado del 1-10 (siendo el 1 nada de dolor y 10 lo máximo), se había reducido en un 92% ($p < 0.005$). Además, todos los pacientes en general reportaron una reducción importante del dolor tras el tratamiento. El 40% de estos pacientes determinaron que el efecto del gel de PVP persistía mayoritariamente durante las 2-3 primeras horas en contacto mientras que el 57% afirmó que su eficacia se mantenía incluso pasado dicho tiempo (Innocenti *et al.*, 2002).

Tras determinar la toxicidad tanto *in vivo* como *in vitro* de los precursores de diferente base polimérica, se realizó un experimento en ratones diabéticos simulando las úlceras que se generan en esta enfermedad para comprobar los efectos de un compuesto lipídico experimental. Encontrar una dosis óptima a la cual dicho compuesto sea capaz de ejercer una acción reparadora

de la piel, permitiría combinarlo con el precursor candidato para aplicarlo sobre las heridas y mejorar la situación inflamatoria que ocurre en estos pacientes. Actualmente existen en el mercado derivados lipídicos como las resolvinas, a partir de las cuales se han realizado estudios y se ha visto que mejoran la calidad de vida, en lo que a las úlceras se refiere, de los individuos que padecen algún tipo de diabetes. Sin embargo, lo que se pretendía en el presente experimento era valorar si este compuesto podía ofrecer los mismos resultados.

Para comprobarlo, se utilizó una cohorte de 15 ratones divididos en 5 grupos y se comparó su tratamiento a distintas dosis: 100, 1000 y 10.000ng, siendo D1, D2 y D3 respectivamente, con una resolvina comercial (RvD1). Como se ha comentado anteriormente, otros autores han visto que este último compuesto mejora la cicatrización de las heridas de los ratones con respecto a los que no han sido tratados, cierran antes y no hay problemas derivados de la patología (Tang *et al.*, 2013). Esto mismo es lo que pudimos comprobar tras aplicar durante 10 días cada uno

de los compuestos (Figura 10a). Sin embargo, si la contrastamos con aquellos tratados a distintas dosis del compuesto, vemos que solo hay mejoras con respecto a D2 y 3 pero en el caso de D1, el cierre es similar (Figura 10b). Esto nos permitió determinar que, aunque la resolvina tenía efectos beneficiosos en la resolución del taño tisular, había un compuesto lipídico que administrado a 100ng producía efectos parecidos.

Dado que los resultados anteriores únicamente proporcionaban datos visuales, decidimos estudiar más a fondo esa similitud y ver si el compuesto experimental a esa concentración realmente obtenía los mismos resultados o si incluso los mejoraba con respecto a la resolvina ya comercializada. Para llevarnos a cabo el estudio de las áreas de las heridas realizando un seguimiento diario de las mismas. Esto nos permitió analizar su evolución durante el tiempo que duró el ensayo.

Como podemos observar (Figura 11), en las heridas que fueron tratadas con RvD1 el área desciende antes que en los controles y que en los animales que fueron tratados con las dosis 2 y 3

del compuesto experimental, corroborando lo que habíamos visto anteriormente. Sin embargo, lo hacen después comparado con las tratadas con la D1. Esto demuestra de nuevo que, aunque la RvD1 comercial si que mejora el proceso de cicatrización de las úlceras diabéticas, no muestra mejores resultados que el compuesto lipídico D1.

Para asentar estos resultados y poder afirmar que realmente la D1 del compuesto lipídico mejora los efectos de RvD1, hicimos un análisis histológico de los cortes obtenidos de la zona donde se realizaron las heridas. En línea con lo anterior, la histología muestra que, tanto en los ratones tratados con la resolvina como con la D1, hay una mayor granulación del tejido con respecto a los controles y al resto de dosis (Figura 12). Es decir, el tejido conectivo que se ha formado *de novo*, ha perfundido y reemplazado al coágulo de fibrina que se forma durante la cicatrización. Esto se observa como un fino epitelio de color rojo claro en la zona donde antes se veía la herida abierta, permeado y con nuevos circuitos capilares. Suave al tacto, húmedo y de apariencia irregular.

Estos resultados nos informan de que, la cicatrización de heridas en la condición de diabetes, está relacionada con una alteración de la ruta biosintética de las resolvinas.

Si ésta funciona mal, dicho compuesto no se genera y por tanto no es capaz de ejercer su acción reparadora cuando se produce una úlcera (Galiano *et al.*, 2004).

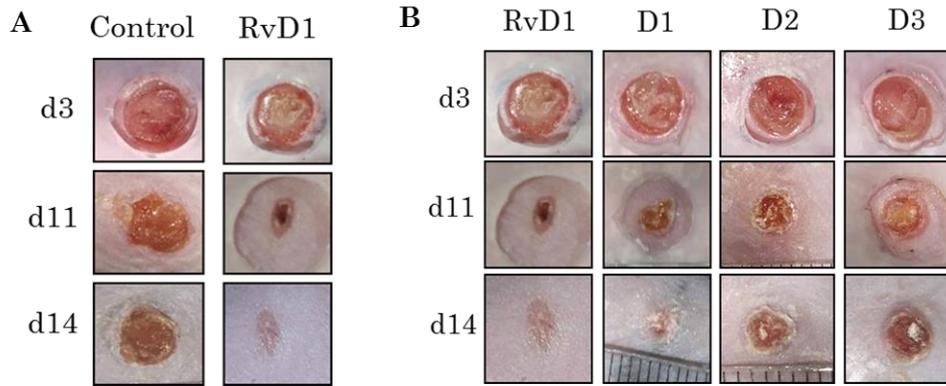


Figura 10: Heridas de los ratones db/db a los días 3, 11 y 14 del experimento. Con respecto a los animales control que fueron tratados con suero salino, observamos que RvD1 consigue que la herida cierre antes, de hecho, los primeros no llegan a cicatrizar del todo. Cuando esta comparación la realizamos con las dosis del compuesto lipídico de estudio, vemos que hay diferencias entre las dosis. En el caso de la D2 y D3, la RvD1 consigue mejores resultados ya que a esa concentración no se consigue el cierre total de la herida. Sin embargo, cuando observamos los resultados obtenidos para la D1, vemos que el cierre es completo igual que con RvD1 y que por tanto tiene, al menos, la misma eficacia.

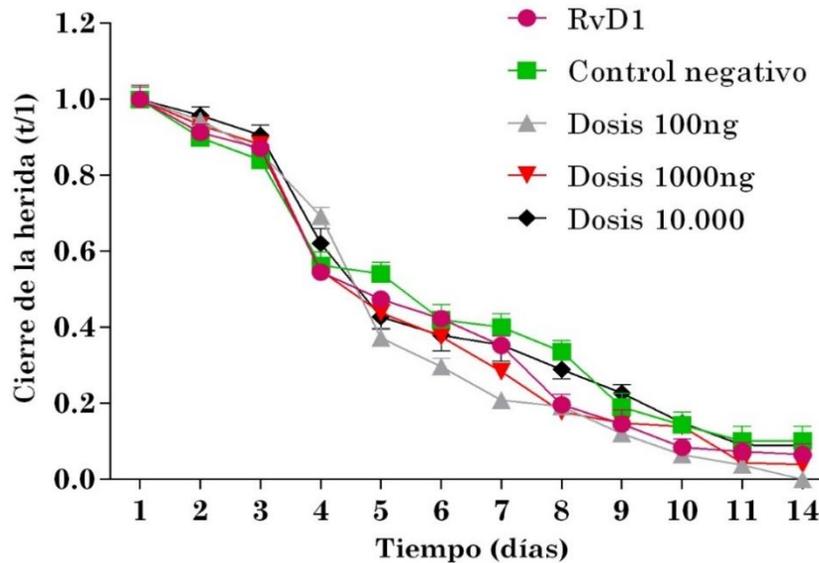


Figura 11: Disminución del área de la herida con tiempo. El daño se resuelve antes en los ratones tratados con RvD1 que en los controles, pero mejor son tratados con la D1 del compuesto. Se pueden apreciar dos picos significativos de bajada tanto a día 3 de haber realizado la herida como a día 7, momento en el cual comienza a bajar la inflamación. Para normalizar los resultados los resultados se representan como t/1: tanto por uno

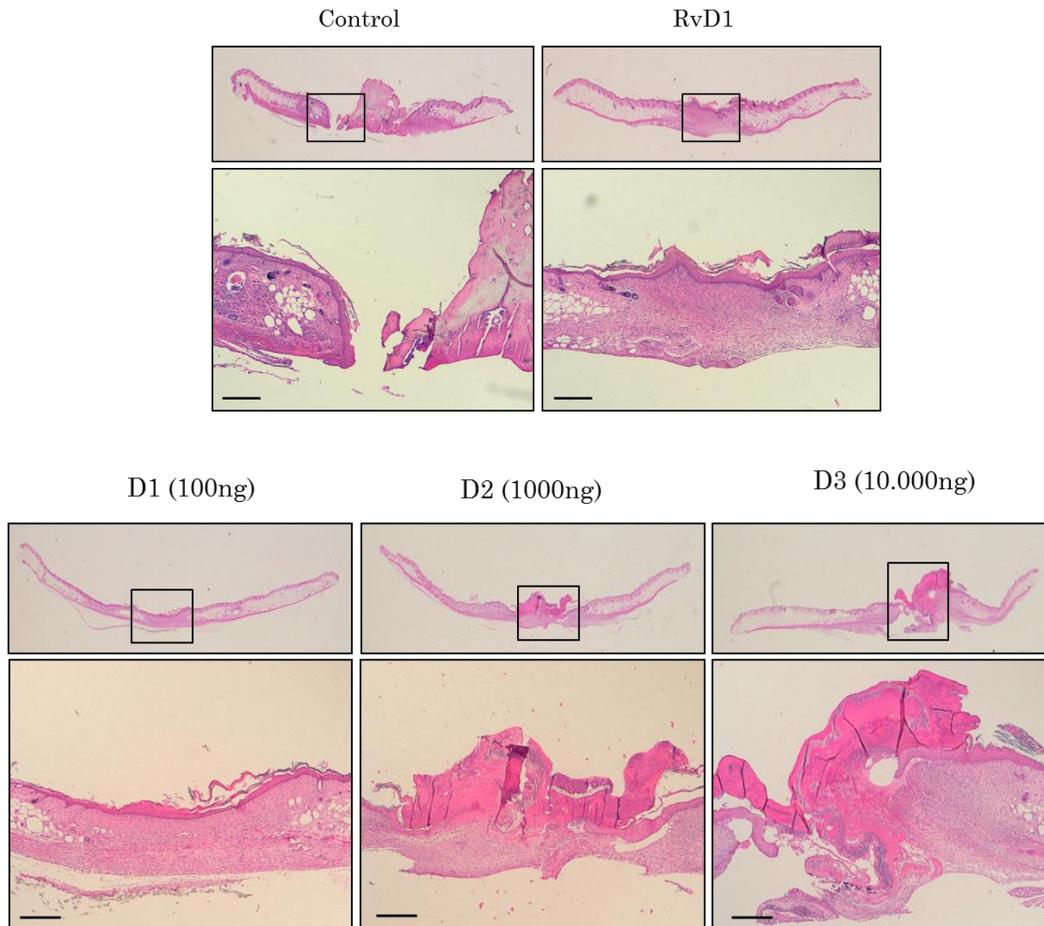


Figura 12: La RvD1 favorece la granulación de tejido con respecto a los ratones control. Sin embargo, cuando los animales son tratados con las distintas dosis del compuesto lipídico observamos que, en el caso de la D1, se consiguen mejores resultados que con la resolvina ya que se forman correctamente la dermis y epidermis y se aprecia una menor inflamación del tejido.

Una vez establecida la dosis del compuesto lipídico a la cual ejerce su función, se repitió el experimento con una nueva cohorte de 9 ratones para comprobar si era posible utilizar una dosis menor del compuesto (50ng), pero obteniendo los mismos resultados que en el caso anterior. Para ello, se hicieron 3 grupos (uno para cada dosis, y otro control) compuesto por 3 animales,

y se les trató según el modelo *wound healing* previamente descrito en el experimento anterior.

En este nuevo ensayo se introdujo una variante con respecto al otro y es que a los ratones se les hicieron dos heridas que fueron tratadas con el mismo compuesto. Esto permite tener un mayor número de sujetos y aumentar la población de estudio utilizando la

misma cantidad de ratones. La utilidad de este experimento se basa en conseguir los mismos efectos usando una cantidad menor del compuesto lipídico. Esto permitiría reducir costes a la empresa que lo produce y que más tarde también se verían reflejados de cara a su comercialización.

Con el objetivo de obtener un panorama visual de la evolución de la herida, lo primero que hicimos fue analizar las fotos de las heridas a los días 3, 11 y 14 del tratamiento. Esto es así porque las diferencias entre estos periodos de tiempo suelen ser significativas con respecto al cierre de las mismas. Los resultados nos muestran (Figura 13) que, a día 11, el diámetro de las heridas de los animales que fueron tratados con esa dosis menor (50ng) tiene un mayor diámetro, sobre todo la herida derecha, y por tanto cicatrizan más tarde con respecto a los ratones control y aquellos a los que se les administró la de 100ng.

En estos dos últimos grupos, el cierre de la herida es similar, lo cual indica que los ratones que no han sido tratados con ningún compuesto han cicatrizado mejor de lo esperado. Dado que estos resultados no nos aportan

una información total del experimento, medimos las áreas de las heridas y analizamos cómo éstas disminuyen con el tiempo (Figura 14).

En este caso, los resultados obtenidos corroboran los anteriores: cuando la dosis que se administra es la de 100ng, el daño se resuelve antes con respecto a los ratones control y a los tratados con la dosis de 50ng. Un nuevo aspecto que podemos analizar en este experimento es cómo evolucionan las dos heridas de un mismo ratón ya que, anteriormente, al realizar únicamente una, solo podíamos estudiar las diferencias entre ratones y no en un mismo animal.

Lo que observamos en este caso es que las dos heridas de un mismo animal (derecha e izquierda) no cicatrizan de igual manera a pesar de haber sido tratadas con el mismo compuesto para cada uno de los grupos. El estudio de las dos heridas por separado ya se ha llevado a cabo por otros autores y también han visto cómo existen diferencias con respecto a la regeneración tisular, entre ambas, sin embargo no dan ninguna explicación al respecto (Tang *et al.*, 2013).

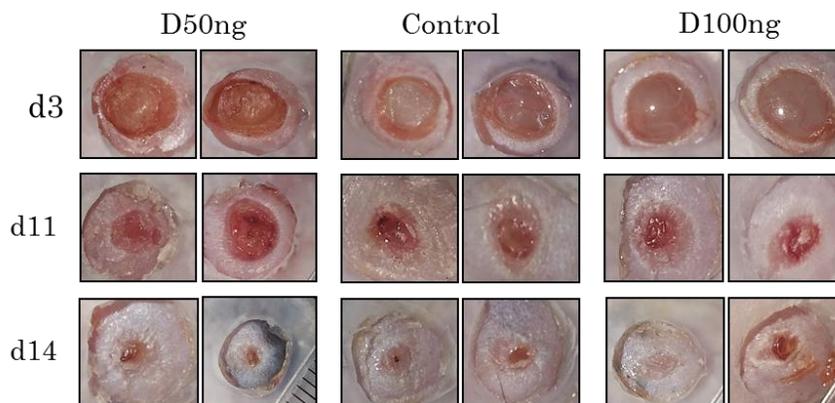


Figura 13: La administración del compuesto experimental a una dosis menor (50ng) no acelera el cierre de la herida con respecto a los controles y a la D100 donde a día 11 el área es menor que en el primer caso. Aunque a día 14 los tres grupos parecen haber cicatrizado por completo, para determinarlo es necesario estudiar cómo evoluciona el área con el tiempo.

La cicatrización es un proceso local que ocurre cuando se genera daño en la piel. El desarrollo y evolución de cada una de sus fases depende de la herida y la persona afectada y por tanto nunca ocurre de igual manera incluso si es el mismo individuo el que sufre dos lesiones diferentes.

En base a esto, una hipótesis que podría explicar las diferencias en la regeneración de ambas heridas, es que las células que participan en la formación de tejido nuevo, migren preferentemente hacia la herida más grave, dejando la otra menos irrigada y por ello cicatrizan de forma más lenta. Esto tiene sentido si asumimos que, a pesar de haber sido realizados por la misma persona, los *punch* en un mismo ratón,

nunca son exactamente iguales y por tanto las heridas generadas también son diferentes.

Además, en algunos casos, el pegamento quirúrgico empleado en la adhesión de la anilla de silicona pudo entrar en la herida aumentando la inflamación y creando una infección con exudado que promocionaría la migración celular hacia esa zona para combatir el problema. Sin embargo, como se ha comentado con anterioridad, no hay descrito ningún estudio en el que analicen por qué el cierre de las heridas ocurre de forma diferente a pesar de haber sido tratadas de igual manera y por tanto no podemos dar una respuesta totalmente válida a este hecho.

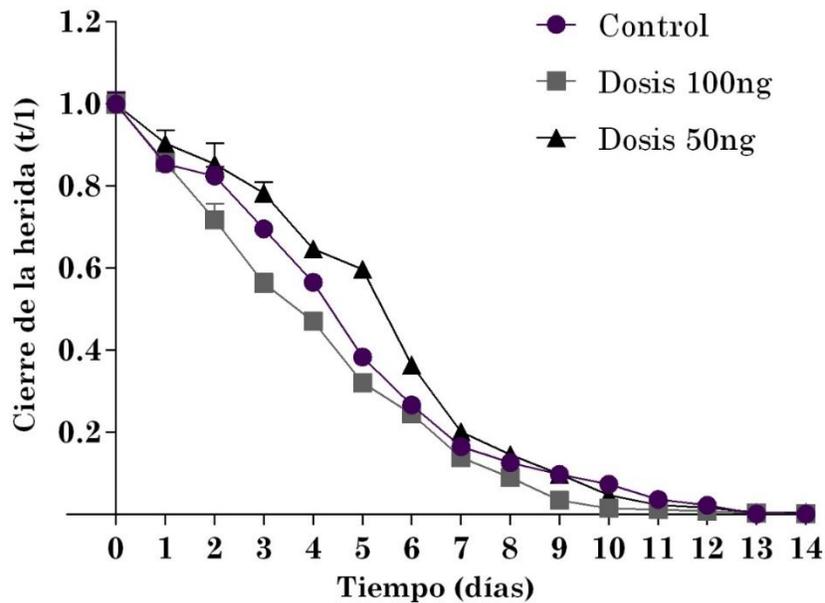


Figura 14: La administración de una dosis menor del compuesto lipídico aplicado de forma diaria, no produce mejoras en la cicatrización de las heridas de los ratones db/db. A partir del día 3 se observa una caída significativa en el área de las heridas de los dos grupos de ratones tratados con el compuesto lipídico a ambas dosis, pero es a día 7 cuando observamos que la de 100ng desciende con una pendiente mayor que en el caso de la de 50ng. Los datos están representados en t/1: tanto por uno.

Con el objetivo de analizar a nivel celular estos resultados, volvimos a obtener secciones transversales de la zona de las heridas y las teñimos de nuevo con H/E. En este caso podemos estudiar las diferencias no sólo entre los distintos tratamientos sino también dentro de un mismo ratón, viendo cómo ambas heridas evolucionan de forma diferente y corroborando lo anteriormente comentado.

En el caso de los controles y, a diferencia del experimento anterior, sí que consiguen cicatrizar por completo

(Figura 15a). Aunque la condición de diabético supone problemas a la hora de resolver el cierre de heridas, no todas ellas se mantienen abiertas sino que depende de la gravedad de la misma y del grado en el que se manifieste la patología. Sin embargo, si que podemos observar que la herida de la derecha ha cicatrizado peor y hay cierto grado de inflamación algo que no ocurre en la de la izquierda.

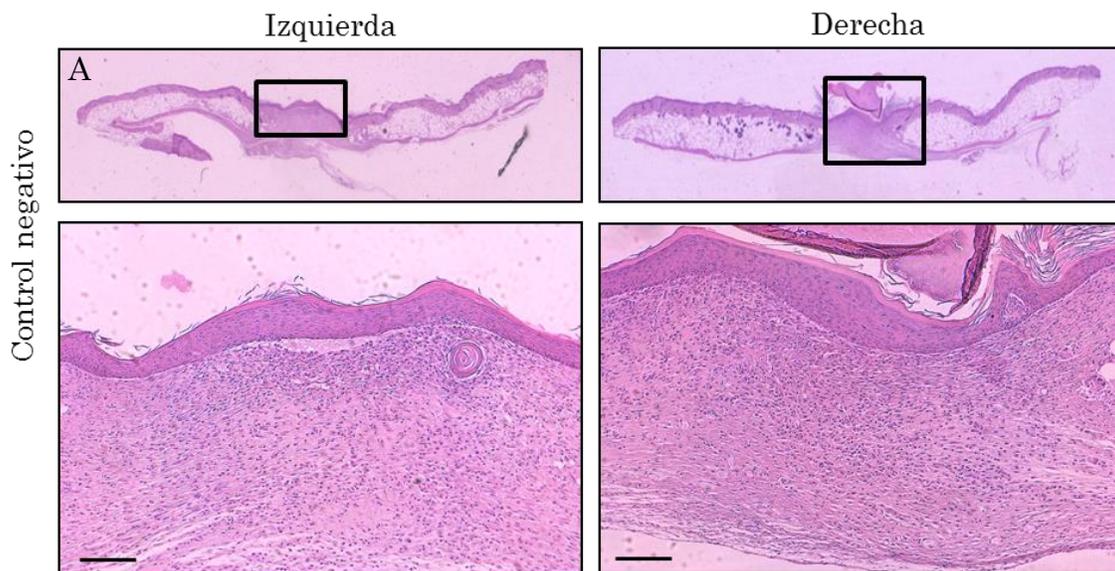
Cuando la dosis que se administra es la de 100ng, también se consigue que la herida cierre, siguiendo la línea de

los resultados anteriormente obtenidos (Figura 15b). En este caso, de nuevo observamos cómo ambas heridas cicatrizan de forma diferencial solo que aquí, la que peor lo hace es la izquierda ya que hay una dermis mucho más fina y menos desarrollada que en la herida derecha donde es mucho más uniforme.

Esto sigue sin explicar por qué ambas heridas cicatrizan de forma diferente pero nos sirve para establecer que la mayor cicatrización de una de las dos no siempre se decanta por la misma herida sino que lo hace indistintamente

y, por tanto, podría servir para reafirmar la hipótesis anterior en la que las células que participan en regeneración tisular, migran hacia la herida que está más comprometida.

Por último, cuando la dosis que se administra es la D50 vemos cómo el cierre de la herida no ocurre en el caso de la derecha ya que no se ha formado ninguna de las dos capas de la piel. Sin embargo, en la herida de la izquierda sí que ha habido cierre y formación de tejido nuevo, pero también con cierto grado de inflamación (Figura 15c).



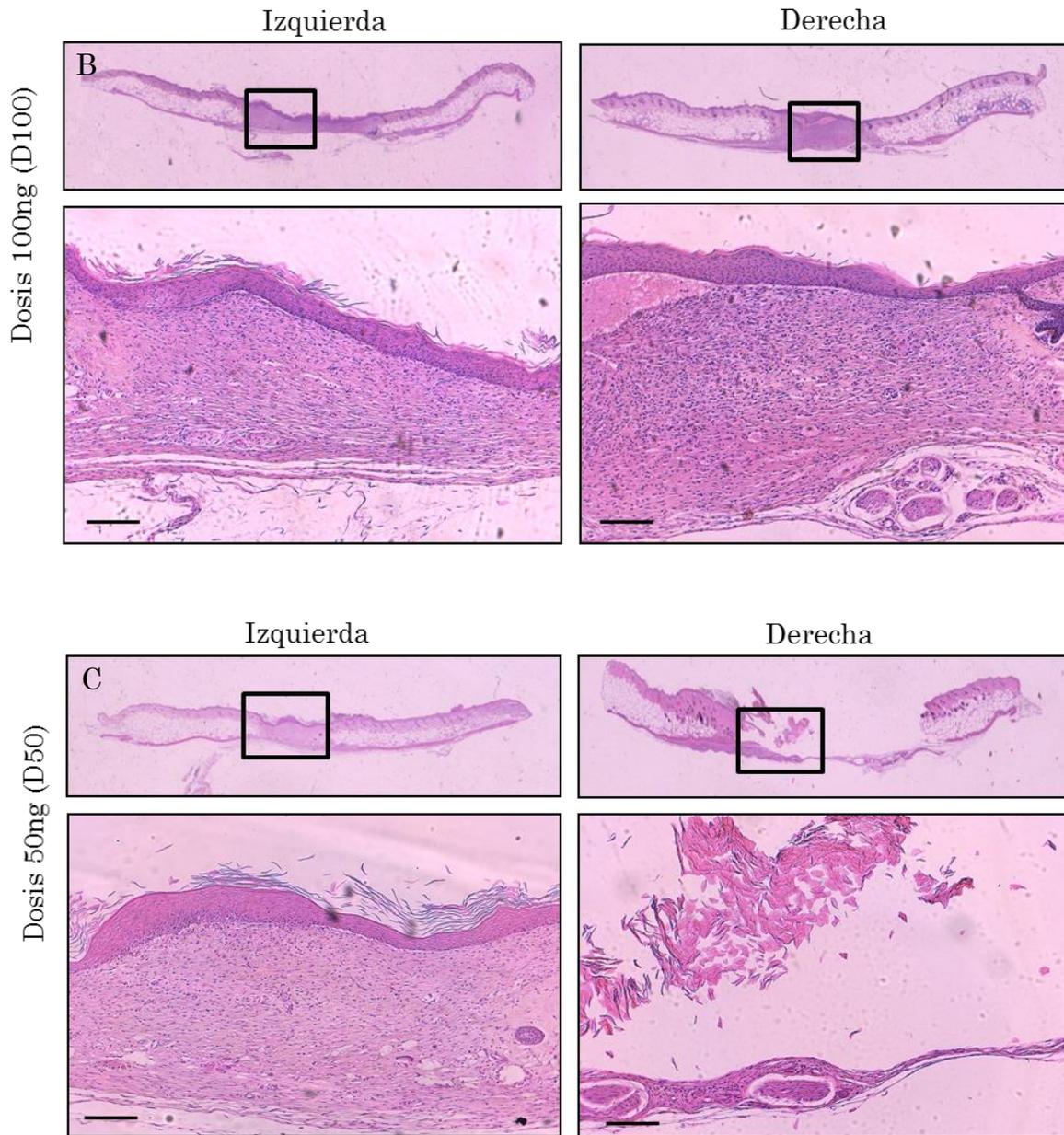


Figura 15: La histología muestra cómo la nueva dosis del compuesto lipídico no consigue los resultados esperados que sí logra la D100. Además, si nos fijamos en la herida derecha ni si quiera consigue cerrar, no hay formación de dermis ni epidermis en la zona de daño.

Una vez establecida la dosis óptima a la que el compuesto ejerce su acción reparadora, se planteó otro ensayo en el que se pretendía comprobar si era posible alcanzar los mismos resultados administrando una dosis 3 veces mayor

pero cada 3 días. Esto se fundamenta en que: si con 100ng aplicados diariamente conseguimos que la herida cierre, es posible reducir los días de administración usando una dosis de 300ng, pero cada 3 días. Para comprobarlo, se

repitió el mismo experimento usando de nuevo un total de 9 ratones divididos en 3 grupos: uno tratado con suero salino como control negativo, otro al que se le administró la dosis de 300ng (D300) y el último que fue tratado con la de 100ng anterior. Cada uno de los grupos estuvo compuesto de nuevo por tres ratones y, como en el experimento anterior, se les hicieron dos heridas que fueron tratadas de igual manera. Durante 10 días, los animales fueron tratados y las heridas evaluadas cada 3 días, limpiando y midiendo su área durante ese tiempo hasta su sacrificio a día 15. Este experimento duró un día más que los anteriores por simple logística ya que al no ser una administración diaria, para alcanzar un tiempo similar, no inferior, al resto de ensayos, debía alargarse hasta día 15.

Los primeros resultados obtenidos los podemos observar en las fotos tomadas a los días 0, 3, 9 y 15. Lo que podemos observar es que, al final del experimento las heridas de todos los animales cierran (Figura 16) aunque sí que se aprecian diferencias a día 9 donde las heridas de los animales tratados con la D300 están más abiertas con respecto a

los controles y a los D1 e incluso siguen liberando exudado. Esto nos permite establecer una hipótesis inicial en la que podemos decir que la nueva dosis del compuesto lipídico consigue el cierre de las heridas, pero más tarde que con la D1 (100ng) de hecho, a ese mismo día, las heridas de los ratones control, también han cicatrizado mejor.

De igual manera que en el experimento anterior las dos heridas tienen una evolución diferente a lo largo de su tratamiento a pesar de haberseles administrado el mismo compuesto y haber sido tratadas de igual manera. Aunque en la bibliografía no hemos encontrado una explicación sólida a estas diferencias, sí que es cierto que hay diversos factores que retrasan el proceso de regeneración que pueden afectar a una de las heridas más que a la otra.

Dentro de estos encontramos: infecciones locales originadas de la misma piel circundante o como consecuencia de los exudados que favorecen el desarrollo de gérmenes. También traumatismos o una cicatrización anormal de la piel (cicatriz queloide), que influyen en la resolución del daño.

Dado que los resultados anteriores son meramente visuales, procedimos a estudiar la evolución del área con el tiempo entre los distintos grupos. Aunque en la gráfica se observa que todas las heridas se resuelven a día 15, las que han sido tratadas con D300 lo hacen más tarde que el resto (Figura 17). Además, si esto lo comparamos con los resultados de la administración diaria (Figura 14), los ratones tratados con la D1 (100ng), tienen las heridas más abiertas al mismo día del tratamiento.

Si observamos el primer pico a día 3, en este nuevo experimento (Figura 18) el área disminuye 0,25 veces (25%)

mientras que cuando se administra diariamente lo hace en 0,40 (40%) lo cual indica que la D1 (100ng) ejerce mayor efecto cuando se administra cada día que cuando se hace cada 3.

La histología de las heridas también sigue la línea de estos resultados. Aunque en todos los casos se logra que las heridas cierren, ocurre más tarde y los resultados son peores que en experimentos previos. Además, se puede observar cómo en la D300 del compuesto lipídico, la zona de la herida donde se ha formado el tejido nuevo está inflamada con respecto a los otros dos grupos de ratones (Figura 18).

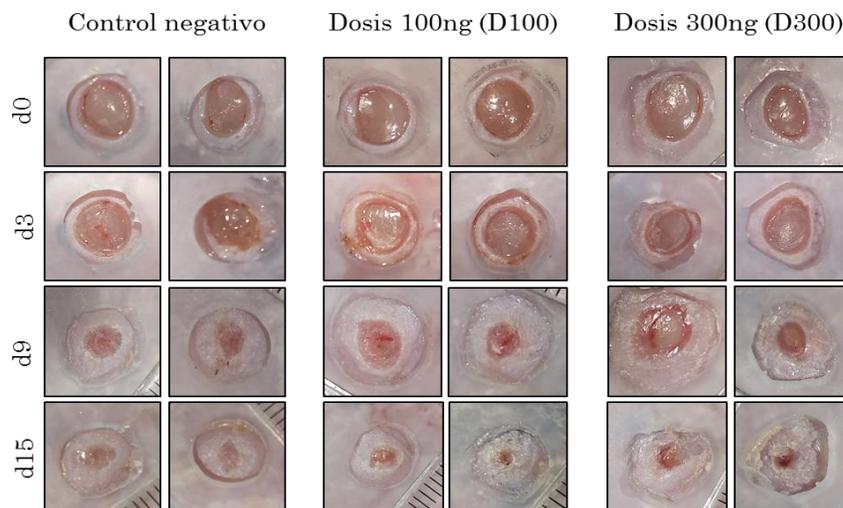


Figura 16: Fotos de las heridas correspondientes a los ratones control y a los tratados con dos dosis diferentes del compuesto lipídico. Aunque las heridas de todos los animales consiguen cicatrizar, las de aquellos a los que se les administró una dosis mayor, lo hacen más tarde (observar día 9) lo cual indica que en principio esta nueva forma de tratamiento no mejora los resultados del experimento anterior.

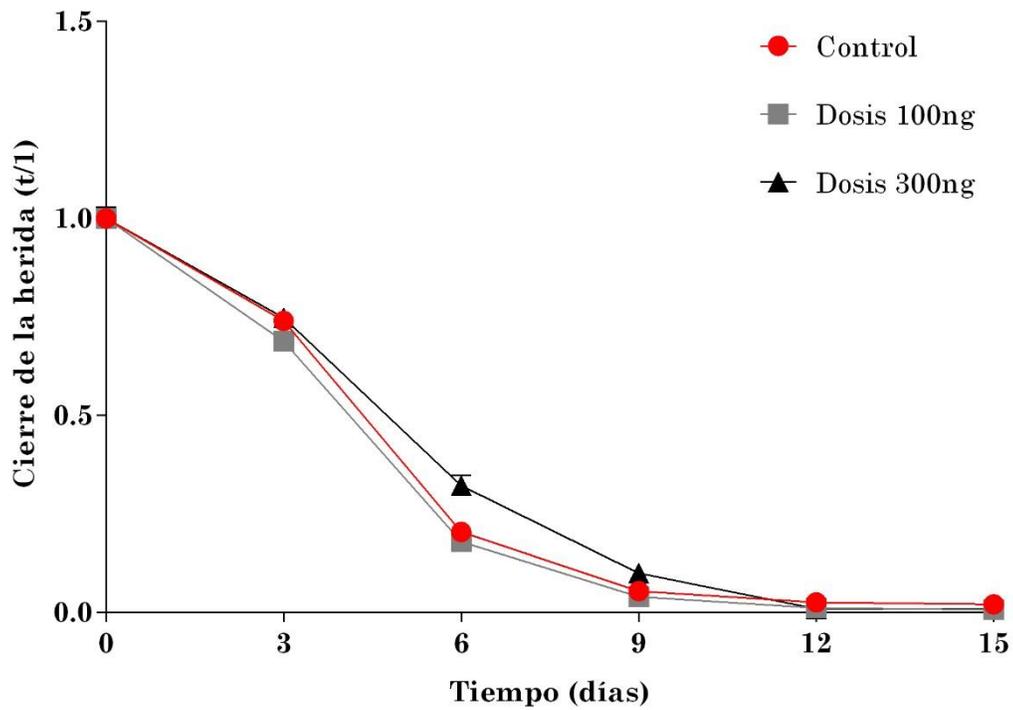
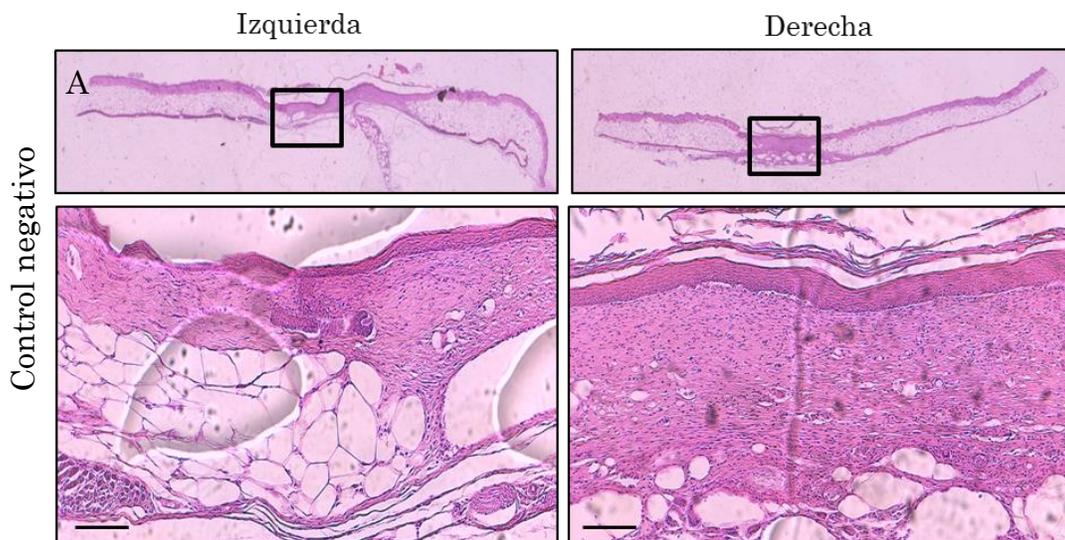


Figura 17: La administración de una dosis mayor cada 3 días no consigue mejores resultados con respecto al tiempo de cierre de la herida. En el caso de la D100, al igual que en los otros dos casos, se consigue cerrar, pero a día 3 y si lo comparamos con los experimentos anteriores, el cierre es mucho menor que cuando se aplica diariamente. En el primer caso únicamente se reduce el área en un 20% mientras que en el segundo lo hace en un 40%.



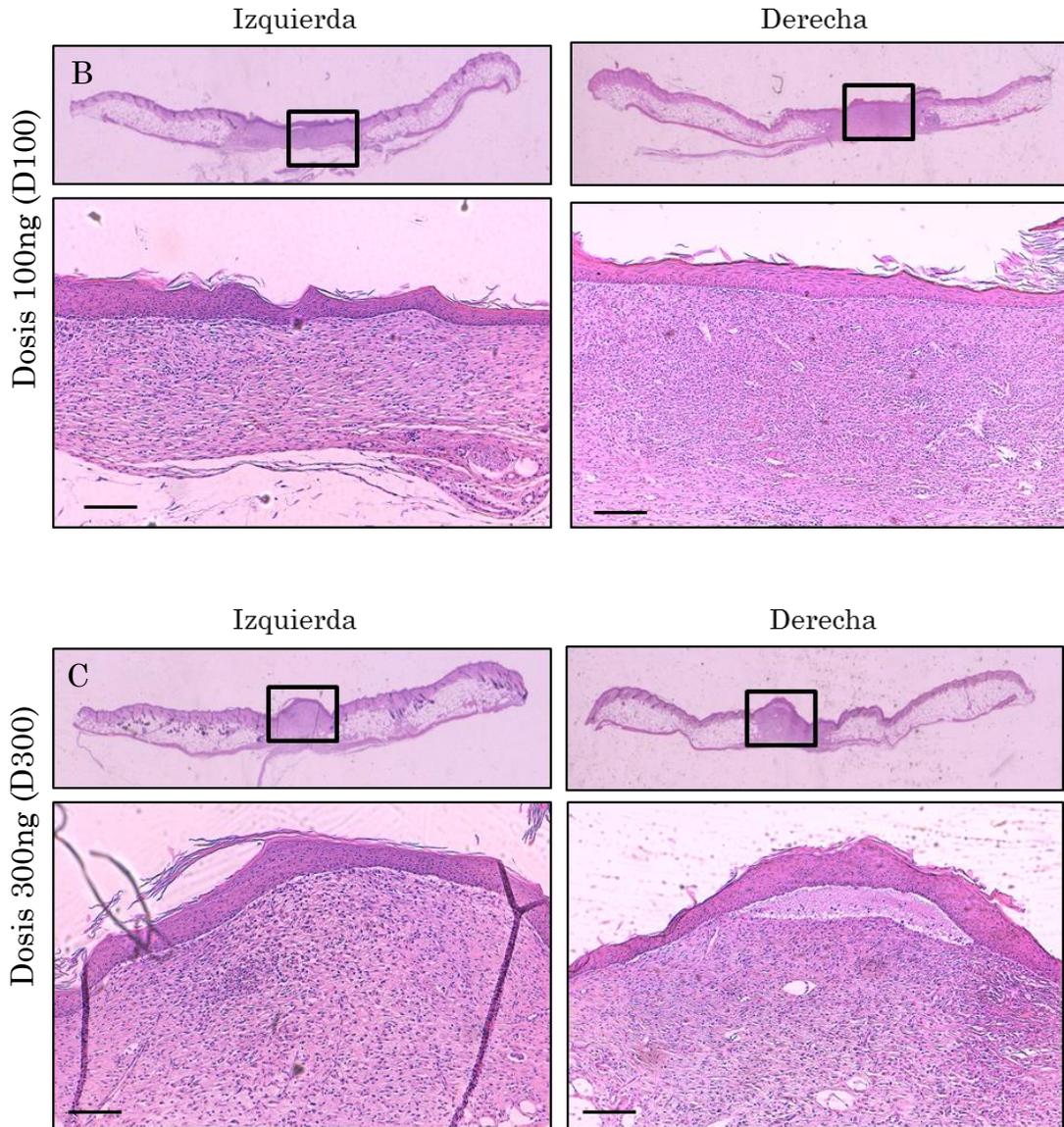


Figura 18: La histología muestra cómo la administración de una dosis tres veces mayor del compuesto, cada tres días, consigue el cierre de la herida tras finalizar el tratamiento, pero produce mucha inflamación con respecto a las heridas que han sido tratadas con la D100 o los controles.

5 Conclusión

La cicatrización de heridas es un problema todavía no resuelto en algunas condiciones patológicas como la diabetes. Esto hace que muchos pacientes tengan que acudir al médico de forma recurrente cuando su piel sufre

algún daño y, en los casos más graves, llegan incluso a perder el miembro afectado. Los últimos avances en ingeniería de materiales junto con los conocimientos sobre la biología molecular y celular de la reparación tisular, han permitido

el desarrollo de tratamientos potenciales que consiguen mejorar la calidad de vida de estas personas.

A este desarrollo se le suma la importancia de los compuestos lipídicos pro-resolutivos en regeneración dérmica. El estudio de todo este conjunto es lo que ha dado lugar a lo que hoy en día se conoce como ingeniería tisular. En este trabajo hemos podido estudiar de qué manera reaccionan tres bases poliméricas candidatas para la formación de velos por electrohilatura. Teniendo en cuenta el grado de toxicidad y la forma en la que promocionan la proliferación celular, podemos concluir que el alginato es el precursor que mejores resultados produce. El crecimiento que se consigue es más homogéneo que el PVP o el quitosano, y también más elevado con lo que podría ser un candidato ideal para su aplicación dérmica en términos de regeneración.

Además, estos mismos resultados se observaron en el modelo subdérmico *in vivo* en ratones. Donde tampoco se aprecia infiltración de células multinucleadas que indiquen cualquier tipo de inflamación en la zona de aplicación.

Tal y como se ha comentado antes, los compuestos lipídicos tales como las resolvinas derivadas de los ácidos grasos n3, han cobrado importancia en el campo de la regeneración de tejidos. Su encapsulación usando biomateriales de distinta naturaleza, permitiría tratar de forma localizada las úlceras diabéticas y de otras patologías. En este trabajo se ha estudiado la seguridad de un compuesto experimental en comparación con una resolvina comercial y con respecto a ratones control no tratados. Lo que se observa en el modelo *wound healing* en ratones diabéticos, tanto a nivel visual de las heridas como en la histología, es que dicho compuesto, cuando se aplica a una concentración de 100ng, mejora los resultados que el ya existente en el mercado y consigue que todas las heridas cierren en el tiempo establecido.

Sin embargo, hemos visto que no es posible aplicarlo a dosis diferentes ni cambiar el periodo de administración del mismo ya que los resultados que se consiguen en ambos casos son peores y, en ocasiones, generan una inflamación que podría llegar a ser patológica.

6 Agradecimientos

El presente trabajo lo dedico a todas aquellas personas que han aportado su granito de arena y han permitido que salga adelante. En primer lugar a todos los integrantes del grupo de Regeneración y trasplante cardiaco del hospital La Fe de Valencia liderado por la doctora Pilar Sepúlveda Sanchís. Por acompañarme durante cada día en el laboratorio.

En segundo lugar, a mi familia y amigos, por preocuparse por mi e interesarse por mis progresos y problemas durante el desarrollo del trabajo. Y, en último lugar, aunque no por ello menos importante, me gustaría hacer mención especial a Sergio, por acompañarme todo este tiempo y haber hecho más ligero todo el trabajo y a Pablo, por confiar desde el principio en mí y en este resultado.

7 Bibliografía

Aramwit, P. (2016) 'Introduction to biomaterials for wound healing', in *Wound Healing Biomaterials*. Elsevier, pp. 3–38.

Avendaño-Romero, G. C., López-

Malo, A. and Palou, E. (2013) 'Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos', pp. 87–96.

Bertram G. Katzung and Anthony J. Trevor (2011) *Basic & Clinical Pharmacology, 13e* | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical. 13th edn. McGraw Hill education.

Bohari, S. P. M., Hukins, D. W. L. and Grover, L. M. (2011) 'Effect of calcium alginate concentration on viability and proliferation of encapsulated fibroblasts.', *Bio-medical materials and engineering*, 21(3), pp. 159–70.

Chaudhari, A. *et al.* (2016) 'Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), p. 1974.

Chmielowiec, J. *et al.* (2007) 'c-Met is essential for wound healing in the skin.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 177(1), pp. 151–62.

Clark, R. A. F. (1988) 'Wound Repair', in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Boston, MA:

Springer US, pp. 3–50.

Dai, T. *et al.* (2011) ‘Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects.’, *Expert review of anti-infective therapy*. NIH Public Access, 9(7), pp. 857–79.

Dalli, J. *et al.* (2015) ‘Novel proresolving and tissue-regenerative resolvin and protectin sulfido-conjugated pathways.’, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Federation of American Societies for Experimental Biology, 29(5), pp. 2120–36.

Eiselt, P. *et al.* (2000) ‘Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels’, *Biomaterials*, 21(19), pp. 1921–1927.

Eldor, R. *et al.* (2004) ‘New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies’, *Diabetic Medicine*. Blackwell Science Ltd, 21(11), pp. 1161–1173.

Galiano, R. D. *et al.* (2004) ‘Quantitative and reproducible murine model

of excisional wound healing’, *Wound Repair and Regeneration*, 12(4), pp. 485–492.

Grose, R. and Werner, S. (2004) ‘Wound-Healing Studies in Transgenic and Knockout Mice’, *Molecular Biotechnology*, 28(2), pp. 147–166.

Gurtner, G. C. *et al.* (2008) ‘Wound repair and regeneration’, *Nature*. Nature Publishing Group, 453(7193), pp. 314–321.

Hall, C. W. (1988) ‘Handbook of industrial drying’, *Drying Technology*. Taylor & Francis Group, 6(3), pp. 571–573.

Heness. G and Ben-Nissan. B (2004) ‘Innovative Bioceramics’, *Materials Forum*, 27, pp. 104–114.

Howling, G. I. *et al.* (2001) ‘The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro.’, *Biomaterials*, 22(22), pp. 2959–66.

Hübner, G. *et al.* (1996) ‘Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice’, *Cytokine*, 8(7), pp. 548–556.

Innocenti, M., Moscatelli, G. and Lopez, S. (2002) 'Efficacy of gelclair in reducing pain in palliative care patients with oral lesions: preliminary findings from an open pilot study.', *Journal of pain and symptom management*, 24(5), pp. 456–7.

Izázkun G Penilla Acasuso *et al.* (2008) 'Efectos de la mezcla de colágena-PVP, sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados', *Di-ciembre*, 12(4), pp. 184–191.

Kang, K. *et al.* (2011) 'Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles', *Toxicology Letters*, 205(3), pp. 227–234.

Kindt, T. J. *et al.* (2007) *Kuby immunology*. W.H. Freeman.

Klöck, G. *et al.* (1997) 'Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates.', *Biomaterials*, 18(10), pp. 707–13.

Lanza, R. P. (Robert P., Langer, R. S. and Vacanti, J. (2007) *Principles of tissue engineering*. Elsevier Academic Press.

Lárez Velásquez, C. (2003) 'Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos', *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen*, 4(2).

Lárez Velásquez, C. (2006) 'Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro', 1(2), pp. 15–21.

Levenson, S. M. *et al.* (1965) 'The healing of rat skin wounds.', *Annals of surgery*. Lippincott, Williams, and Wilkins, 161(2), pp. 293–308.

Lovvorn, H. N. *et al.* (1999) 'Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair.', *Journal of pediatric surgery*, 34(1), pp. 218–23.

Mayet, N. *et al.* (2014) 'A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems.', *Journal of pharmaceutical sciences*. Interpharm Press, Buffalo Grove, Illinois, 103(8), pp. 2211–30.

Menke, M. N. *et al.* (2008) 'Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing.', *Gynecologic oncology*. NIH Public Access, 111(2 Suppl), pp. S87-91.

Menke, N. B. *et al.* (2007) 'Impaired wound healing', *Clinics in Dermatology*, 25(1), pp. 19–25.

Mosahebi, A. *et al.* (2001) 'A Novel Use of Alginate Hydrogel as Schwann Cell Matrix', *Tissue Engineering*, 7(5), pp. 525–534.

Norouzi, M. *et al.* (2015) 'Advances in Skin Regeneration: Application of Electrospun Scaffolds', *Advanced Healthcare Materials*, 4(8), pp. 1114–1133.

Nymark, P. *et al.* (2013) 'Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells', *Toxicology*, 313(1), pp. 38–48.

O'Brien, F. J. (2011) 'Biomaterials and scaffolds for tissue engineering'. *Materials today*, 14(3) pp. 88–95

Opalenik, S. R. and Davidson, J. M. (2005) 'Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair', *The FASEB Journal*, 19(11), pp. 1561–3.

Pullar, C. E., Rizzo, A. and Isseroff, R. R. (2006) 'beta-Adrenergic Receptor Antagonists Accelerate Skin

Wound Healing: Evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis', *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), pp. 21225–21235.

Raja *et al.* (2007) 'Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, pp. 2849–68.

Rakhorst, G. and Ploeg, R. (2008) *Biomaterials in Modern Medicine*. World scientific. pp. 280

S. Wimardhani, Y. *et al.* (2014) 'Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells', *Journal of Oral Science*, 56(2), pp. 119–126.

Salvador Israel Macías-Hernández, Claudia Gabriela González-Muñoz, J. O.-M. del C. and Juan Daniel Morones-Alba (2014) 'Effects of collagen-polyvinylpyrrolidone on bone regeneration following retained third molar surgery. A controlled clinical study.', *Revista ADM*, 71(6), pp. 280–284.

Samuelsson, B. (2012) 'Role of basic science in the development of new

medicines: examples from the eicosanoid field.’, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(13), pp. 10070–80.

Serhan, C. N. *et al.* (2000) ‘Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing.’, *The Journal of experimental medicine*, 192(8), pp. 1197–204.

Serhan, C. N. (2007) ‘Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways’, *Annual Review of Immunology*, 25(1), pp. 101–137.

Serhan, C. N. (2014) ‘Proresolving lipid mediators are leads for resolution physiology’, *Nature*, 510 (7503), pp. 92–101.

Serhan, C. N. and Petasis, N. A. (2011) ‘Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution’, *Chemical Reviews*, 111(10), pp. 5922–5943.

Shinae Jun, † *et al.* (2000)

‘Synthesis of New, Nanoporous Carbon with Hexagonally Ordered Mesos-structure’. American Chemical Society .

Shirakata, Y. *et al.* (2005) ‘Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing’, *Journal of Cell Science*, 118(11), pp. 2363–2370.

Singh, N. *et al.* (2009) ‘Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials’, *Biomaterials*, 30(23–24), pp. 3891–3914.

Smidsrød, O. and Skjåk-Braek, G. (1990) ‘Alginate as immobilization matrix for cells.’, *Trends in biotechnology*, 8(3), pp. 71–8.

Tang, F. *et al.* (2016) ‘Preparation and characterization of N -chitosan as a wound healing accelerator’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Pt A), pp. 1295–1303.

Tang, Y. *et al.* (2013) ‘Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds.’, *Diabetes*. American Diabetes Association, 62(2), pp. 618–27.

Werner, S., Krieg, T. and Smola, H. (2007) ‘Keratinocyte–Fibroblast

Interactions in Wound Healing', *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), pp. 998–1008.

Werner S and Grose R (2003) 'Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.', *Physiological Reviews*, 83(2), pp. 835–870.

Wiegand, C., Winter, D. and Hipler, U.-C. (2010) 'Molecular-Weight-Dependent Toxic Effects of Chitosans on the Human Keratinocyte Cell Line HaCaT', *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(3), pp. 164–170.

Zhang, Y. *et al.* (2011) 'Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment', *Carbohydrate Polymers*, 83(2), pp. 813–817.