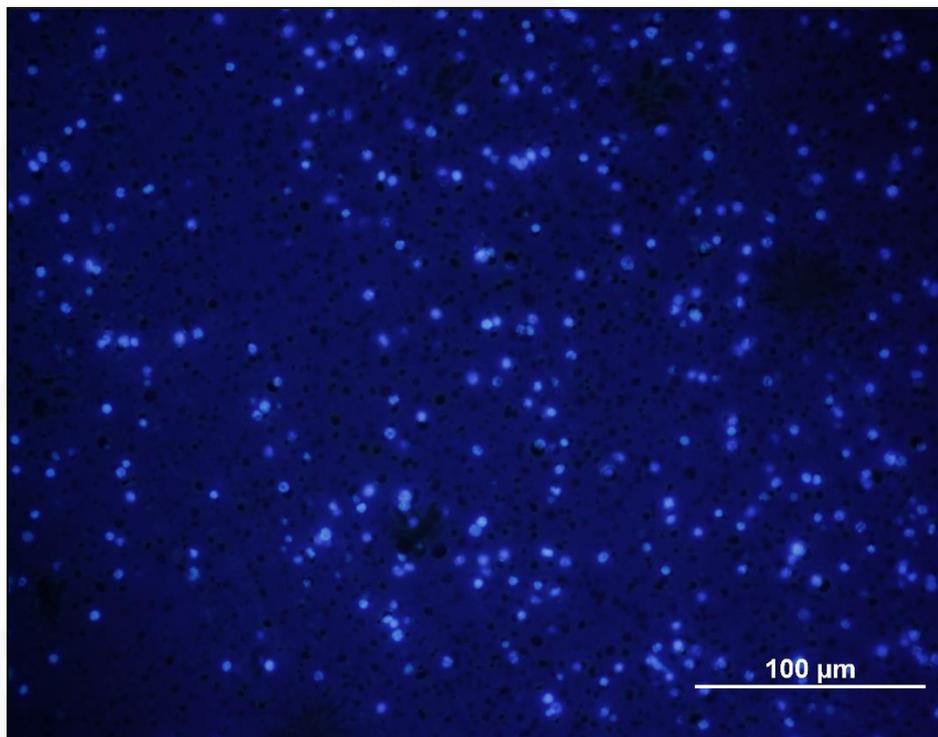


# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOLOGÍA

Optimización de un soporte de plasma sanguíneo para ingeniería  
tisular. Estudio *in vitro*.



Daniel Iglesias López

Departamento de Morfología y Biología Celular/Unidad de Terapia Celular  
y Medicina Regenerativa, Servicio de Hematología y Hemoterapia (HUCA)

Julio/2020



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



## **Resumen**

Las úlceras por presión son heridas isquémicas de la piel que causan una alteración en sus funciones. Además, pueden originar necrosis que puede afectar desde la epidermis hasta llegar incluso al hueso. Estas lesiones se producen por la presión ejercida entre el hueso y una superficie externa al paciente. Suelen ser más frecuentes en personas inmovilizadas, sobre todo, en aquellos con daños en la médula espinal. El tratamiento de las úlceras más graves normalmente supone una intervención quirúrgica, un método invasivo que, en ocasiones, conlleva complicaciones. Para tratar esta patología la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Servicio de Hematología y Hemoterapia (HUCA) desarrolló con éxito una terapia empleando células mononucleares autólogas de médula ósea en suspensión. No obstante, debido a su morfología y/o ubicación, algunas úlceras no pueden tratarse con una solución salina con células. Para poder aplicar las células mononucleares en ellas se propuso modificar un soporte basado en plasma que se había usado anteriormente como sustituto de piel artificial para tratar grandes quemados, así como diversas enfermedades raras de la piel. Este soporte se adaptó para el tratamiento de úlceras, incluyendo en el mismo las células mononucleares de la terapia. De este modo, se podría aplicar en úlceras que no admitían la fórmula líquida. El objetivo de este TFG fue optimizar las características del soporte para que pudiera ser empleado en un futuro estudio preclínico. Se han obtenido las concentraciones adecuadas para el desarrollo del soporte en un tiempo conveniente y se han determinado los marcadores para un futuro análisis de la viabilidad celular. En conclusión, nuestros resultados establecen que el soporte posee unas características, tanto a nivel macroscópico como microscópico, que lo hacen apto para su uso en un estudio preclínico para un nuevo tratamiento de úlceras por presión en un modelo animal.

## **Abstract**

Pressure ulcers are ischemic wounds on the skin that cause alterations in its functions. Moreover, such lesions cause necrosis which can affect from the epidermis to deeper regions, occasionally reaching the bone. These injuries are produced due to the pressure applied between the bone and a surface external to the patient. They tend to be more common on immobilized patients, especially on those with spinal cord injury. The treatment of most severe ulcers usually involve surgery, however, this method is invasive and can lead to complications. To treat this pathology, the Cell Therapy and Regenerative Medicine Unit of the Hematology and Hemotherapy Service (HUCA) successfully developed a therapy using autologous mononuclear cells extracted from the bone marrow. Nevertheless, some ulcers could not be treated this way because of their morphology or location. In order to apply the mononuclear cells to them, the same team proposed a modification of a plasma-based scaffold that had previously been used as a substitute for artificial skin to treat extensively burnt patients, as well as various rare skin diseases. This support was adapted for the treatment of ulcers, including the mononuclear cells of the therapy. By doing so, it could be applied to ulcers that did not admit the liquid formula. The aim of this bachelor's degree final project was to optimize the characteristics of the scaffold to be used in a future preclinical trial. The best optimal component concentrations for developing the scaffold in the shortest time possible were obtained and the best markers for a future cell viability assay were determined. In conclusion, our results establish that the scaffold has the suitable characteristics, at both the macroscopic and microscopic levels, that make it suitable for its use in a preclinical trial for a new treatment of pressure ulcers in an animal model.

(\*)Este trabajo se enmarca dentro del proyecto ISCIII ("PI19/01192"), co-financiado por ERDF

## Índice

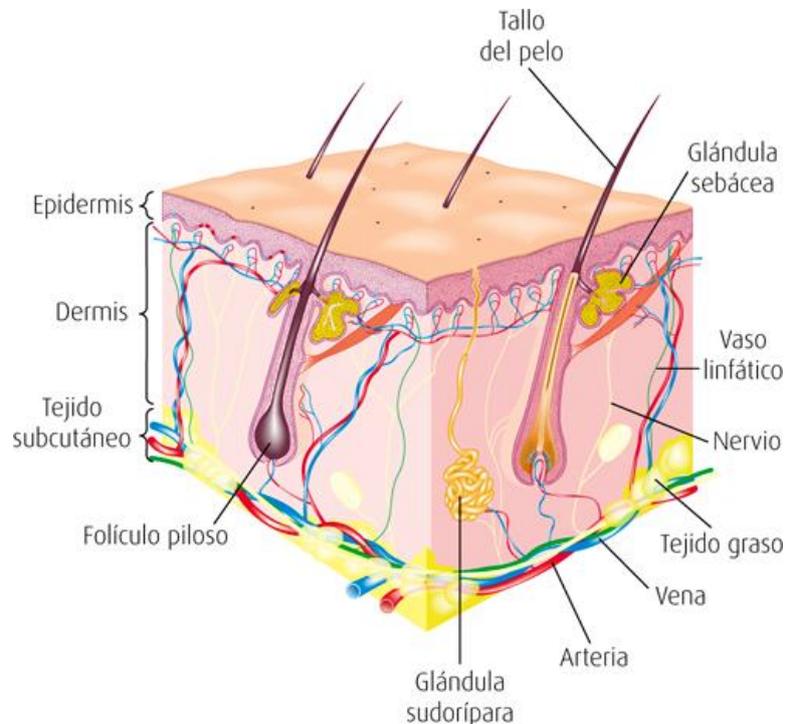
Introducción	4
Material y métodos	11
Resultados	16
Discusión	20
Referencias	24

## Introducción

### **La piel. Características histológicas**

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano tanto por su peso como por su extensa superficie.

La piel se puede dividir en tres capas (Figura 1):



**Figura 1.** Esquema representativo de una sección de piel. (Extraído de Sepúlveda Saavedra, 2014)

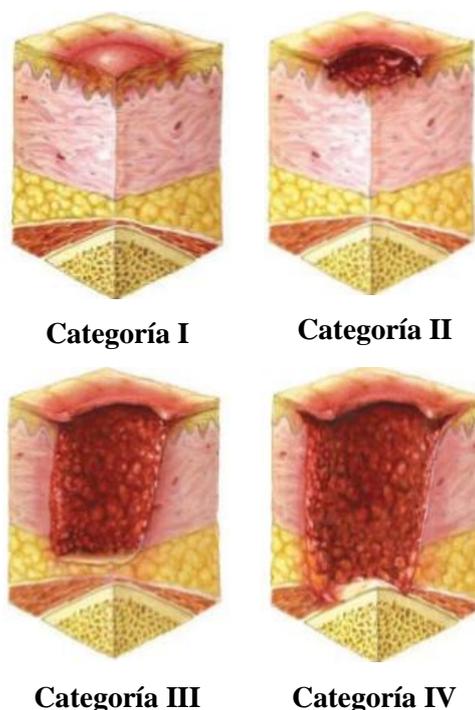
- **Epidermis:** es la capa más superficial. Está formada por un epitelio estratificado plano queratinizado compuesto por queratinocitos. En su base encontramos melanocitos y células madre del epitelio. También hay células presentadoras de antígeno, como las células de Langerhans, y células de Merkel que intervienen en la función mecanorreceptora.
- **Dermis:** se encuentra bajo la epidermis. Está compuesta principalmente de tejido conjuntivo que sirve de apoyo y provee resistencia. En ella aparecen los vasos sanguíneos que aportan un flujo sanguíneo cercano a la epidermis y prolongaciones nerviosas.
- **Hipodermis o tejido subcutáneo:** es la capa más interna. Está formada por tejido adiposo y el tejido conjuntivo laxo asociado. Sirve de almacenamiento de energía y como aislante.

Las funciones principales de la piel consisten en proteger al organismo de las agresiones medioambientales actuando como barrera frente a agentes físicos, químicos y biológicos. Además, también tiene funciones sensitivas, endocrinas, excretoras e interviene en la homeostasis regulando la temperatura corporal y las pérdidas de agua. Las lesiones de la piel pueden comprometer su integridad, y por tanto, también sus funciones (Ross y Pawlina, 2008).

## Lesiones de la piel. Úlceras por presión

Cualquier alteración de la estructura normal de la piel, con modificación de la función de esta se describe como una herida. Las úlceras por presión son lesiones o heridas isquémicas de la piel que pueden producir necrosis de la epidermis, dermis, tejido subcutáneo, músculo, articulación e incluso del hueso. Se producen por la presión ejercida entre los huesos y una superficie externa al paciente (acompañadas o no a fuerzas de rozamiento o cizallamiento). El efecto de la presión provoca una isquemia local, proceso en el que aumenta la permeabilidad capilar lo que conlleva vasodilatación, extravasación de líquido, infiltración celular e inflamación. Como resultado se desarrolla un eritema cutáneo, que se puede revertir si la presión desaparece antes de 30 minutos. De lo contrario, la isquemia local continuará dando lugar a fenómenos de necrosis en la piel que empeorarán cuanto mayor sea el tiempo de exposición a la presión (Blanco López, 2003).

Las úlceras por presión están asociadas a múltiples factores tanto directos como indirectos. Como factores directos intervienen las fuerzas de presión, rozamiento y cizallamiento ya mencionadas, además de problemas de salud que impliquen una menor movilidad del individuo. La inmovilidad es un riesgo, sobre todo para aquellos que deben permanecer mucho tiempo en camas o sillas. De hecho, pacientes con daños en la médula espinal son más propensos a desarrollar úlceras por presión (Srivastava et al., 2016). Por otro lado, los factores indirectos son varios, tales como: edad (más común entre los 60-80 años), mala nutrición, diabetes tipo 2, enfermedades vasculares, incontinencia urinaria o fecal o incluso problemas de salud mental (Bhattacharya y Mishra, 2015).



**Figura 2.** Imágenes representativas de las cuatro categorías en el desarrollo de una úlcera por presión. (Modificado de European Pressure Ulcer Advisory Panel et al., 2014)

La clasificación de las úlceras por presión (European Pressure Ulcer Advisory Panel et al., 2014) se divide en cuatro categorías (Figura 2):

- Categoría I: piel intacta con eritema ubicado sobre una prominencia ósea.
- Categoría II: la dermis sufre una pérdida parcial de espesor debido a la formación de una úlcera poco profunda. Puede tener aspecto de flictena abierta que contiene suero.
- Categoría III: el tejido se pierde y la grasa subcutánea puede quedar expuesta. Sin embargo, los huesos, músculos y tendones aún no son visibles. La profundidad de estas úlceras varía, pudiendo ser más profundas en las zonas donde hay más tejido adiposo en la hipodermis.

- Categoría IV: pérdida total de tejido que deja hueso, tendones, o músculos expuestos. Al igual que las úlceras de categoría III, a mayor cantidad de tejido adiposo en la hipodermis pueden ser más profundas.

### **La medicina regenerativa en el tratamiento de las úlceras por presión**

Las úlceras por presión son un problema a nivel sanitario que afecta con mayor frecuencia a individuos inmovilizados por mucho tiempo. Las consecuencias de estas lesiones son largas estancias hospitalarias, una menor calidad de vida y mayores gastos y cuidados necesarios. Sin embargo, todo esto podría evitarse ya que, gran parte de las úlceras por presión pueden prevenirse si se llevan a cabo las medidas correctas. Para prevenir la formación de úlceras es muy importante verificar que la piel del paciente no presente ninguna lesión. En las zonas de mayor riesgo a desarrollar una úlcera, se pueden usar cremas hidratantes o ácidos grasos hiperoxigenados. Estos ácidos grasos previenen la deshidratación, restablecen la película hidrolipídica, disminuyen los efectos del rozamiento y favorecen la regeneración celular y la microcirculación sanguínea. Si se detecta la herida en su fase más temprana (categoría I), esta se puede tratar con ácidos grasos hiperoxigenados junto a extractos de plantas medicinales (Bosch, 2004). Las úlceras por presión de categoría I y II pueden tratarse mediante alivio de la presión, una adecuada nutrición y desbridamiento de la herida para eliminar tejidos susceptibles a infección (Sarasúa et al., 2011).

Sin embargo, el tratamiento de las úlceras por presión de categoría III y IV consiste en muchos casos en una intervención quirúrgica. La cirugía es un método invasivo que puede suponer complicaciones. Además, solo el 14% de las úlceras se curan antes de los 79 días, lo que supone largas terapias con grandes tiempos de hospitalización (Bansal et al., 2005). Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos procedimientos menos complejos y costosos para tratar esta patología. Una alternativa a la cirugía es la medicina regenerativa.

La medicina regenerativa es una rama interdisciplinaria especializada en la cura, reparación o reemplazo de tejidos y órganos que han sido dañados. Este campo usa distintas estrategias como el trasplante de células autólogas o alogénicas (terapia celular), el uso de materiales que imiten la matriz extracelular dirigiendo la actividad celular, o una combinación de ambos (ingeniería tisular), para lograr la sustitución o reparación del tejido a nivel estructural y funcional (Mao y Mooney, 2015). Desde sus inicios, han sido aprobadas múltiples terapias con éxito. Una de estas terapias enmarcadas en la medicina regenerativa es el uso de una suspensión de células mononucleares autólogas extraídas de médula ósea; esta se realiza en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA, Oviedo) para el tratamiento de úlceras por presión de categoría IV. Se escogieron estas células por los prometedores resultados que otros grupos obtuvieron en el tratamiento de enfermedades como el infarto agudo de miocardio, derrames y otras heridas crónicas (Sarasúa et al., 2011).

En una herida de la piel, el proceso de curación normal consiste en un conjunto de señales y fases coordinadas. Se puede explicar en tres fases: fase inflamatoria, fase de proliferación y fase de maduración. Al principio, se produce la fase inflamatoria en la que hay coagulación de la sangre en la zona dañada para proteger de la entrada de microorganismos y de la pérdida de fluidos. A continuación, aumenta el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular en las zonas cercanas a la herida, lo que provoca hinchazón y enrojecimiento. El aumento de la permeabilidad produce una extravasación del plasma, lo que genera una matriz de fibrina, y también de células del sistema inmune como fagocitos y neutrófilos, entre otras. Estas células se encargan de retirar el tejido muerto y proteger de una posible infección. Tras la fase inflamatoria, ocurre una proliferación de células endoteliales y fibroblastos, debida a la secreción de factores de crecimiento por células inflamatorias. La matriz de fibrina que se había generado en la fase inflamatoria es reemplazada por el colágeno que sintetizan los fibroblastos. Algunos de estos fibroblastos se diferencian en miofibroblastos que, al contraerse, reducen el tamaño de la herida. El tejido sano que rodea la herida, junto a progenitores endoteliales, promueven la angiogénesis en el tejido dañado que es invadido por células endoteliales y capilares, formando lo que se denomina tejido granular. En los bordes de la herida, los queratinocitos comienzan a migrar sobre este tejido granular, bajo el coágulo de sangre. Por último, en la fase de maduración se produce la reepitelización de la herida y la dermis recupera sus características originales. Cuando estos procesos de reparación fallan se producen heridas crónicas (Vig et al., 2017).

La fracción de células mononucleares de médula ósea contiene células madre hematopoyéticas, células mesenquimales, células progenitoras endoteliales y otras células precursoras. En algunos estudios se ha observado que estas células favorecen la regeneración tisular porque promueven la neovascularización. Por otro lado, las células mesenquimales secretan factores paracrinos que podrían reclutar macrófagos y células endoteliales. Además, se cree que la actividad reparadora que dirigen las células mesenquimales involucra factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que intervienen en la inhibición de apoptosis, la inducción de angiogénesis, la reorganización de la matriz extracelular y el incremento del reclutamiento de células mononucleares circundantes (Sarasúa et al., 2011). Por otro lado, se sabe que la acción de los fibroblastos es clave para la curación de la herida ya que son la fuente principal de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y de la matriz extracelular. Al producirse una herida, se produce una proliferación de los fibroblastos, seguida de una migración necesaria para una cicatrización correcta. Un estudio *in vitro* pudo mostrar que el co-cultivo de fibroblastos dérmicos humanos con células mononucleares humanas de médula ósea favorecía la proliferación y migración de los fibroblastos por medio de factores paracrinos secretados por las células mononucleares. De hecho, en condiciones hipóxicas, esta potenciación del crecimiento y la migración era mucho mayor en comparación al control sin células

mononucleares. Como las células mononucleares parecen favorecer la proliferación y migración, sobre todo en condiciones hipóxicas (como las producidas por isquemia en úlceras por presión), estas células son buenas candidatas para su uso en un nuevo tratamiento terapéutico de este tipo de heridas crónicas (Menéndez-Menéndez et al., 2017). La ventaja que tiene el uso de la fracción completa de células mononucleares frente al aislamiento de las células mesenquimales para la terapia radica en que, el proceso de aislamiento requiere cultivos para amplificar el número de células mesenquimales, lo que supone un retraso en el tratamiento, mayor riesgo de contaminación y una terapia más costosa (Sarasúa et al., 2011).

### **Desarrollo de un nuevo modelo terapéutico**

Dadas las características de las células mononucleares, en el HUCA se inició un ensayo, para tratar úlceras por presión grado III-IV con células mononucleares del propio paciente. La técnica consiste en la retirada del tejido necrótico, tras lo cual, se cierra la herida dejando un hueco en el que se inyectan las células mononucleares de la médula ósea (extraídas previamente del paciente) en solución de suero salino heparinizado. Los beneficios de este tratamiento son múltiples. Por una parte, se acorta notablemente el tiempo de ejecución, y por otra, el método resulta menos laborioso, invasivo y costoso (Sarasúa et al., 2011).

La primera serie de pacientes tratados con esta terapia, mostraron ya unos resultados alentadores. Las úlceras evolucionaron favorablemente en un gran porcentaje de los casos (86,36%), y aquellos que no se recuperaron tenían otras patologías subyacentes como diabetes, hipertensión o cardiopatías (Sarasúa et al., 2011). En la Unidad de Terapia Celular del HUCA se ha continuado con este Ensayo Clínico aprobado por la Agencia del Medicamento y Productos Sanitarios. A pesar de estos resultados iniciales tan prometedores, se ha observado que esta terapia presenta algunas limitaciones ya que, en determinadas úlceras, por su ubicación y/o morfología, no se pueden aplicar las células en forma de suspensión.

### **Nuevas estrategias terapéuticas. La ingeniería tisular**

El problema que nos ocupa también puede ser abordado desde la perspectiva de la ingeniería tisular. “La ingeniería de tejidos consiste en la reconstrucción de tejidos funcionales mediante el empleo de células, materiales y factores bioactivos combinados de distintos modos, de forma que sean capaces de reparar o incluso mejorar la estructura y la función de un tejido sano”(Montuenga Badía et al., 2014). Existen tres aproximaciones posibles en lo que a ingeniería tisular se refiere (Montuenga Badía et al., 2014):

- Aislar células para expandirlas *ex vivo* y trasplantarlas
- Utilizar un soporte o matriz que tenga células incorporadas con el objetivo de imitar el tejido u órgano de interés y trasplantarlo

- Usar materiales acelulares que medien la regeneración tisular por medio de factores bioactivos que estimulen a células madre.

En nuestro caso, centraremos la atención en la combinación de las células con una matriz o soporte, ya que es la aproximación que guarda relación con el desarrollo del presente trabajo fin de grado.

En el mercado existe una gran variabilidad de matrices en cuanto a sus características. Todas estas matrices pueden clasificarse como celulares o acelulares, en función de si el soporte tiene células o no. Tanto las matrices celulares como las acelulares se han empleado en el desarrollo de trasplantes de piel artificial para el tratamiento de heridas crónicas como las úlceras por presión (Hughes et al., 2016).

La piel fue el primer órgano en producirse mediante ingeniería tisular y comenzar a emplearse a finales de la década de los 70. En las últimas décadas se han producido pieles sintéticas muy variadas, que se colocan en las heridas con el objetivo de: servir de barrera al exterior, proteger frente a patógenos, minimizar el dolor y promover la regeneración de la piel (Vig et al., 2017).

Las pieles artificiales generadas en ingeniería tisular requieren de células y un soporte o matriz que actúe como matriz extracelular. Estos soportes deben reunir una serie de características: ser estériles, no ser inmunogénicos ni producir inflamación, carecer de toxicidad, adherirse con rapidez a la superficie dañada, ser lo más económicos posibles, poder ser modificados con facilidad para ajustarse a la herida y, por último, ser de sencillo manejo. Por su parte, los biomateriales utilizados han de ser biodegradables, duraderos y tener una alta disponibilidad. Existen tres tipos de pieles artificiales: acelulares, celulares (de origen alogénico o autólogo) y las disponibles a nivel comercial (Vig et al., 2017).

Tanto las pieles artificiales acelulares como las celulares de origen alogénico constituyen una respuesta temporal al problema, ya que tienen que acabar siendo reemplazadas, mientras que las pieles artificiales con células autólogas representan una opción más permanente. Por otro lado, las que están disponibles en el mercado presentan problemas ya que producen una vascularización limitada, tienen una baja integridad mecánica, así como cierta dificultad para ser integradas, presentando un alto riesgo de producir rechazo inmunológico, y siendo, además de un coste elevado (Vig et al., 2017).

En el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias se ha desarrollado un soporte basado en plasma con células autólogas como piel artificial para el tratamiento de pacientes que han sufrido quemaduras. Esta piel artificial está formada por queratinocitos y fibroblastos autólogos obtenidos de una biopsia de piel junto a un soporte basado en plasma humano. Los fibroblastos se encuentran embebidos en la matriz de fibrina por coagulación del plasma que actúa como un

sustituto de la dermis, mientras que los queratinocitos se siembran sobre este. Esta técnica mostró unos resultados positivos tanto en un estudio preclínico en ratones, como a nivel clínico en pacientes con quemaduras (Llames et al., 2004).

Aunque se han ensayado una gran variedad de componentes para su uso como sustitutos de la dermis, las ventajas del plasma humano son la presencia en el mismo de moléculas esenciales como citocinas o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Además, otros sustratos producen una menor expansión *in vitro* y son más costosos. El plasma coagulado simula la cubierta temporal que se produce de forma natural al coagular la sangre en las heridas y que está involucrada en los procesos de reparación tisular. Por otro lado, al emplear células autólogas se evita el rechazo inmunológico. Los inconvenientes relacionados con este método son las limitaciones debidas a los tiempos y materiales requeridos para el cultivo, proliferación y preparación del soporte, así como los costes (Llames et al., 2004). Este soporte basado en plasma, debido a su gran adaptabilidad, también ha sido empleado para realizar trasplantes de islotes pancreáticos contenidos en la matriz junto a fibroblastos que se implantaron subcutáneamente en un modelo animal con el objetivo de tratar la diabetes tipo I (Pérez-Basterrechea et al., 2009).

### **Hipótesis y objetivos**

Con los antecedentes expuestos, en la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del HUCA se ha optado por el tipo de soporte mencionado, basado en plasma, para combinarlo con las células mononucleares autólogas de médula ósea que se encontrarían embebidas en el mismo. El uso de estas células se debe, como se comentó previamente, a la experiencia en el tratamiento de úlceras por presión con éxito empleando una suspensión de estas células. Por tanto, en un nuevo proyecto se pretende conseguir que la combinación del soporte junto a dichas células permita tratar aquellas úlceras que, debido a su morfología o ubicación, no podían ser tratadas mediante una suspensión de mononucleares autólogas de médula ósea. Es en el marco de este proyecto que surge la oportunidad de realizar este trabajo fin de grado para adecuar las características del soporte al proyecto que constaría de un ensayo preclínico mediante un modelo animal, seguido de un futuro estudio clínico.

Los **objetivos** planteados para este trabajo de fin de grado son los siguientes:

- La optimización de un soporte de plasma conteniendo células mononucleares para su aplicación en úlceras por presión en un modelo animal.

Se pretende con este objetivo encontrar las dimensiones, el espesor y la morfología adecuada del soporte, que debe presentar propiedades que faciliten su manipulación y aplicación en un ensayo preclínico.

- El análisis de la viabilidad de las células mononucleares autólogas de médula ósea en el soporte a distintos tiempos tras la fabricación.

La consecución de este objetivo permitirá determinar el tiempo del que se dispone en función de la supervivencia celular hasta el trasplante. Estos datos aportarán información de interés tanto para el estudio preclínico, como para el ensayo clínico que se realizaría *a posteriori*.

## **Material y métodos**

### **Elaboración del soporte basado en plasma sanguíneo**

El soporte consta de los siguientes componentes:

-Plasma sanguíneo como fuente de fibrinógeno que forme la red tridimensional de fibrina del soporte. El plasma procede del banco de sangre del HUCA, son plasmas de donantes anónimos. Estos se emplean en la práctica clínica diaria hasta la fecha de caducidad. Aquellos que no iban a poder ser empleados, se cedieron, con previa autorización del Comité de Ética del Principado de Asturias (Anexo 1) para usarlos en este trabajo. Se probaron distintos plasmas para verificar que las pequeñas variaciones de fibrinógeno no afectan a la coagulación del soporte.

-Suero fisiológico comercial (Braun) con una concentración de cloruro de sodio al 0,9%

-Solución de ácido tranexámico (Amchafibrin®) como antifibrinolítico

-Aproximadamente  $10^7$  células mononucleares por soporte, necesarias para la terapia, suspendidas en medio de cultivo DMEM. Sin embargo, para reducir el número de animales, en la mayoría de las pruebas cuyo único objetivo era optimizar los componentes acelulares del soporte se emplearon fibroblastos de la celuloteca de la Unidad.

-Solución de  $\text{CaCl}_2$  a 100 mg/mL, este componente es el último que se añade al preparar los soportes pues es el responsable de hacer que el plasma coagule y el soporte adquiera el aspecto tridimensional.

Para optimizar las cantidades adecuadas de cada componente se partió de unos volúmenes iniciales modificados de Pérez-Basterrechea et al., (2009) que se adaptaron para hacer soportes en placas de diferentes tamaños. Se realizaron numerosas pruebas (Tabla 1) variando los volúmenes de los compuestos hasta hallar el soporte de una consistencia, tamaño, espesor y tiempo de coagulación adecuados.

Una vez preparados los soportes, se cubrió la superficie de aquellos que lograron coagular con medio de cultivo y se mantuvieron en el incubador en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad relativa) hasta el momento de la extracción.

**Tabla 1.** Valores de los componentes de los soportes en las diferentes pruebas realizadas en el proceso de optimización.

	Suero salino (mL)	Plasma sanguíneo (mL)	Amchafibrin (μL)	Células en DMEM (μL)	CaCl <sub>2</sub> (μL)	Tipo de placa
Prueba nº 1	0,80	1,40	20	25	200	6 pocillos
Prueba nº 2	0,20	2,00	20	25	400	6 pocillos
Prueba nº 3	0,20	2,00	20	25	1000	6 pocillos
Prueba nº 4	0,20	2,00	20	25	2000	6 pocillos
Prueba nº 5	0,50	1,70	20	25	2000	6 pocillos
Prueba nº 6	0,20	2,00	20	25	400	6 pocillos
Prueba nº 7	0,80	1,30	20	25	100	6 pocillos
Prueba nº 8	0,80	1,20	20	25	400	6 pocillos
Prueba nº 9	0,90	1,40	20	25	100	6 pocillos
Prueba nº 10	1,00	1,20	20	25	200	6 pocillos
Prueba nº 11	0,90	1,40	20	25	200	6 pocillos
Prueba nº 12	0,60	0,93	13	17	133	12 pocillos
Prueba nº 13	0,30	0,46	10	10	67	24 pocillos
Prueba nº 14	0,32	0,36	10	10	50	24 pocillos
Prueba nº 15	0,32	0,26	10	10	67	24 pocillos
Prueba nº 16	-	0,46	10	50-100	50	24 pocillos
Prueba nº 17	0,32	0,36	10	100	50	24 pocillos
Prueba nº 18	0,21	0,47	10	100	50	24 pocillos
Prueba nº 19	0,10	0,58	10	100	50	24 pocillos
Prueba nº 20	-	0,68	10	100	50	24 pocillos
Prueba nº 21	0,10	0,40	10	100	50	24 pocillos
Prueba nº 22	0,05	0,45	10	100	50	24 pocillos
Prueba nº 23	-	0,50	10	100	50	24 pocillos

### Obtención de células mononucleares de médula ósea

En el presente estudio se utilizaron diez ratones CrI:CD1 (ICR, Charles River) como fuente de células mononucleares de médula ósea. Estos animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* en el bioterio de la Universidad de Oviedo hasta su sacrificio. El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Oviedo aprobó todo el procedimiento experimental llevado a cabo.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente se procedió a la obtención de médula ósea. Para ello se diseccionaron las extremidades inferiores en condiciones asépticas, y a continuación se realizó la disección de la piel y el tejido muscular con el objetivo de liberar los huesos. Una vez obtenidos estos, empleando el instrumental quirúrgico adecuado se cortaron las epífisis para facilitar el acceso al canal medular. A partir de las aberturas realizadas en los huesos se ejerció presión sobre la médula ósea para provocar su salida. Para ello se empleó una jeringuilla de 1 mL con suero salino al 0.9%, que se hizo pasar a través del canal medular. El suero salino conteniendo la médula ósea se depositó en un tubo de centrifuga.

Tras la obtención de la médula ósea se procedió al aislamiento de las células mononucleares. Esto se realizó empleando un gradiente de densidad (Ficoll Paque Plus®). La médula se depositó sobre este gradiente en una proporción 1 Ficoll : 2 Médula Ósea. A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm sin freno. Terminado el proceso, se observó que las células se distribuyen en función de su densidad. Se puede apreciar un halo blanquecino, que se corresponde a la fracción de células mononucleares. Empleando una pipeta y con sumo cuidado se recolectó el halo y se resuspendió en medio de cultivo. Este está compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle Medium) con un 10% de suero bovino fetal y un 1% de antibiótico-antimicótico. Este medio se empleó en todos los procesos, y se referirá a él como medio de cultivo. A continuación, se realizó un lavado, centrifugando las células en el medio de cultivo durante 10 minutos a 1500 rpm para eliminar los restos de Ficoll. Por último, el precipitado de células mononucleares se resuspendió en medio de cultivo fresco.

### **Extracción del soporte para su estudio**

El soporte, aunque se puede manipular, es delicado y por ello la extracción del pocillo donde se fabricó debe realizarse con sumo cuidado. Para facilitar el proceso, en condiciones estériles se recortó un trozo de apósito impregnado Linitul (al que previamente se le ha retirado la capa cérea que lo recubre) de un tamaño ligeramente inferior al soporte. El fragmento de apósito recortado se depositó cuidadosamente sobre el soporte. Para facilitar su adhesión se emplearon unas gotas de pegamento biológico Hystoacril®. Con unas pinzas se extrajo el soporte, que mantiene su forma por la consistencia que le aporta el apósito al que está unido. Alternativamente, se retiró el soporte de la placa colocándolo en una placa de Petri. De este modo, el apósito se pegó tras extraer el soporte.

El soporte unido al apósito se depositó en un tubo de 50 mL con medio de cultivo DMEM, en el que se mantendría hasta que se vaya a utilizar, o bien para su estudio histológico o en un futuro para la cirugía. En caso de emplearlo en el modelo animal para la úlcera, el apósito favorece su aplicación, pues permitiría realizar unos puntos de sutura en los extremos, en caso de que fuera necesario.

### **Estudio microscópico del soporte**

#### Fijación e inclusión

Para poder analizar la estructura microscópica del soporte, algunos de ellos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante aproximadamente 24 horas. Para poder incluirlos en parafina fue necesario deshidratarlos sumergiéndolos durante 15-30 min en una serie de disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50%, 70%... 100%). A continuación, y como paso intermedio se hicieron dos pases en xilol de 30 minutos cada uno y finalmente se embebieron en parafina. Una vez que el bloque de parafina con el soporte incluido estaba procesado se realizaron cortes de 7-10  $\mu\text{m}$  con la ayuda de un microtomo (Reichert Jung).

Los portaobjetos con las secciones se introdujeron en xilol para retirar la parafina (2 x 10 min). Seguidamente se pasaron por una serie de disoluciones de alcohol de concentraciones decrecientes para rehidratarlas. Este proceso es necesario porque los compuestos de la tinción son hidrosolubles.

Para observar al microscopio tanto la estructura como la distribución de las células del soporte se realizaron las siguientes tinciones:

#### Hematoxilina-Eosina

Algunas secciones se tiñeron durante 7 min con hematoxilina de Harris (Merck). A continuación, se lavaron con agua corriente hasta que la coloración viró de rojo a violeta y posteriormente se tiñeron con Eosina (Merck) al 1% durante 1 min. Por último, se deshidrataron rápidamente en etanol de 96% y de 100%, se pasaron por xilol y, finalmente, se montaron con medio hidrófobo (Entellan, Merck) para su posterior observación al microscopio óptico.

#### Marcadores fluorescentes

-4',6-diamino-2-fenilindol, DAPI. El DAPI es un marcador nuclear, que tiñe los ácidos nucleicos, de forma que se pueden observar de color azul al microscopio de fluorescencia, al ser excitado el colorante con luz ultravioleta. Se preparó una disolución de DAPI (Sigma-Aldrich) a 1 µg/mL siguiendo las indicaciones de la casa comercial, y se mantuvo en oscuridad para preservar las cualidades fluorescentes del marcador. Algunas de las secciones fueron incubadas con este marcador para observar la distribución de las células en el soporte.

-FluoroQuench™. Este colorante se basa en dos componentes: naranja de acridina y el bromuro de etidio. El naranja de acridina tiñe las células vivas de color verde mientras que, el bromuro de etidio tiñe de rojo las células muertas. Para las secciones incluidas en parafina sólo se visualizó el bromuro de etidio, debido a que, al estar las células fijadas, un marcador de células vivas no ofrece resultados adecuados.

#### **Análisis de la viabilidad celular en el soporte**

Con el objetivo de estudiar la viabilidad en distintos tiempos tras realizar el soporte en placas de 24 pocillos se ensayaron tres marcadores distintos:

- 4',6-diamidino-2-fenilindol, DAPI

Se comprobaron dos formas diferentes de marcaje para las células:

- a) Se añadieron 2 mL del marcador preparado como se mencionó anteriormente a un precipitado de células, se resuspendieron en la mezcla para asegurar que las células se marquen, y se incubaron en oscuridad a condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa) durante 20-30 minutos. Una vez las células estaban marcadas se procedió a la realización del soporte.
- b) Se añadió esta disolución al soporte preparado en el pocillo y se incubó en las mismas condiciones. Pasado el tiempo, se retiró el colorante y se lavó con PBS para eliminar el posible exceso.

- Naranja de acridina/bromuro de etidio (FluoroQuench™)

Al igual que con el DAPI, se hicieron dos formas de marcaje, es decir, se incubaron las células antes de incluirlas en el soporte o se incubó el soporte con este marcador. Para ello, se añadieron 50 µL del preparado comercial de FluoroQuench™, junto a 2 mL de medio de cultivo DMEM, sobre el precipitado de células que se resuspendió. A continuación, se incubaron en oscuridad durante 20-30 minutos en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa). O bien se añadió esta disolución al soporte preparado en el pocillo y se incubó en las mismas condiciones. Pasado el tiempo, se retiró el colorante y se lavó con PBS para eliminar el posible exceso. Tras la incubación, se realizaron las pruebas.

- Diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CellTracker™ Green CMFDA)

El CellTracker™ se fundamenta en el compuesto CMFDA que es estable, no tóxico y retenido por las células. El grupo clorometil del CMFDA reacciona con grupos tiol por medio de la Glutación S-Transferasa que es ubicua. En principio, el CMFDA carece de color, requiere de una hidrólisis previa de los acetatos por esterasas citosólicas, para obtener un producto de color verde al microscopio de fluorescencia.

Se preparó la disolución de CellTracker™ de 5,6 µg/mL siguiendo las instrucciones de uso de la casa comercial. Con el fin de analizar qué forma de marcaje era la más adecuada al igual que con los marcadores anteriores, se incubaron las células de dos formas, unas antes de añadir al soporte y otras una vez estaban embebidas en él.

**Tabla 2.** Pruebas realizadas para los tres marcadores en placas de 24 pocillos.

PRUEBAS DE MARCADORES EN PLACAS DE 24 POCILLOS					
Medio físico	Plasma sanguíneo(mL)	Amchafibrina (µL)	Células en DMEM (µL)	CaCl <sub>2</sub> (µL)	Marcador
<b>1. Soporte (CONTROL)</b>	0,5	10	100 (medio de cultivo sin células)	50	NO
<b>2. Soporte (CONTROL)</b>	0,5	10	100	50	NO
<b>3. Suspensión (CONTROL POSITIVO)</b>	-	-	660	-	SI
<b>4. Soporte (x2)</b>	0,5	10	100	50	SI

En la columna de marcador se especifica únicamente si se empleó o no ya que el volumen dependerá del marcador (DAPI, FluoroQuench™, CellTracker™).

Para los tres marcadores se realizaron las mismas pruebas (Tabla 2), todos los soportes utilizados fueron realizados con los volúmenes de la prueba nº23 (Tabla 1):

1. Un soporte sin células. Sirve como control.
2. Un soporte que contiene células sin marcar. También sirve de control.

3. Una suspensión de células marcadas en medio DMEM como control positivo para asegurar que los marcadores funcionan correctamente.
4. Dos soportes que contienen las células marcadas antes de la coagulación del soporte.

Alternativamente, con el objetivo de encontrar la mejor forma de marcaje para un estudio de la viabilidad celular se realizaron 20 soportes adicionales (10 x 2, la prueba se realizó por duplicado) que se fijaron, deshidrataron y embebieron en parafina siguiendo el protocolo descrito para el estudio histológico. Sin embargo, estos soportes se diferencian en que la fijación se produjo a distintos tiempos (Tabla 3). Tras 30-45 minutos en condiciones estándar de cultivo para facilitar la coagulación del soporte se pusieron a temperatura ambiente, este momento se consideró t=0 y en él se fijaron dos soportes. Después de 30 minutos expuestos a temperatura ambiente se fijaron otros dos soportes (t=30min), los siguientes a los 90 minutos (t=90min) y a continuación a 120 minutos (t=120min). Los dos últimos se almacenaron a 4°C durante la noche y se fijaron al día siguiente (t=24h). Además, cada pareja se realizó empleando en uno los volúmenes de la prueba n° 22 y en el otro los de la prueba n° 23 (Tabla 1) para ver si la ausencia de suero salino afectaba a la viabilidad de las células o no.

**Tabla 3.** Tiempos de fijación de los soportes y volúmenes de los componentes empleados.

Tiempo a temperatura ambiente	Suero salino (mL)	Plasma sanguíneo (mL)	Amchafibrina (μL)	Células en DMEM (μL)	CaCl <sub>2</sub> (μL)
N°1 a t=0	-	0,50	10	100	50
N°1 a t=30 min					
N°1 a t=90 min					
N°1 a t=120 min					
N°1 a t=24 h					
N°2 a t=0	0,05	0,45	10	100	50
N°2 a t=30 min					
N°2 a t=90 min					
N°2 a t=120 min					
N°2 a t=24 h					

## **Resultados**

### **Optimización de las características del soporte**

El soporte, modificado a partir del descrito por Pérez-Basterrechea et al.(2009) constaba de 8 mL de suero salino, 14 mL de plasma sanguíneo, 0,2 mL de Amchafibrin®, 0,25 mL de células en medio de cultivo y 2 mL de CaCl<sub>2</sub>. Para adaptarlo al tamaño adecuado para este trabajo se dividieron los volúmenes entre 10 para obtener el que sería el soporte de partida, etiquetado como prueba n° 1 (Tabla 1).

Sin embargo, este soporte tardaba 3 horas en coagular (Tabla 4), por lo que se realizaron más pruebas con el fin de reducir el tiempo que tarda en formarse. Estas pruebas fueron las n<sup>os</sup> 2, 3, 4 y 5. En ellas se redujo el suero salino y se aumentó el plasma sanguíneo para tratar de aumentar los niveles de fibrinógeno disponibles para la solidificación del soporte y, además, en cada una de estas pruebas se empleó un volumen mayor de CaCl<sub>2</sub> para favorecer la coagulación. Sin embargo, ninguno llegó a coagular salvo la prueba número 5 que tardó unas 5 horas.

**Tabla 4.** Tiempo de coagulación de cada prueba realizada.

	<b>Condiciones del soporte</b>	<b>Tiempo de coagulación</b>
<b>Prueba n<sup>o</sup> 1</b>	S:0,8 P:1,4 A:20 C:25 Ca:200 Po:6	3 horas
<b>Prueba n<sup>o</sup> 2</b>	S:0,2 P:2,0 A:20 C:25 Ca:400 Po:6	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 3</b>	S:0,2 P:2,0 A:20 C:25 Ca:1000 Po:6	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 4</b>	S:0,2 P:2,0 A:20 C:25 Ca:2000 Po:6	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 5</b>	S:0,5 P:1,70 A:20 C:25 Ca:2000 Po:6	5 horas
<b>Prueba n<sup>o</sup> 6</b>	S:0,2 P:2,0 A:20 C:25 Ca:400 Po:6	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 7</b>	S:0,8 P:1,3 A:20 C:25 Ca:100 Po:6	2 horas
<b>Prueba n<sup>o</sup> 8</b>	S:0,8 P:1,2 A:20 C:25 Ca:400 Po:6	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 9</b>	S:0,9 P:1,4 A:20 C:25 Ca:100 Po:6	30 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 10</b>	S:1,0 P:1,2 A:20 C:25 Ca:200 Po:6	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 11</b>	S:0,9 P:1,4 A:20 C:25 Ca:200 Po:6	20 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 12</b>	S:0,6 P:0,93 A:13 C:17 Ca:133 Po:12	16 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 13</b>	S:0,3 P:0,46 A:10 C:10 Ca:67 Po:24	24 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 14</b>	S:0,32 P:0,36 A:10 C:10 Ca:50 Po:24	1 hora
<b>Prueba n<sup>o</sup> 15</b>	S:0,32 P:0,26 A:10 C:10 Ca:67 Po:24	No coagula
<b>Prueba n<sup>o</sup> 16</b>	S:0 P:0,46 A:10 C:50-100 Ca:50 Po:24	2 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 17</b>	S:0,32 P:0,36 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	10 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 18</b>	S:0,21 P:0,47 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	5 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 19</b>	S:0,1 P:0,58 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	5 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 20</b>	S:0 P:0,68 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	5 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 21</b>	S:0,1 P:0,40 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	10 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 22</b>	S:0,05 P:0,45 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	10 minutos
<b>Prueba n<sup>o</sup> 23</b>	S:0 P:0,50 A:10 C:100 Ca:50 Po:24	10 minutos

Se detallan los volúmenes y el tipo de placa empleados (S=Suero salino en mL, P=Plasma sanguíneo en mL, A=Amchafibrin® en µL, C=Células suspendidas en medio de cultivo en µL, Ca=CaCl<sub>2</sub> en µL, Po=número de pocillos de la placa).

A continuación, empleando los soportes de las pruebas n<sup>o</sup> 1 y n<sup>o</sup> 5 como controles ya que se sabía que estos coagulaban, se realizó la prueba n<sup>o</sup> 6 que tampoco llegó a adquirir la consistencia de gel deseada. Por lo tanto, se tomaron como referencia los volúmenes de la prueba n<sup>o</sup> 1, que era la que polimerizaba en un menor tiempo, y se realizaron pequeñas variaciones de esta para encontrar soportes que coagulasen aún en menos tiempo. Las modificaciones se realizaron disminuyendo un componente en favor de otro, mientras que los otros tres se mantenían constantes respecto a la

prueba nº 1. Estas corresponden con las pruebas nº 7, 8, 9 y 10, de las que solo la nº 7 y la nº 9 lograron coagular en 2 horas y 30 minutos respectivamente. Debido a que la prueba nº 9 tiene un tiempo de coagulación corto, a partir de esta se realizó la prueba nº 11, a la que se aumentó ligeramente el volumen de  $\text{CaCl}_2$  empleado para disminuir la espera aún más. Al realizar estos cambios la prueba nº 11 consiguió solidificar en tan sólo 20 minutos. Todas estas pruebas se llevaron a cabo en placas de seis pocillos.

Para el supuesto de que el modelo de úlcera del estudio preclínico necesitara soportes de menor tamaño, se procedió a realizar pruebas en placas de doce y veinticuatro pocillos. Con el objeto de obtener los volúmenes que se deberían emplear, se partió del volumen total adecuado para los pocillos de este tipo de placas y se tomaron volúmenes de los distintos compuestos del soporte manteniendo la proporción entre componentes de la prueba nº 11. Estos soportes se corresponden con los de las pruebas nº 12 (en placa de 12 pocillos) y nº 13 (en placa de 24 pocillos), que lograron formarse en 16 y 24 minutos, respectivamente, valores similares al esperado de 20 minutos en la prueba nº 11.

Además, se realizaron más pruebas utilizando solamente placas de veinticuatro pocillos. Partiendo de la prueba nº 13 se realizaron las pruebas nº 14 y 15, sin embargo, la nº 14 tardó 1 hora en coagular y la nº 15 ni siquiera llegó a hacerlo. Como estos resultados eran incluso peores que los de la prueba nº 13, se realizó una nueva prueba: la nº 16. Para esta última, se optó por no añadirle suero salino para concentrar el fibrinógeno del plasma y el  $\text{CaCl}_2$  que favorece la coagulación. Este cambio hizo que los soportes de la prueba nº 16 se formasen en tan sólo 2 minutos. Debido al corto tiempo que necesitaban para coagular los soportes de la prueba nº 16, se determinó investigar los efectos que la disminución de suero salino tenía en el tiempo de polimerización.

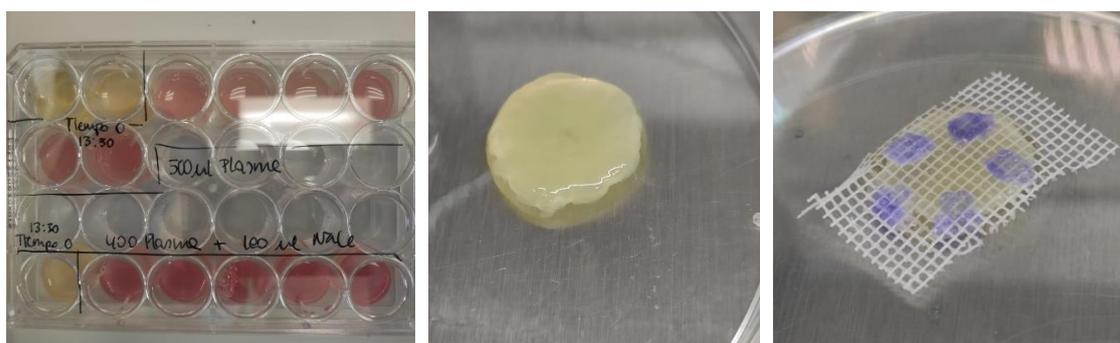
De este modo, se ensayaron las pruebas nº 17, 18, 19 y 20. Estas cuatro pruebas parten de un volumen inicial de suero salino, que en cada prueba va disminuyendo en favor del plasma sanguíneo hasta que en la última ya no se añade suero salino. Así pues, la prueba nº 17 tiene una proporción de sus componentes similar a la prueba nº 14, cuyo volumen de suero salino se redujo (aumentando proporcionalmente el de plasma sanguíneo), hasta que en la prueba nº 20 ya no se añadió suero salino. Se obtuvo que la prueba nº 17 tardó 10 minutos en coagular, mientras que las pruebas nº 18, 19 y 20, que tenían menos suero salino, tardaron solamente 5 minutos. Por último, en las pruebas nº 21, 22 y 23 se siguió el mismo procedimiento (con ligeros cambios en la proporción de los componentes). Los tres tipos de soportes consiguieron coagular en 10 minutos.

Por otro lado, a lo largo del proceso de optimización, en aquellas pruebas que sí lograron coagular se ensayó si el uso de distintos plasmas que podrían tener variaciones en las concentraciones de fibrinógeno podría afectar a la formación del soporte. En total, se emplearon seis plasmas

distintos. Para ninguno de los seis se observaron variaciones significativas en el tiempo que tardaba en coagular, respecto a aquellos soportes realizados con la misma proporción de sus componentes, pero con plasmas de otros donantes.

### Descripción macroscópica y microscópica de los soportes

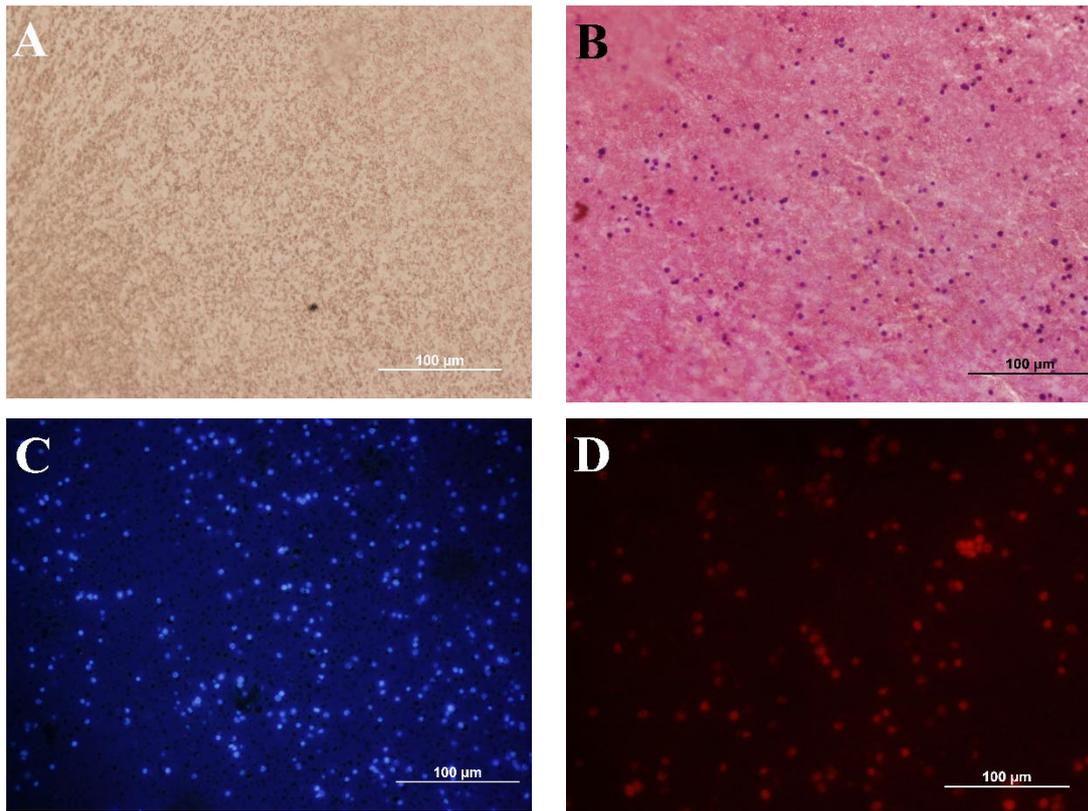
A nivel macroscópico, el soporte es blando y gelatinoso (Figura 3). Su aspecto es circular, de un diámetro de 3,48 cm, 2,21 cm y 1,56 cm (dependiendo de si se realiza en una placa de 6, 12 o 24 pocillos respectivamente), y de un espesor de aproximadamente 1 mm. Además, su consistencia relativamente compacta hace que no se rompa con facilidad al ser manipulado.



**Figura 3.** Aspecto macroscópico de los soportes. A la izquierda se pueden apreciar varios soportes en una placa de 24 pocillos, de los cuales algunos tienen un color rojizo debido al medio de cultivo que tienen añadido sobre ellos. En el centro se puede ver un soporte fuera de la placa. A la derecha el soporte se encuentra unido al apósito Linitul gracias al pegamento biológico Hystoacril® (puntos azules).

En cuanto a los marcadores empleados, todos permitían visualizar las células tal y como se esperaba empleando el microscopio de fluorescencia. También se observó que el marcador DAPI permitía ver los núcleos de las células con claridad, incluso si este se añadía posteriormente tras la coagulación del soporte. Cabe destacar, que el soporte también emite fluorescencia en la misma longitud de onda que los marcadores fluorescentes verdes como CellTracker™ o FluoroQuench™ (en el caso de que las células se encuentren vivas), por lo que la visualización se dificulta con estos marcadores.

A nivel microscópico se observa que, en el soporte sin marcar ni teñir destaca el aspecto de gel homogéneo formado por la red de fibrina tridimensional que se forma (Figura 4A). En los soportes teñidos mediante hematoxilina-eosina, se aprecia un gran número de células repartidas de forma homogénea por todo el volumen de estos. En el soporte sin marcar es difícil diferenciar las células y sus núcleos ya que se confunden con la matriz. Gracias a la tinción con hematoxilina-eosina se pueden apreciar los núcleos en morado, que se distinguen del compacto gel de fibrina que tiene un color rosado (Figura 4B). En las imágenes de células marcadas con DAPI (Figura 4C) y FluoroQuench™ (Figura 4D) también se observan células distribuidas homogéneamente por todo el volumen del soporte.



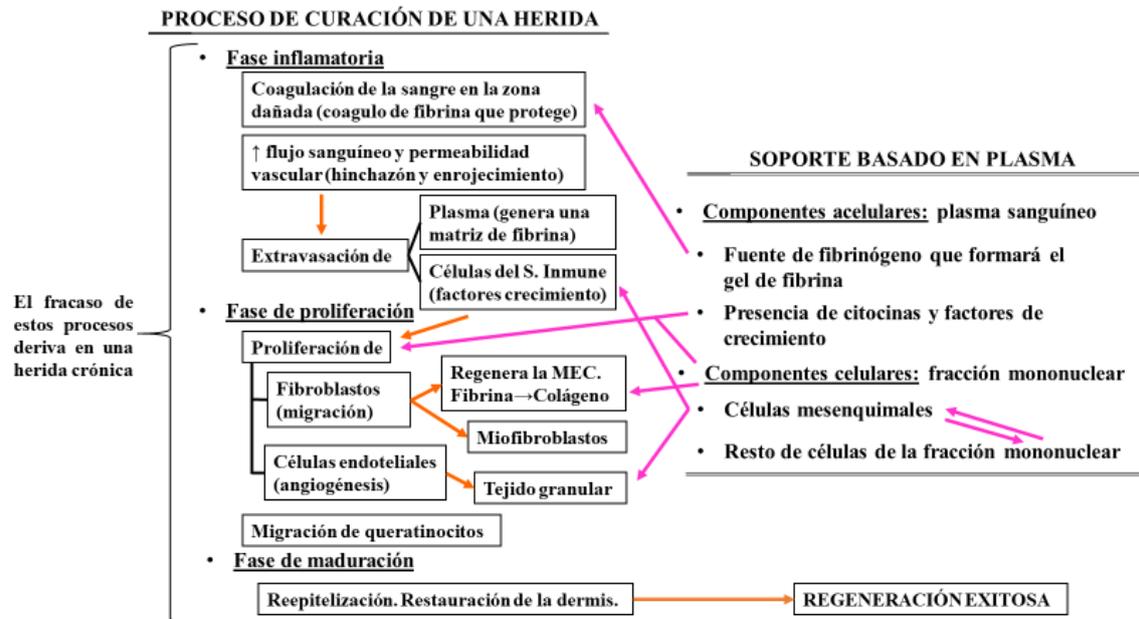
**Figura 4.** Secciones de soportes sanguíneos basados en plasma fijados, visualizados por microscopía con distintas técnicas. A: soporte en fresco, sin marcar ni teñir. B: soporte teñido con hematoxilina eosina. C: soporte marcado con DAPI. D: soporte marcado con FluoroQuench™ en el que los núcleos celulares se aprecian de color rojo ya que las células están fijadas, y por lo tanto muertas.

### **Discusión**

Las úlceras por presión constituyen un gran problema sanitario que debe tratar de evitarse implantando protocolos de prevención (Bosch, 2004). En caso de producirse, las úlceras de categoría III o IV, frecuentemente son sometidas a intervenciones quirúrgicas que implican complicaciones en una gran parte de los casos (Bansal et al., 2005). Una alternativa es la terapia de células mononucleares autólogas de médula ósea en suspensión diseñada en la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Servicio de Hematología y Hemoterapia (HUCA) (Sarasúa et al., 2011). Sin embargo, el soporte optimizado en este trabajo fin de grado tiene unas características óptimas para su posible aplicación en aquellas úlceras que antes no podían tratarse mediante esta terapia.

Se cree que este soporte podría facilitar la regeneración, mediante los efectos que promueven sus componentes. Como se puede apreciar en la Figura 5, este favorece la curación de la herida apoyando el proceso en varios niveles. El soporte de fibrina además de contener células puede aportar cierta protección a la herida. Por otro lado, la presencia de determinadas citocinas y factores presentes en el plasma como aquellos que derivan de las células del soporte favorecen la proliferación de fibroblastos y células endoteliales, que son esenciales en el proceso de

regeneración. Las células mesenquimales pueden reclutar otras células mononucleares, y además son capaces de inducir la reorganización de la matriz extracelular y la angiogénesis (Sarasúa et al., 2011). Además, algunos estudios sugieren que el resto de mononucleares de la médula ósea son capaces de cooperar con las células mesenquimales mediante determinados factores, mejorando la capacidad regenerativa de estas células (Urbán et al., 2008).



**Figura 5.** Esquema representativo del proceso fisiológico de reparación de una herida y de cómo los distintos componentes del soporte favorecen el proceso (las flechas naranjas indican relación dentro del proceso fisiológico, mientras que, las flechas rosas indican cómo el soporte promueve una determinada acción).

En este trabajo, se ha logrado determinar cuáles son las proporciones óptimas de los compuestos que conforman el soporte. Estos serían aquellos que lograron coagular en menos de 15 minutos, ya que suponen un menor tiempo de cara a aplicarlos como tratamiento.

El tamaño de soportes con un diámetro de 1,56 cm realizados en placas de 24 pocillos, parece ser el ideal para el estudio preclínico al que se pretende adaptar el soporte. Esto se debe a que es un tamaño similar al modelo de úlcera por presión que se pretende desarrollar. Por lo tanto, es el más indicado, ya que permite emplear menos materiales (lo que supone también un menor coste) y adaptarse correctamente a la úlcera.

En posibles futuros estudios clínicos, o incluso si se llegase a emplear como tratamiento, según el tamaño de las úlceras se podrían adaptar las pruebas que mejores resultados obtuvieron a pocillos de mayor diámetro o incluso a frascos de cultivo. Para ello, a partir de un volumen máximo final que debería tener la mezcla (teniendo en cuenta que el grosor del soporte es de alrededor de 1 mm) se podría obtener la cantidad de los distintos componentes manteniendo la proporción de alguna de las pruebas más exitosas. Es posible que soportes mayores tengan una

mayor probabilidad de romperse, aunque ajustando bien el apósito Linitul antes de desplazar el soporte podría evitarse, al reforzar su estructura.

El estudio de los distintos marcadores de fluorescencia permitió determinar que el mejor de los tres utilizados (DAPI, CellTracker™ y FluoroQuench™) probablemente sea DAPI, ya que es el que no emite fluorescencia en las longitudes de onda del verde. Esto es importante, ya que el soporte tiene fluorescencia a la misma longitud de onda en el verde que los otros dos, lo cual puede dificultar la visualización. Como alternativa, se podrían probar otros marcadores fluorescentes de CellTracker™ disponibles, que emiten fluorescencia en otra longitud de onda. Sería de gran interés realizar un estudio de la viabilidad celular que, debido a las limitaciones de tiempo por la pandemia de COVID-19, no ha podido finalmente llevarse a cabo. Tampoco se pudo determinar la viabilidad de los soportes realizados, fijados a distintos tiempos tras su formación (Tabla 3). Proponemos que el estudio de la viabilidad podría realizarse empleando marcadores como DAPI y marcadores de apoptosis que permitan cuantificar la viabilidad celular para los distintos tiempos de fijación. Además, sería muy interesante comparar los datos de los soportes fijados con otros sin fijar que tengan células vivas.

Por otro lado, parece ser que la disminución de la cantidad de suero salino (incluso su eliminación) en favor de plasma sanguíneo disminuye el tiempo que el soporte tarda en adquirir la consistencia deseada. Por consiguiente, comprobar los efectos que estas variaciones de suero salino tienen sobre la viabilidad celular podría ser muy útil. Incluso podría suponer el descarte de alguna de las pruebas que en este trabajo han resultado ser las mejores. De hecho, también se podría estudiar la viabilidad celular para los distintos tipos de soportes que más rápido coagulan para averiguar cuáles de ellos preservan una mayor actividad celular, ya que esta puede verse afectada por variaciones de las concentraciones. Por ejemplo, se ha visto que en soportes de fibrina, ciertas concentraciones de fibrinógeno pueden ser demasiado altas, lo que impide la proliferación y extensión de células mesenquimales de médula ósea por el soporte (Bensaïd et al., 2003).

Si esta variación resultara no tener efectos sobre la viabilidad se podría emplear salino, o no, según las condiciones que requiera el desarrollo del soporte. Por ejemplo, en el estudio preclínico los soportes que se necesitan de un diámetro de 1,56 cm son pequeños, por lo que, no requieren mucha cantidad de plasma sanguíneo. De este modo, para este tipo de estudio se podrían realizar soportes que no tengan suero salino. Sin embargo, como se comentó anteriormente, un posible estudio clínico o tratamiento requeriría de soportes de mayor tamaño. Estos tendrán que realizarse con plasma proveniente del paciente y, si este llegase a ser limitante porque se necesita demasiado debido a las dimensiones del soporte o por el estado del paciente, podría ser una solución adecuada emplear la proporción de componentes de aquellas pruebas que tienen suero salino y que reducen el volumen de plasma sanguíneo que se necesita.

Por otro lado, el uso de plasma sanguíneo de distintos donantes no tuvo efectos significativos sobre la coagulación. Por lo tanto, se espera que las variaciones interpersonales en los niveles de fibrinógeno plasmáticos no afectarían negativamente al desarrollo de la terapia, siempre y cuando su concentración plasmática no se encuentre comprometida gravemente por algún tipo de patología.

En cuanto al método de extracción del soporte, por lo general, el método que consiste en sacar el soporte primero y después pegarle el apósito resulta más sencillo para todos los casos. Por lo tanto, esta parece ser la forma más apropiada de llevarlo a cabo. Se podría emplear el otro método, que consistía en recortar un trozo de apósito y depositarlo en el pocillo para pegarlo antes de la extracción, en placas de 6 o 12 pocillos. Aunque, el tener que recortar el apósito del tamaño adecuado para que encaje en el pocillo podría suponer una fuente de error, por lo que parece recomendable el otro método. Además, para placas de 24 pocillos, que tienen un tamaño bastante reducido, este último método es mucho más complicado, ya que dificulta el manejo. Además, en ocasiones el pegamento que se añadía sobre el apósito se pegaba a las paredes del pocillo al difundir, por lo que, se aconseja extraer el soporte en primer lugar y pegar el apósito a continuación.

Otra posible línea de estudio podría centrarse en los exosomas producidos por las células mesenquimales. Las células mesenquimales se encuentran en investigación para numerosas terapias enfocadas en múltiples enfermedades. Sin embargo, sus mecanismos de acción aún no se comprenden del todo. Además del efecto de factores paracrinos, en los últimos años surgieron evidencias de que los exosomas también estaban involucrados en el proceso (Phinney y Pittenger, 2017). Los exosomas son un grupo de vesículas extracelulares de unos 40-150 nm y una densidad de 1,1-1,18 g/mL. Estos tienen moléculas de superficie, y contienen proteínas junto a material genético como micro-ARNs (Toh et al., 2018). Se ha visto que podrían favorecer el proceso de regeneración evitando una respuesta inflamatoria desmesurada que dañe el tejido. Asimismo, pueden favorecer la angiogénesis, la proliferación y la reepitelización (Wu et al., 2018). En concreto, los exosomas de células mesenquimales de médula ósea parecen tener un gran potencial terapéutico (Álvarez-Viejo, 2020). Por lo tanto, desde el punto de vista de este estudio podría ser apropiado cuantificar la cantidad de exosomas producidos por las células mononucleares en el soporte, incluso de determinados factores paracrinos, y comprobar si sus niveles varían respecto a un cultivo convencional de estas mismas células. Estos resultados podrían indicar el potencial terapéutico de este soporte y cómo el ambiente de este afecta a las células. Incluso si la viabilidad no varía en las distintas pruebas óptimas que se encontraron, la secreción de este tipo de mediadores podría verse afectada al variar las concentraciones de los componentes del soporte, lo que también podría suponer el descarte de alguna de las mejores proporciones obtenidas.

En definitiva, sería muy interesante realizar un estudio de la viabilidad celular de las células mononucleares en el soporte tras su elaboración y en las distintas variaciones de los mejores soportes, así como ejecutar un análisis del potencial terapéutico que estas células tienen cuando se encuentran ubicadas en un soporte de este tipo y en sus distintas variaciones que polimerizan más rápido.

## **Conclusiones**

El soporte basado en plasma sanguíneo descrito y elaborado en este trabajo podría emplearse en un estudio preclínico como una nueva aproximación al tratamiento de las úlceras por presión. En este estudio se ha podido determinar las proporciones óptimas de sus componentes para realizar este soporte en un tiempo adecuado. Además, si las condiciones de estas no influyen negativamente a las células mononucleares de médula ósea, se tendrían múltiples opciones a elegir según las circunstancias en las que se realice.

El análisis de marcadores pone de relieve que el más factible para su uso en un estudio de viabilidad sería el DAPI junto a algún marcador de apoptosis. Por último, el estudio histológico muestra claramente que la estructura de gel es homogénea y presenta células dispersadas en todo su volumen.

## **Referencias**

- Álvarez-Viejo M. (2020). Mesenchymal stem cells from different sources and their derived exosomes: A pre-clinical perspective. *World Journal of Stem Cells*, 12(2), 100-109. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i2.100>
- Bansal C., Scott R., Stewart D. y Cockerell C. J. (2005). Decubitus ulcers: A review of the literature. *International Journal of Dermatology*, 44(10), 805-810. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2005.02636.x>
- Bensaïd W., Triffitt J. T., Blanchat C., Oudina K., Sedel L. y Petite H. (2003). A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, 24(14), 2497-2502. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00618-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00618-x)
- Bhattacharya S. y Mishra R. K. (2015). Pressure ulcers: Current understanding and newer modalities of treatment. *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 48(1), 4-16. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.155260>
- Blanco López J. L. (2003). Definición y clasificación de las úlceras por presión. *El Peu*, 23(4), 194-198.
- Bosch Á. (2004). Úlceras por presión. Prevención, tratamiento y consejos desde la farmacia. *Offarm*, 23(3), 130-134.

- European Pressure Ulcer Advisory Panel, National Pressure Ulcer Advisory Panel (U.S.) y Pan Pacific Pressure Injury Alliance. (2014). *Prevention and treatment of pressure ulcers: Quick reference guide*. Cambridge Media, Perth.
- Hughes O. B., Rakosi A., Macquhae F., Herskovitz I., Fox J. D. y Kirsner R. S. (2016). A Review of Cellular and Acellular Matrix Products: Indications, Techniques and Outcomes. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(3S), 138S-147S. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002643>
- Llames S. G., Del Río M., Larcher F., García E., García M., Escamez M. J., Jorcano J. L., Holguín P. y Meana A. (2004). Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*, 77(3), 350-355. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000112381.80964.85>
- Mao A. S. y Mooney D. J. (2015). Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), 14452-14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- Menéndez-Menéndez Y., Otero-Hernández J., Vega J. A., Pérez-Basterrechea M., Pérez-López S., Álvarez-Viejo M. y Ferrero-Gutiérrez A. (2017). The role of bone marrow mononuclear cell-conditioned medium in the proliferation and migration of human dermal fibroblasts. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 22. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0055-z>
- Montuenga Badía L., Esteban Ruiz F. J. y Calvo González A. (2014). *Técnicas en histología y biología celular* (2ª Edición). Elsevier Masson, Barcelona.
- Pérez-Basterrechea M., Briones R. M., Álvarez-Viejo M., García-Pérez E., Esteban M. M., García V., Obaya A. J., Barneo L., Meana A. y Otero J. (2009). Plasma-fibroblast gel as scaffold for islet transplantation. *Tissue Engineering. Part A*, 15(3), 569-577. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0088>
- Phinney D. G. y Pittenger M. F. (2017). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 35(4), 851-858. <https://doi.org/10.1002/stem.2575>
- Ross M. H. y Pawlina W. (2008). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* (5ª Edición). Panamericana, Madrid.
- Sarasúa J. G., López S. P., Viejo M. Á., Basterrechea M. P., Rodríguez A. F., Gutiérrez A. F., Gala J. G., Menéndez Y. M., Augusto D. E., Arias A. P. y Hernández J. O. (2011). Treatment of pressure ulcers with autologous bone marrow nuclear cells in patients with spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 34(3), 301-307. <https://doi.org/10.1179/2045772311Y.0000000010>
- Sepúlveda Saavedra J. (2014). *Texto atlas de histología biología celular y tisular* (2ª Edición). McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid.

- Srivastava R. N., Dwivedi M. K., Bhagat A. K., Raj S., Agarwal R. y Chandra A. (2016). A non-randomised, controlled clinical trial of an innovative device for negative pressure wound therapy of pressure ulcers in traumatic paraplegia patients. *International Wound Journal*, *13*(3), 343-348. <https://doi.org/10.1111/iwj.12309>
- Toh W. S., Lai R. C., Zhang B. y Lim S. K. (2018). MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochemical Society Transactions*, *46*(4), 843-853. <https://doi.org/10.1042/BST20180079>
- Urbán V. S., Kiss J., Kovács J., Gócza E., Vas V., Monostori E. y Uher F. (2008). Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *26*(1), 244-253. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0267>
- Vig K., Chaudhari A., Tripathi S., Dixit S., Sahu R., Pillai S., Dennis V. A. y Singh S. R. (2017). Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040789>
- Wu P., Zhang B., Shi H., Qian H. y Xu W. (2018). MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. *Cytotherapy*, *20*(3), 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.11.002>