

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

TESIS DOCTORAL 2015

HACIA UNA BIOLOGÍA DE LA HERNIA
INCISIONAL. ALTERACIONES CELULARES Y
MOLECULARES EN EL MÚSCULO Y FASCIA
HUMANOS

Memoria presentada por Ramón Díaz Peña para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis doctoral realizada en el Laboratorio de Cirugía General del Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron (VHIR) bajo la dirección de la Dra. Maria Antònia Arbós Via, de la Dra. María Teresa Quiles Pérez y del Prof. Manel Armengol Carrasco

Tesis adscrita al Departament de [Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona](#), en el programa de doctorado en [Bioquímica i Biologia Molecular](#), con la tutoria de la [Dra. Mireia Duñach Masjuan](#)

El doctorando,

Ramón Díaz Peña

Directora de la Tesis
Dra. M^a Antonia Arbós Via

Directora de la Tesis
Dra. M^a Teresa Quiles Pérez

Director de la Tesis
Prof. Manel Armengol Carrasco

Tutora
Dra. Mireia Duñach Masjuan

Barcelona, Diciembre de 2015

Agradecimientos

La curiosidad y el deseo de aprender que de niños todos tenemos, que veo reflejada en mi hija de 3 años, es el motivo por el que uno se dedica a la investigación. Sin esa motivación, sin ese motor interno que nunca para de dar vueltas, nada es posible. Esa fuerza que nos impele a seguir hacia adelante, a pesar de todo, es capaz de cogernos en brazos y llevarnos por encima de las adversidades.

La experiencia vital de la investigación en una tesis nos debería ayudar a formar como profesionales de la ciencia, sin olvidar la parte personal que nos ayudará a caminar por este mundo, y hacernos conscientes que el objetivo final de nuestra investigación debe ser el bienestar de las personas. En este sentido debo agradecer la confianza depositada por parte de mis directores de tesis el Dr. Manel Armengol, la Dra. Maria Antònia Arbós y la Dra. Maria Teresa Quiles, en la investigación de una patología de complejo abordaje. En la faceta profesional, cabe recalcar el rigor científico que he adquirido al trabajar en nuestro grupo. Respecto al aspecto personal, gracias, sobre todo, por ser próximos y comprensivos cuando fue necesario, y hacer posible esta tesis.

Si antes he hablado de ese motor interno que nos hace avanzar, ese motor interno necesita de combustible. Ese combustible es el cariño y ánimo de las personas que uno se va encontrando por la vida. Agradecer a todos los amigos que han compartido este camino y que a veces ha sufrido mis inquietudes. Todos ellos han colaborado en esta tesis en mayor o medida, a veces simplemente escuchando y sobre todo riendo. Por supuesto, la familia ha sido esa gran base que permite construirlo todo. Sin ese gran esfuerzo de mis padres, que nunca podré de dejar de agradecerles, y que siendo padre ahora se valora en su justa medida, no podría haber llegado hasta aquí (va por ti Mama). Finalmente, gracias a Gloria mi compañera en la vida, y mi mejor amiga, que durante estos años siempre ha estado a mi lado animándome, y a mi hija Mar y a mi sobrina Paula, que siempre te hacen poner los pies sobre el suelo y valorar lo bueno de la vida. *Us estimo molt, sou el sol de la meva vida.*

Albert Einstein

“La imaginación es más importante que el conocimiento”

Índice

Abreviaturas	7
--------------------	---

Resumen	11
----------------------	-----------

1. Introducción	15
------------------------------	-----------

1.1 Hernia incisional

1.1.1 Identificación del problema	17
1.1.2 Definición y clasificación	18
1.1.3 Aspectos demográficos y socioeconómicos	21
1.1.4 La hernia incisional como modelo y sujeto de estudio	
1.1.4.1 Breve recordatorio histórico	23
1.1.4.2 Evidencias actuales	24

1.2 La pared abdominal y la reparación de la hernia incisional

1.2.1 Pared Abdominal: Estructura y función	27
1.2.1.1 Fascia y aponeurosis de la pared anterior abdominal	28
1.2.1.1.1 Definición y nuevos conceptos asociados a la fascia	29
1.2.1.1.2 Estructuras músculo-aponeuróticas	30
1.2.1.1.3 Tejido conectivo intramuscular (TCI)	32
1.2.1.1.4 Estructura y características del tejido	33
1.2.1.2 Musculatura de la pared abdominal	34
1.2.1.2.1 Estructura y función	34
1.2.1.2.2 Estructura sarcomérica y proteínas contráctiles	37
1.2.1.2.3 La cadena pesada de miosina	39
1.2.1.2.4 Tipificación de las fibras musculares	40
1.2.1.2.5 Tipos de fibra en el músculo de la pared abdominal	40

1.2.1.2.6	Desarrollo embrionario de las fibras musculares	41
1.2.2	Las incisiones en la pared abdominal y el cierre de la laparotomía media	44
1.3	Etiología de la hernia incisional	47
1.3.1	Factores de riesgo conocidos	49
1.3.1.1	Factores Técnicos	50
1.3.1.2	Susceptibilidades del paciente	53
1.3.1.2.1	Respuesta sistémica del organismo a la cirugía	55
1.3.1.2.2	Patologías-síndromes con similitudes con la hernia incisional	57
1.3.2	Nuevos escenarios: ¿Hacia una nueva biología de la hernia?	62
1.4	Tratamiento actual	64
1.4.1	Manejo de la hernias incisional	65
1.4.2	Evaluación del paciente y preparación pre-operatoria	65
1.4.3	Técnica operatoria y abordajes	66
1.4.4	Prótesis: la evolución durante el siglo XX hacia el biomaterial	67
1.4.4.1	Biomateriales	68
1.4.5	Características de las prótesis y aplicaciones	69
1.4.5.1	Estructura, propiedades y biocompatibilidad	71
1.4.5.2	Complicaciones en el uso de las mallas: infección, adhesión, seroma y dolor	72
1.4.5.3	Recuperación de la resistencia tensil de la pared abdominal después de la cirugía	72
1.4.6	Prevención de la hernia incisional	73
1.5	Biología celular y molecular de la hernia	75
1.5.1	El fibroblasto como factor de riesgo independiente	75
1.5.1.1	Proliferación	77
1.5.1.2	Apoptosis	79
1.5.2	Inflamación y degradación tisular	81
1.5.2.1	La reparación del tejido	81
1.5.2.2	Regeneración del músculo esquelético adulto	86
1.5.2.3	Biología de la MEC en la hernia incisional	87

1.5.3	Mecanotransducción.....	89
1.5.4	Alteraciones en la expresión génica	94
2.	Hipótesis.....	97
3.	Objetivos.....	103
4.	Material y métodos.....	109
4.1	Materiales y métodos. Estudios 5.1 y 5.2	
4.1.1	Toma de biopsias.....	112
4.1.2	Histología e IHQ	
4.1.2.1	Fascia.....	114
4.1.2.2	Músculo.....	115
4.1.3	Ensayos de cultivos de fibroblastos	
4.1.3.1	Obtención de los fibroblastos primarios y cultivo celular.....	116
4.1.3.2	Ensayo de senescencia.....	116
4.1.3.3	Ultra-estructura celular. Microscopía electrónica.....	117
4.1.3.4	Inmunocitoquímica (ICQ).....	117
4.1.3.5	Ensayos de proliferación celular.....	118
4.1.3.6	Ensayos de migración celular.....	119
4.1.3.7	Ensayo de adhesión al sustrato.....	120
4.1.3.8	Inducción de la apoptosis.....	120
4.1.4	Inmunoblotting.....	120
4.1.5	Inmunoprecipitación.....	121
4.1.6	Electroforesis de las isoformas de las cadenas pesadas de la miosina.....	122
4.1.7	Análisis de la expresión de los proteoglicanos Extracción de RNA y RT-PCR.	
4.1.7.1	Extracción de RNA y RT-PCR.....	123
4.1.7.2	Análisis de la expresión de versicanos mediante inmunoblot.....	123

4.1.8	Análisis estadístico y representación gráfica.....	124
4.2 Materiales y métodos. Estudio 5.3		
4.2.1	Cultivo de fibroblastos del TCI de músculo esquelético en sustratos con rigideces reguladas.....	126
4.2.2	Inmunocitoquímica de los fibroblastos (ICQ).....	128
4.2.3	Ensayo de proliferación celular.....	128
4.2.4	Ensayo de apoptosis.....	129
4.2.5	Análisis de la actividad MMPs de los cultivos.....	129
4.2.6	Análisis estadístico y representación gráfica.....	130
5. Resultados		133
5.1 Estudio 1. Caracterización de la fascia (tejido y fibroblastos primarios) de pacientes afectados de hernia incisional		
5.1.1	Cambios degenerativos en la fascia de los pacientes con HI.....	135
5.1.2	Activación de la Caspasa-3 y fragmentación del citoesqueleto en la fascia de los pacientes con HI.....	138
5.1.3	La fascia de los pacientes con HI muestra una expresión génica de proteoglicanos alterada.....	140
5.1.4	Los fibroblastos de los pacientes con HI muestran un fenotipo patológico diferencial.....	143
5.1.5	El marcador de autofagia LC3 incrementa su expresión en los pacientes con HI.....	148
5.1.6	Los fibroblastos de HI muestran mayor sensibilidad a estímulos apoptóticos.....	152
5.2 Estudio 2. Propiedades del músculo y los fibroblastos del TCI en pacientes afectados por hernia la incisional		155
5.2.1	Cambios degenerativos en el músculo de los pacientes afectados de HI.....	156
5.2.2	Las muestras de pacientes con HI muestran cambios en la expresión de isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC)	160
5.2.3	El componente inflamatorio se encuentra incrementado en las muestras de pacientes con HI de forma localizada y leve	160
5.2.4	Activación de posibles mecanismos apoptóticos en las vías apoptóticas en las muestras de pacientes con HI	161
5.2.5	El músculo esquelético de los pacientes con HI muestra una expresión génica de proteoglicanos alterada	164
5.2.6	Los fibroblastos del TCI de los pacientes con HI muestran un fenotipo patológico diferencial.....	167
5.2.6.1	Principales características de los FHIs del TCI del músculo esquelético observadas in vitro...	167

5.2.6.2	Los fibroblastos del TCI de músculo esquelético de pacientes con HI muestran una fosforilación incrementada de la vimentina	173
5.2.7	Los fibroblastos del TCI del músculo esquelético de pacientes con HI muestran mayor sensibilidad a estímulos apoptóticos	174
5.3	Estudio 3. Modulación del fenotipo de fibroblastos del TCI del músculo esquelético mediante la rigidez del sustrato	178
5.3.1	La rigidez del sustrato modula el fenotipo de los fibroblastos del TCI	179
5.3.2	La proliferación de los IHFs del TCI es menos sensible a los cambios en la rigidez del sustrato	184
5.3.3	Los FHIs son más susceptibles a la apoptosis en presencia de sustratos de baja rigidez (2 kPa)	185
5.3.4	Los medios condicionados de los FHIs presentan una actividad MMP 2, -9 diferencial respecto a los no-FHIs	189
6. Discusión		193
CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE FASCIA ABDOMINAL DE PACIENTES CON HI Y CONTROL		
6.1	Alteraciones degenerativas en la fascia de los pacientes con HI	197
6.1.1	Los proteoglicanos como posibles nuevos candidatos a biomarcadores para la HI	197
6.1.2	El estado degenerativo de la fascia podría estar asociado a mecanismos activos implicados en la muerte celular por apoptosis	199
6.1.3	La autofagia como posible co-inductor de la muerte celular en la fascia de pacientes con HI	201
6.1.4	El fibroblasto HI como posible inductor de la degeneración de la fascia HI	202
CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE PACIENTES CON HI Y CONTROL		
6.2	El estado del músculo de la pared abdominal de los pacientes con HI favorecería el desarrollo de la HI: posible papel del componente inflamatorio	204
6.2.1	El debilitamiento del músculo podría ser debido a la conmutación detectada en los tipos de fibras musculares	206
6.2.2	Los proteoglicanos en el músculo esquelético también se muestran como posibles nuevos candidatos a ser marcadores biológicos en la HI	207
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LOS FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE HI EN RESPUESTA A SUSTRATOS DE DIFERENTE RIGIDEZ		
6.3	Estudio de los fibroblastos en presencia de sustratos rígidos. Los FHIs presentan un fenotipo característico y diferencial <i>in vitro</i>	210
6.3.1	Los FHIs son más lábiles a estímulos pro-apoptóticos: posible mediación de la autofagia y de los mecanismos de adhesión a través de las adhesiones focales	211

6.3.2	La proliferación de los FHIs es superior con una menor adhesión en sustratos rígidos.....	213
6.4 Estudio de los fibroblastos en sustratos blandos (PDMS) in vitro		
6.4.1	La rigidez del sustrato modifica el fenotipo de los fibroblastos del TCI de forma diferencial en los FHIs	215
6.4.2	Los FHIs no incrementan la proliferación con el aumento de la rigidez.....	216
6.4.3	Los FHIs son más lábiles a la apoptosis en sustratos de baja rigidez.....	217
6.4.4	La actividad MMP 2 y -9 es regulada por la rigidez del sustrato de forma diferencial en los FHIs.....	218
7. Conclusiones		223
8. Bibliografía		231
9. Anexos		
	Artículos publicados, comunicaciones en congresos y becas relacionadas con este trabajo.....	259

Abreviaturas

α-SMA	α Actina de musculo liso (<i>α smooth muscle actin</i>)
ACH	<i>Corticotropin releasing hormone</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CDKn	<i>Ciclyn-dependent kinase</i>
CRP	Proteína C reactiva
CSA	Área de sección o <i>cross sectional area</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DPA	Defectos importantes de la pared del abdomen
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK (n)	<i>Extracellular signal-activated kinase (n)</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FGF(n)	<i>Fibroblast growth factor</i>
FHIs	Fibroblastos de hernia incisional
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
GLP	<i>Glucagon like peptide</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HI (IH)	Hernia incisional (<i>incisional hernia</i>)
IGFI/II	<i>Insulin like-growth factor I/II</i>
IL (n)	<i>Interleukin (n)</i>
IL1β-ra	<i>Interleukin1 β receptor-antagonist</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICQ	Inmunocitoquímica
IHQ	Inmunohistoquímica
IFNγ	<i>Interferon γ</i>
IS	Índice de severidad
JNK	<i>Jun n-terminal kinase</i>
LDH	<i>Lactato deshidrogenasa</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
LPS	<i>Lipopolisacaridos</i>
MAC	<i>Membrane attack complex-1</i>
MIC 1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>
MEC	Matriz extracelular
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MMPs	Metalo proteasas de matriz (<i>Matrix metalloproteinases</i>)
MRFs	<i>Myogenic regulatory factors</i>
MyHC	Cadena pesada de la miosina (<i>Myosin heavy chain</i>)
MyLC	Cadena ligera de la miosina (<i>Myosin light chain</i>)
NFκB	<i>Necrosis factor kappa-β</i>
NO	Óxido nítrico
UPA	<i>Urokinase plasminogen activators</i>
PAI-1/-2	<i>Plasminogen activator inhibitor-12</i>

PAs	<i>Plasminogen activator</i>
PDGF	<i>Plateled derived growth factor</i>
PDMS	<i>Polidimetilsiloxano</i>
PGs	<i>Proteoglicanos</i>
PIK3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMN	<i>Linfocitos polimorfonucleares</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
Scx	<i>Scleraxis</i>
SCR	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
sTNFr	<i>soluble Tumor necrosis factor receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TGFα/β	<i>Transforming growth factor α/β</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
uPA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VGEF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Resumen

La CIRUGÍA DE LA PARED ABDOMINAL representa un volumen muy amplio de la práctica diaria de los servicios de Cirugía General. Engloba el tratamiento quirúrgico de la hernia, las eventraciones (y recidivas) y otros defectos importantes de la pared del abdomen (DPA). Actualmente, es un foco de interés relevante en ámbitos académicos y científico-tecnológicos, lo que ha permitido desarrollar nuevas técnicas de abordaje quirúrgico, el diseño y la modificación de nuevos materiales protésicos y aditamentos para su fijación, y la creación de nuevas unidades clínico-quirúrgicas especializadas.

Desde hace unos años el Grupo de Investigación en Cirugía General del VHIR (GRCG-VHIR) dirige una parte de sus esfuerzos al estudio de la HERNIA INCISIONAL (HI). La HI es una complicación potencialmente grave y de elevada incidencia de las laparotomías. Se caracteriza por la pérdida de estructura y de función miofasciales y la eventual ruptura del tejido. De progresión lenta, conlleva una morbilidad importante y su reparación (que es quirúrgica y emplea biomateriales) es un desafío. Aunque se han identificado diversos factores de riesgo (dependientes de la técnica o del paciente), la etiología fundamental de la HI es desconocida. Por el momento, no hay modelos experimentales apropiados con los que estudiar los mecanismos iniciales de la enfermedad y así extrapolar hallazgos preclínicos. Dada la carga actual de la enfermedad, y dado el beneficio potencial que se podría derivar de una mejora en su prevención, diagnóstico y tratamiento, tiene sentido desarrollar estudios descriptivos con los que poder generar nuevas hipótesis de enfermedad y así evolucionar hacia nueva medicina de precisión más basada en la evidencia.

Desde esta perspectiva, y en continuidad con trabajos previos desarrollados en el GRCG-VHIR que indicaban una desregulación de la homeostasis tisular y posibles alteraciones en la expresión génica de fibroblastos en pacientes con HI, en este proyecto de Tesis Doctoral nos hemos querido centrar en el estudio del nicho conectivo local y hemos comparado muestras humanas peroperatorias derivadas de tejidos de la pared abdominal (fascia y músculo esquelético) de pacientes con historia de HI y pacientes control. El objetivo primordial del trabajo es avanzar en la comprensión de los mecanismos efectores (celulares y moleculares) implicados, y así poder contribuir a reducir el rango de variables candidatas asociadas al desarrollo y/o la predicción de la HI. Planteamos una investigación de tipo clínico orientada al paciente (tipo de estudio observacional controlado del tipo casos y controles, con aspectos experimentales). De manera específica nos hemos centrado en tres ejes principales: 1.- Caracterización tisular, 2.- Caracterización de fibroblastos primarios in vitro; y, 3.- Evaluación de la respuesta fenotípica y funcional de dichos fibroblastos en sustratos de cultivo con propiedades mecánicas (rigidez/elasticidad) reguladas, con la intención de modelar in vitro las condiciones mecánicas del tejido humano afectado. Entre los principales hallazgos obtenidos queremos destacar lo siguiente:

Bajo un primer objetivo de caracterización tisular, demostramos alteraciones al nivel de la matriz extracelular (MEC) local (específicas de tejido), que en última instancia podrían ser las responsables de la

pérdida tisular y de la eventual ruptura. Destaca la presencia de señales diversas de muerte celular en los tejidos de pacientes con HI, que probablemente podrían provocar la destrucción progresiva de los fibroblastos locales. La observación de índices de TUNEL aumentados, asociados a un aumento de caspasa-3 activada (así como de su firma de procesamiento), es compatible con la inducción de apoptosis. Los niveles elevados de LC3-II asociado a membranas y un aumento de la relación LC3-II/LC3-I, sugieren la activación de procesos de autofagia. Por otra parte, las muestras de HI contienen niveles aumentados de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) sin un aumento paralelo de Ki-67⁺, lo que hace pensar en la activación de mecanismos de reparación del ADN sin compensación eficaz al nivel de la proliferación celular. Los factores de iniciación y los mecanismos moleculares que provocan esta muerte celular son especulativos, pero destacan la presencia de cambios cuantitativos (degradación continua y formación defectuosa de proteínas sintetizadas *de novo*), y cualitativos (i.e., cambios en la composición de glicosaminoglicanos (GAGs), que podrían estimular una señalización pro-inflamatoria prolongada o actividades de degradación alteradas) en la MEC de la HI. Ambos pueden favorecer la liberación de productos que desencadenen la activación de las caspasas al nivel local. También, la pérdida de contacto del citoesqueleto interno con la MEC puede favorecer la muerte celular. La fragmentación observada de los componentes del citoesqueleto informa de un proceso dinámico de disrupción celular que puede debilitar la función de los fibroblastos, y provocar atrofia tisular. Destaca la elevada proteólisis de la vimentina junto a unos niveles altos de vimentina soluble y fosforilada (índices de su desensamblaje) en la HI (la vimentina es el principal filamento intermedio de los fibroblastos, y actúa como andamio para organelas y un número ingente de moléculas de señalización, pudiendo modular la respuesta específica de señales pro-apoptóticas). Finalmente, al nivel del músculo esquelético se observan también, y entre otras alteraciones, cambios en la composición de las fibras musculares.

Bajo un segundo objetivo hemos caracterizado fibroblastos primarios *in vitro*, identificando un funcionamiento alterado en los derivados de HI (HIFs). Demostramos que los HIFs adquieren *in vivo* un fenotipo diferencial que se mantiene en cultivo a lo largo de diferentes pases, y que afecta a procesos celulares fundamentales. Destaca la reducción del tamaño celular, el aumento de las tasas de proliferación y migración celular, la disminución de la fuerza de adhesión, paralelos a una red citoesquelética alterada, una disminución de fibras de estrés -SMA⁺, y la presencia de contactos focales pequeños. Los HIFs muestran una sensibilidad incrementada a estímulos proapoptóticos, cambios ultra-estructurales, y otras características compatibles con procesos autofágicos y lisosomales comprometidos. Estos cambios pueden ser debidos a una desorganización del citoesqueleto celular que induciría la fragilidad celular, y a otros factores del propio microentorno tisular (activación extrema de enzimas de degradación -MMPs- o alteraciones de la MEC).

La autofagia es un aspecto nuevo en la HI, y puede contribuir a la muerte celular o bien representar una ventaja para la supervivencia celular durante la pérdida de contacto con la MEC. La susceptibilidad aumentada a los estímulos apoptóticos (consistente con los hallazgos encontrados al nivel tisular *ex vivo*, lo que sugiere que puede ser un fenómeno relevante *in vivo*) puede ser indicativa de un daño inicial al ADN superior en la HI respecto al control, o bien a alteraciones en su capacidad de reparación o de hacer frente mecanismos lesivos.

Una parte de estos experimentos (centrados en la fascia) que forman parte de esta Tesis Doctoral, ha sido ya publicada, siendo los primeros en demostrar este tipo de alteraciones en pacientes con HI [PMID: 21641387, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.044, artículo en portada].

Finalmente, sobre la base de este progreso y para obtener una imagen más completa de estos eventos, sabiendo que la patología local puede generar también cambios en las tensiones mecánicas de los tejidos, bajo un tercer objetivo y utilizando sustratos de propiedades mecánicas reguladas, hemos podido demostrar que cambios en la rigidez del sustrato son suficientes para provocar alteraciones fenotípicas y funcionales en los fibroblastos primarios estudiados. La respuesta difiere entre fibroblastos primarios derivados de pacientes con HI y fibroblastos derivados de pacientes control. Estos resultados confirman que la modulación de la rigidez del sustrato permite una aproximación *in vitro* al estudio de determinados aspectos de la fisiología de fibroblasto en respuesta a cambios de rigidez del tejido conectivo (i.e., presentes en la HI).

En conclusión, nuestros datos aportan evidencias indirectas pero convincentes de que el microentorno de la MEC local puede influenciar el desarrollo de la HI, actuando de una manera específica para cada tejido. La atrofia y la dismorfología pueden ser un agente activo, al mediar señales de transducción que afecten la supervivencia celular, el fenotipo funcional y (probablemente) la expresión génica. También identifican a los fibroblastos y la fragilidad celular como agentes activos en la HI. El daño a los fibroblastos puede ocasionar la muerte celular patológica en forma de apoptosis (a través de caspasas) o autofagia (a través de enzimas lisosomales), que provoca la auto-digestión celular (o catástrofe mitótica?). El cúmulo de fibroblastos proclives a la muerte celular dificulta el mantenimiento de la estructura y función normales del tejido y aumenta la destrucción tisular en contextos de baja proliferación celular. A nuestro parecer, estos hallazgos pueden ser relevantes ya que ayudan a identificar nuevos actores en el proceso HI, tal y como sucederían *in vivo*, y aportan información para poder definir nuevas dianas que podrían ayudar a diferentes niveles, como: a.- una (nueva) mejor identificación y estratificación de pacientes, basada en el estudio detallado de las correlaciones entre las averiguaciones biológicas-moleculares con las tipologías clínicas y patológicas observadas; b.- mejorar los resultados clínicos actuales incidiendo en el diagnóstico precoz, la prevención y el tratamiento; y también c.- contribuir a adaptar el diseño de biomateriales para mejorar el rendimiento clínico, basándose en la investigación translacional y la innovación, para que coincidan con los tipos de tejidos y estados de enfermedad específicos (el microentorno complejo y dinámico descrito puede alterar las propiedades del material implantado afectando su desempeño *in vivo* siendo crucial, por lo tanto, optimizar los futuros materiales considerando las condiciones de implantación).

1 Introducción

1.1 Hernia incisional

1.1.1 Identificación del problema

Un 10-20% de incisiones quirúrgicas de la pared abdominal progresan hacia una hernia incisional cuya reparación fracasa en un 24-58% de casos. El número de laparotomías es muy elevado, por lo que su prevalencia es muy alta, siendo la complicación más frecuente de la cirugía abdominal convencional y por laparoscopia (en algunas situaciones, como la cirugía urgente o por determinados tipos de tumor, la incidencia puede llegar hasta un 40%). Aunque puede aparecer de manera precoz -las vísceras sobresalen por una herida abierta precisando cirugía de urgencias-, más frecuentemente los pacientes son portadores silentes durante un largo tiempo hasta que el defecto aumenta de tamaño, causando complicaciones e incapacidad.

La etiología fundamental de la HI no se conoce. Hasta hoy, los factores de riesgo identificados se dividen en tres grandes grupos: 1.- Condiciones asociadas a una cicatrización alterada, presentes antes la intervención y no enmendables por la misma (i.e., edad, diabetes, tabaquismo, laparotomías múltiples, infección de la herida, etc.); 2.- Condiciones con una elevada presión intrabdominal (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, ascitis, obesidad, íleo paralítico, etc.); y 3.- Condiciones asociadas a la técnica quirúrgica y el cuidado peroperatorio (tipo de incisión y sutura, estructuras anatómicas seccionadas, prevención de infección, etc.). Se ignora la importancia relativa de cada uno de ellos, pero parece que el desarrollo precoz está más relacionado con causas peroperatorias y el tardío con factores dependientes del paciente.

El método de elección para su reparación es el cierre sin tensión y el refuerzo de la pared con biomateriales protésicos. Aun así, diversos estudios epidemiológicos observan altas tasas de recurrencia (1-5). En un estudio poblacional (único en lo que respecta a los resultados de la reparación quirúrgica de una HI) (6), después de analizar 10 822 pacientes, la incidencia acumulada de recidiva con y sin prótesis mostraba un aumento lineal a lo largo de los años similar para los dos procedimientos. Este estudio sugiere que la prótesis solo puede aspirar a retrasar durante años la aparición de una recidiva, ya que esta probablemente no depende únicamente de la colocación de un material en la pared abdominal, sino de un complejo trastorno biológico. Sería solo un tratamiento paliativo de una compleja enfermedad. Independientemente, el debate de si se ha de colocar o no una malla en la reparación de una HI probablemente esté obsoleto. La superioridad de esta técnica para aumentar las propiedades viscoelásticas de la pared abdominal y reducir costes y recidivas, ha sido confirmada en varios ensayos clínicos (no) controlados y aleatorizados, y en la actualidad parece que está absolutamente reconocida la necesidad de colocar una prótesis cuando se repara una HI (7). En cualquier caso, e sobre la base de este potencial trastorno biológico, apenas descrito en la actualidad, que intentamos basar la investigación que ahora presentamos.

1.1.2 Definición y clasificación

Las hernias de la pared abdominal se definen como la protrusión subcutánea intermitente o continua de los órganos abdominales a nivel de una zona debilitada de la pared abdominal debida a un defecto (8). Suelen dividirse en dos grupos: a.- Primarias, cuando no existe una causa evidente de producción; y b.- Secundarias o Incisionales, cuando aparecen posteriormente a una incisión de pared abdominal (normalmente tras una laparotomía media, en la que se realiza una incisión longitudinal en la línea media o alba; Figura 1). Este proceso que puede tardar meses o años en aparecer después de la intervención quirúrgica, suele darse en pacientes sin antecedentes familiares o de alteraciones conocidas en la cicatrización (9).

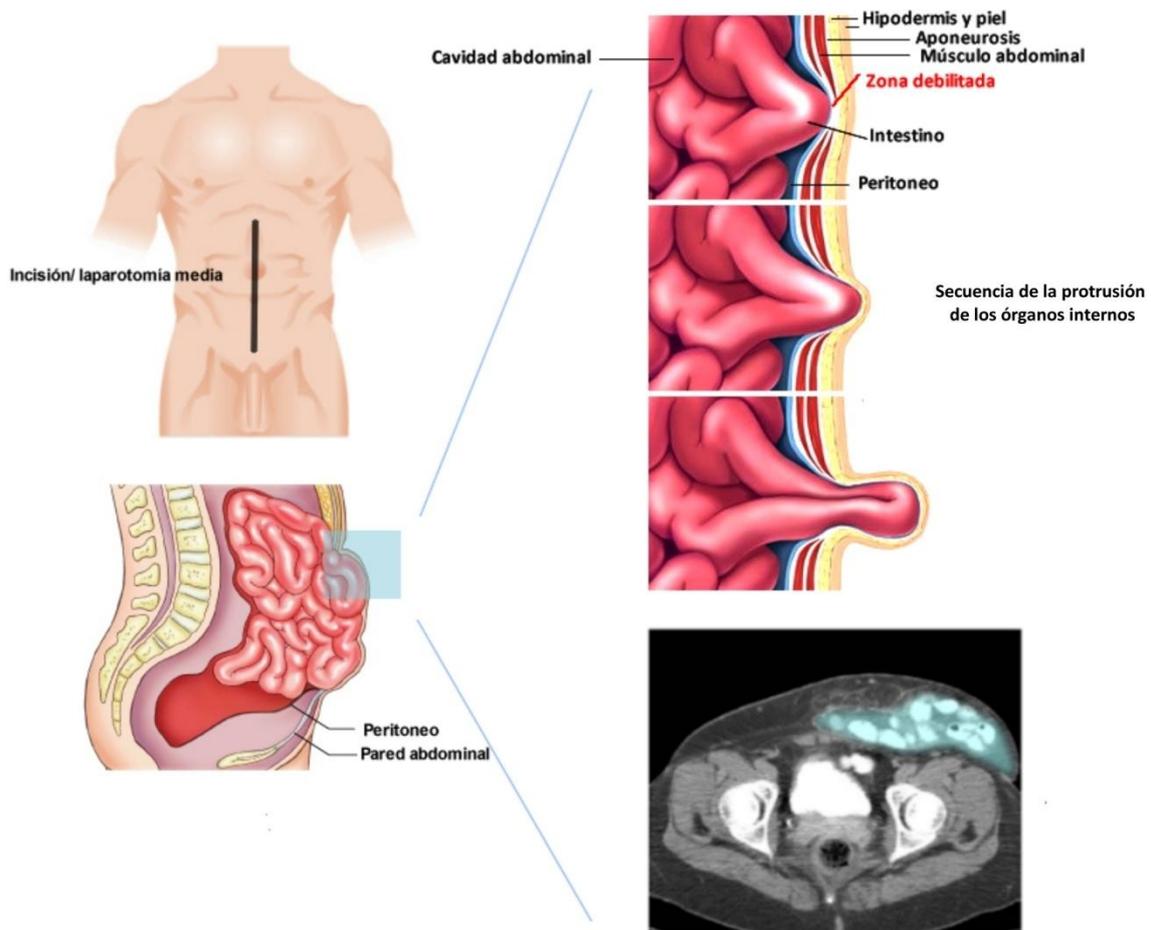


Figura 1. Desencadenamiento de la hernia incisional. Posteriormente a la incisión quirúrgica en la pared abdominal se genera la hernia incisional a) protusionándose los órganos internos b). c): tomografía computarizada axial del abdomen observándose la evisceración (resaltada en azul). d) Aspecto externo de una hernia incisional. Adaptado de <http://www.indiasurgerytour.com>, <http://www.mografi.com/anatomyinmotion>, Goodman P. and Raval B. (AJR. 1990; June 154:1207-1211) y Schumpelick, V; Junge, K; Klinge, U y Conze, J (Dtsch Arztebl 2006; 103(39): A 2553-8, respectivamente.

d)



La *Sociedad Europea de la Hernia* (European Hernia Society, EHS), en el congreso realizado en Gante (Bélgica, octubre 2008) decidió adoptar la definición propuesta previamente por Korenkov et al., según la cual una hernia incisional es: *“cualquier discontinuidad de la pared abdominal con o sin una protuberancia en la zona de la cicatriz postoperatoria perceptible o palpable mediante el examen clínico o técnicas de imagen”* (10). Entre los factores de riesgo que propician la aparición de la HI destacan la edad (> 45 años), el sexo masculino (11; 12; 13), una actividad laboral que requiera un esfuerzo físico importante y continuo (14; 15), entre muchos otros. El diagnóstico es eminentemente clínico y por exploración, si bien en algunos casos se precisa de técnicas de imagen (ecografía o tomografía axial computarizada) confirmatorias.

La pérdida de la dinámica normal de la pared abdominal por una solución de la continuidad de ésta da origen a un desequilibrio en la contracción muscular que hace que cualquier HI tenga un aumento progresivo con el tiempo (7). En términos físicos, se altera el equilibrio contrapuesto entre la presión intrabdominal y la pared del abdomen facilitando la protrusión de órganos internos o vísceras (el incremento de la presión intrabdominal excede la contrapresión de la pared abdominal; Figura 1). De acuerdo con el principio de Pascal, sabemos que cualquier cambio aplicado a un fluido en un recipiente cerrado es transmitido sin modificaciones a todo el fluido y a las paredes que lo contienen (i.e., las presiones intra-abdominales se reparten con igual intensidad en todas las direcciones y puntos). Cualquier fuerza que se ejerza en la cavidad abdominal (i.e., saltar, mantener la posición vertical o toser) afectará a la pared en reparación, debilitada por la incisión quirúrgica.

La acción de la presión intrabdominal sobre la pared debilitada se aprecia mejor según la Ley de Laplace, según la cual la tensión a que es sometida la pared (abdominal) es directamente proporcional al radio de la cavidad abdominal e inversamente proporcional al grosor de la pared: $[T = P \cdot R / 2 \cdot W]$, donde T es la tensión de la pared, P es la presión de la cámara o cavidad abdominal, R es el radio de la cavidad abdominal y W es el grosor de la pared abdominal. Por tanto, la tensión a la que es sometida una zona de la pared abdominal se incrementa (para la misma presión) con el incremento del radio de la cavidad abdominal (protrusión de las vísceras) y, sobre todo, con la disminución del grosor de la pared (pared abdominal debilitada). Así es fácil ver como progresa la hernia en términos físicos. Una vez declarada, la HI progresa en magnitud con el área afectada y de forma lateral respecto a la incisión quirúrgica (16).

Debido a la disparidad encontrada en los criterios de inclusión y de exclusión de pacientes así como en las variables escogidas en los diferentes estudios publicados y presentados en congresos, con el tiempo ha surgido la necesidad imperiosa de establecer una clasificación de las hernias de la pared abdominal que sea simple, reproducible y aceptada internacionalmente, para así poder así poder asegurar que tanto las poblaciones examinadas como los tratamientos aplicados y los resultados obtenidos en los diferentes trabajos presentados son realmente comparables entre sí (10) (17). A su vez, dada la gran diversidad y heterogeneidad de las HIs, la disponibilidad de una clasificación de este tipo podría ayudar a facilitar la recolección de datos y también de resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas quirúrgicas empleadas; a generar registros y a obtener nuevas evidencias científicas; o a desarrollar guías terapéuticas basadas en dicha clasificación, redundando en

la calidad de los resultados presentados en el campo de la HI y en su (futura) aplicabilidad como variables o indicadores para la toma de decisiones cada más apropiadas en los contextos clínicos y socioeconómicos.

La clasificación vigente está basada también en el consenso obtenido en 2008 por la EHS (10), según el cual se acordó dejar de lado las consideraciones sobre factores de riesgo, tratamiento y resultados, se excluyeron las hernias paraestomales, y se optó por una clasificación sencilla, centrada en la localización y el tamaño del defecto herniario (longitud y amplitud), la presencia o no de reparaciones de hernias abdominales previas en la que no se pretendía buscar un uso directo terapéutico. Esta clasificación separa las hernias abdominales primarias o ventrales, de las secundarias o incisionales y recurrentes (para las que establece una división en subgrupos) por su diferente etiología. Así pues, las HIs quedan clasificadas en función de su: a.- localización; b.- tamaño del defecto herniario; y, c.- presencia de reparaciones de hernias abdominales previas (Tabla 1).

Tabla 1 Clasificación para la hernia incisional de la pared abdominal de la EHS (entre paréntesis el código asignado para cada tipo de hernia incisional)

Localización de la hernia

Línea media

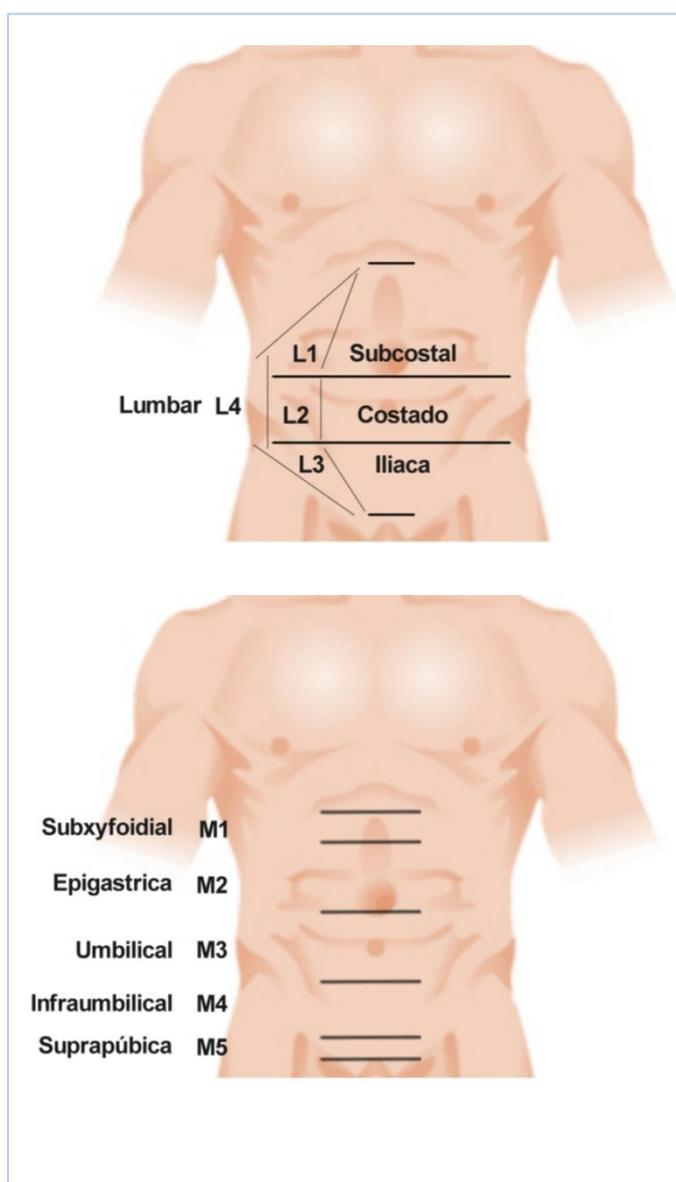
subxifoidal (M1)	3cm por debajo del xifoides caudalmente
epigástrica (M2)	Desde 3cm por debajo del xifoides hasta 3cm por encima del ombligo
umbilical (M3)	3cm por debajo y encima del ombligo
infraumbilical (M4)	Desde 3cm por debajo del ombligo hasta 3cm por encima del pubis
suprapúbica (M5)	Desde el hueso púbico hasta 3cm cranealmente

Dimensiones del defecto

Longitud	Toma de la medida	
Amplitud	pequeñas (W1)	< 4cm
	medianas (W2)	4-10 cm ≥
	grandes (W3)	10 cm ≥

Presencia o no de recurrencia en la hernia

No se considera el número de recidivas



1.1.3 Aspectos demográficos y socioeconómicos

En la actualidad no hay registros centralizados que permitan conocer la incidencia real en nuestro medio de HI, ni de las diferentes técnicas aplicadas, ni de los implantes utilizados para su tratamiento quirúrgico, y en consecuencia, tampoco de los resultados a corto, medio o largo plazo. Por este motivo recientemente se ha empezado a crear un registro español de eventraciones (EVEREG, http://www.evereg.es/evereg_inicio.php; fecha de consulta 20/11/2015). EVEREG cuenta con la supervisión de la Asociación Española de Cirujanos (www.aec.es), está coordinado por la Sección de Pared Abdominal y Suturas (http://www.aecirujanos.es/secciones/paredabdominal_cursos.php), y cuenta con el patrocinio de la empresa privada. Su objetivo principal es disponer de un registro de todas las intervenciones por HI practicadas en España. Los objetivos secundarios son: analizar los resultados de la cirugía por HI/eventración; conocer la tasa de complicaciones mayores y menores asociadas a esta intervención; determinar la tasa de recidiva; y evaluar a corto y largo plazo la efectividad de las diferentes técnicas quirúrgicas empleadas para el tratamiento de la HI simple y compleja. La duración del registro se prevé indefinida siendo los pacientes recogidos de manera prospectiva y anónima (sólo el responsable de cada centro puede identificar los pacientes que deben firmar un consentimiento específico aceptando su participación).

De forma aproximada, en la Figura 2 se puede observar la distribución por edades de las altas hospitalarias (datos absolutos) debidas a hernias abdominales (primarias y incisionales, y que incluye el sector privado) en el Estado Español (Instituto Nacional de Estadística (INS), Encuesta de Morbilidad Hospitalaria 2008). La incidencia es superior en varones, aunque en edades avanzadas el número absoluto de altas es superior en mujeres debido a su mayor esperanza de vida, si bien de forma relativa el número de altas es menor.

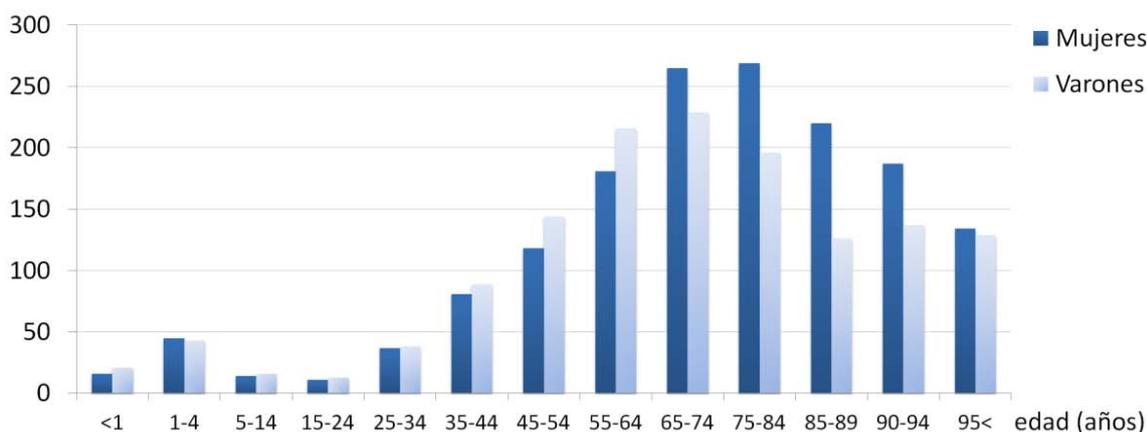


Figura 2. Altas hospitalarias por 100.000 habitantes debidas a hernias abdominales en 2008 (primarias y incisionales).

Diferentes autores coinciden que la conducta a seguir con los pacientes portadores de hernias grandes no consiste solo en enfrentar un defecto simple de la pared abdominal, sino que deben considerarse como enfermos crónicos con un componente sistémico que provoca un problema socioeconómico, tanto para ellos y sus familiares, como para las instituciones de salud (18). En este sentido, merece la pena mencionar que el conjunto de procesos incluidos como hernia de la pared abdominal representan el volumen principal de intervenciones realizadas en los Servicios de Cirugía General y Digestiva, representando hasta un ~46% de intervenciones en los hospitales de nivel I; un ~40% en los hospitales de nivel II; y un ~36% en los de nivel III. Según la misma encuesta del INS, en 2008 se realizaron 155 altas hospitalarias por hernia inguinal y 103 por hernias abdominales primarias e incisionales por 100.000 habitantes. Teniendo en cuenta que en nuestro país el costo de una hernioplastia oscila entre los 3500-7500 € (incluyendo gastos directos e indirectos, y según las técnicas aplicadas) (19), fácilmente nos podemos dar cuenta del coste socioeconómico implicado.

En general, en todos los países de Europa, los sistemas sanitarios se enfrentan a mayores presiones debido al aumento de la demanda y de los costes. La respuesta de las distintas Administraciones fue primero, imponer centralizadamente límites al gasto, y después, introducir cambios radicales para conseguir un sistema autoregulado que refleje un equilibrio adecuado entre el nivel y la calidad del servicio y los recursos existentes. La tendencia es hacia una forma europea de asistencia sanitaria o medicina gestionada (*managed care*) que incluiría: objetivos nacionales de salud; mejora de la salud de la comunidad; gestión de la enfermedad; asistencia centrada en el paciente, incorporando objetivos de bienestar social y de salud de la comunidad, además de la de las personas individuales.

Aplicado al caso de la reparación de DPA, la asistencia gestionada recomienda la reducción progresiva de la estancia hospitalaria (20-22) (según el INS, 2008, se calcula una estancia media por alta hospitalaria de 2.7 días para las hernias inguinales y de 3.9 días para el resto de hernias abdominales). En este sentido, la cirugía sin ingreso (especialmente útil para la hernioplastia inguinal), porta valor añadido, con resultados excelentes desde el punto de vista de la calidad asistencial y de la satisfacción del paciente, siempre que se realice con la protocolización debida, convirtiéndose en un procedimiento seguro y beneficioso para el paciente y los sistemas sanitarios (23). Finalmente, para una adecuada evaluación económica habría que medir los resultados en QALY (*quality-adjusted life years*), contemplando la calidad de vida (i.e., además de los costes hospitalarios, existen los costes de la baja laboral o incapacidad laboral transitoria que también repercuten en el gasto sanitario global) y su repercusión en el paciente y su entorno familiar (24). En cualquier caso, a pesar de esta reducción de costes, el gasto socio-económico generado por el procedimiento de la hernia de la pared abdominal sigue siendo importante y siguen creciendo debido al crecimiento demográfico (25).

1.1.4 La hernia incisional como modelo y sujeto de estudio

1.1.4.1 Breve recordatorio histórico

Un breve recordatorio histórico puede ayudar a entender por qué el enfoque de la HI ha tenido un carácter eminentemente práctico técnico-quirúrgico que de orientación fundamental hacía una dinámica celular y molecular.

La primera alusión a la patología de la hernia de la pared abdominal se encuentra en el papiro egipcio de Ebers (1560 a.C.). En la Grecia clásica, Hipócrates de Cos (460-375 a.C.) las describe en el Corpus Hippocraticum como «rupturas de la parte inferior del vientre». Las referencias más antiguas a las hernias incisionales datan de la época de Guy de Chauliac (1300-1368) y de su obra *Chirurgia Magna*, dónde se señala que su incidencia oscila entre el 1-16 % de las laparotomías en general. Más tarde, durante el Renacimiento (s. XV-XVIII), se desarrolló la anatomía científica y la cirugía permitiendo a los cirujanos ser realmente eficaces y poder empezar a diferenciarse de sus predecesores, los cirujanos-barberos. Los grandes descubrimientos en el campo de la fisiología y de la física del s. XVII, ofrecieron a los cirujanos y anatomistas de los s. XVIII-XIX una nueva visión del mundo: la creencia en la razón, la cual propiciará una aceleración en la adquisición del conocimiento y el tratamiento quirúrgico de la hernia abdominal, que prosigue durante el s. XIX con el desarrollo interdisciplinario de la cirugía, anatomía e histología.

A finales del s XIX se entró en una segunda gran etapa en el tratamiento de los DPAs, gracias a diversos factores entre los que destacan: 1) la introducción y difusión de la anestesia (1844-1847); 2) la aplicación de la asepsia, la antisepsia, el autoclave, el uso de guantes quirúrgicos (primero de algodón y después de goma, 1890), y el uso de mascarilla y las quirúrgicas (1894); y 3) el paso de la cirugía de exéresis y evacuadora, a una cirugía reparadora y que busca la restauración funcional (1865-1899). Es en esta etapa en que se consiguen superar tres grandes dificultades no resueltas anteriormente: el dolor, la infección y la hemorragia. Los cirujanos empiezan a ser vistos como científicos. Finalmente, durante el s.XX, las dos guerras mundiales aumentaron considerablemente la experiencia quirúrgica en el tratamiento de heridas y DPAs, comenzándose a aplicar material exógeno a modo de prótesis y con función de sostén.

Si un mayor conocimiento de la patología favoreció su tratamiento, también lo hizo el aumento de recursos disponibles (más medios económicos y técnicos, más cirujanos y centros hospitalarios), mejorando considerablemente los resultados obtenidos en su tratamiento. Aunque encontramos ya bibliografía sobre las prótesis sintéticas a finales de los años 50, no es hasta la década de los 80 cuando se inicia su uso generalizado. La aplicación de las prótesis sintéticas hizo cambiar diversos conceptos sobre el éxito de la reparación. De la resección del saco herniario, se pasó a devolverlo a la cavidad abdominal, aplicando la prótesis o malla protésica como barrera, todo ello libre de tensión. Así también, se comenzaron a aplicar los conceptos de la anatomía dinámica que utiliza la fuerza que crea la hernia para empujar y sostener las nuevas prótesis en el proceso de reparación. Todo ello ha conllevado a la disminución de hospitalizaciones prolongadas, de

incapacidades laborales y del índice de recidivas. Por último, la aplicación de la laparoscopia en la hernia en 1987 con la primera colecistectomía a través de este método, ha contribuido a disminuir el dolor postoperatorio, a ser una alternativa importante a las otras opciones en las reproducciones herniarias. Aún así, todas las aproximaciones en la reparación de la hernia se encuentran aún en fase debate y de mejora continua.

1.1.4.2 Evidencias actuales

En general, la mayoría de estudios publicados enfocados a la mejora de las laparotomías y la reparación de la HI se han centrado en la técnica quirúrgica y en las propiedades (mecánicas) de las prótesis de refuerzo y los materiales de sutura. Desafortunadamente, estas aproximaciones exclusivamente quirúrgicas no evitan unos índices de aparición y de recurrencias inaceptablemente elevados.

El probable origen multifactorial de la enfermedad dificulta descifrar qué factor es el más influyente y cuál es su mecanismo de acción, pero parece evidente que el desarrollo de una HI implica una combinación de limitaciones técnicas y tisulares que, coordinadamente, impiden la asimilación de señales biológicas y mecánicas diversas culminando en la aparición de nuevas rutas de señalización alteradas que impiden la cicatrización (precoz) del tejido (desde una perspectiva “biológica” influyen: la infección, isquemia, malnutrición, agentes farmacológicos, etc., y desde la “mecánica”: la pérdida en la resistencia a la tracción, y regulación a la baja en las vías de mecanotransducción activadas en la señalización de la reparación tisular (26).

Curiosamente, la mayoría de casos de dehiscencia de suturas o de formación de HI tienen lugar en pacientes que habían sido considerados candidatos quirúrgicos seguros, sin indicios de defectos en la cicatrización. Evidencias crecientes sugieren que, al menos un subgrupo de pacientes, pueden haber una alteración del tejido conectivo subyacente. En esta línea, existen algunos (pocos) trabajos que demuestran alteraciones en la composición y el metabolismo del tejido conectivo y también cambios puntuales en la respuesta inflamatoria en diferentes tipos de hernia y que dan soporte a esta especulación. Surge entonces la **hipótesis** de una **biología de la hernia**, la cual postula que el deterioro de la integridad de la pared abdominal es debido a alteraciones al nivel de la MEC del tejido conectivo.

Una de las principales funciones de la MEC es aportar integridad estructural pero este microentorno tisular especializado es mucho más que una localización anatómica. La MEC es un circuito dinámico que transmite señales mecánicas y químicas, y que constantemente se acciona para responder al estatus y a los requerimientos del tejido mandando información a las células responsables de su mantenimiento y regeneración (las células captan y detectan cambios en la composición, la porosidad, y la rigidez de la MEC al interactuar con ella a través de las adhesiones focales). Protege al componente celular evitando su depleción y comunica señales para la activación, proliferación y diferenciación celulares en respuesta al tejido dañado. También juega un papel en la localización de moléculas tales como factores de crecimiento y glicoproteínas que inciden en las respuestas celulares.

Poder comprender como diversos factores modulan la capacidad de regeneración del tejido es crítico para poder avanzar mediante una investigación translacional hacia nuevas estrategias de éxito en medicina regenerativa (27). Ello es particularmente evidente en contextos como la HI caracterizados por un elevado recambio (*turnover*) y una regeneración pobre.

En la HI, la búsqueda de alteraciones se ha centrado fundamentalmente en la aponeurosis o fascia de los músculos del abdomen, pensando que por su estructura y función sería la responsable del fracaso último de la pared abdominal. En cambio el papel del músculo esquelético en el desarrollo de la enfermedad y/o en sus recurrencias, ha sido ignorado o, cuando menos, infravalorado. Sin embargo, eventraciones traumáticas por lesión de los nervios ponen de manifiesto su papel estructural y de funcionalidad del abdomen (i.e., participa en la contención de las vísceras de la cavidad abdominal; en los movimientos respiratorios, en el mantenimiento de la postura y estática de la columna, torsión del tronco, etc.), y se sabe que patologías sistémicas pueden afectar la estructura y función musculares. Es probable también que una inflamación crónica, resulte en atrofia y pérdida muscular y una regeneración muscular alterada (i.e., a causa de un circuito amplificador de la expresión de TNF α (28).

El músculo esquelético tiene también una alta capacidad de adaptabilidad y de regeneración, esto lo señala también como una posible diana terapéutica. Hoy se sabe que es un órgano con características endocrinas y paracrinas, con capacidad para regular su entorno más próximo y de forma distal otros órganos. La posible desregulación de esta capacidad moduladora en la HI posiblemente podría afectar de forma directa al tejido conectivo intramuscular (TCI) que se encarga de la transmisión de la tensión realizada por el propio músculo. Asimismo, la MEC del tejido conectivo intramuscular participa de los procesos de regeneración de las fibras musculares, estableciéndose una conexión directa entre la integridad del TCI, del músculo y la fuerza eficiente que ejerce. Además esta desregulación conjunta musculo-TCI podría afectar a la fascia adyacente. De esta forma, el conocimiento de los mecanismos que operan en el músculo-TCI resultaría de significativos en relación a la pérdida de propiedades mecánicas de la pared abdominal.

En nuestra opinión, una mejor comprensión del papel del microentorno tisular de la pared abdominal (al nivel de la fascia y del músculo esquelético) a diferentes niveles de organización (histológico, celular y molecular), debería aportar nuevas direcciones y dianas para un futuro tratamiento de la HI enfocadas a mejorar su prevención, así como a estimular la regeneración muscular y del tejido conectivo en su conjunto. Esta idea recoge el foco de nuestra investigación en la que de manera específica introducimos el papel del fibroblasto local, intentando entender cómo podría activar y/o responder al entorno patológico de la HI. Los fibroblastos residentes son considerados los agentes principales para el mantenimiento estructural y funcional de la MEC del tejido conectivo, de forma que alteraciones diversas en su fenotipo y funcionalidad podrían conducir al desarrollo de la patología. El estudio de las características del fibroblasto y la MEC en la que se encuentran inmersos, permitiría establecer que mecanismos de regulación bidireccionales célula-microentorno actúan deletéreamente sobre el tejido. El conocimiento de estos mecanismos se podría aplicar al diseño de nuevas biomateriales que permitiesen auxiliar al fibroblasto a mantener-recuperar un fenotipo idóneo para la correcta reparación de la pared abdominal.

Los posibles beneficios en la investigación de la HI sobre su prevención y tratamiento no solo abarcarían a ésta, sino que su conocimiento podría ser aplicado a otras patologías. El término fascia engloba actualmente a los tejidos blandos conectivos que permean el cuerpo humano, que pueden ser tanto los laminares en el músculo, como los que recubren las articulaciones y órganos. Esto hace que los mecanismos descritos en la fascia de la pared abdominal en la HI, potencialmente se puedan expandirse a multitud de capas y tejidos conectivos de órganos. Remarcablemente, el modelo de la fascia de la HI ofrece una simplicidad de elementos, básicamente el fibroblasto y la MEC circundante, que permite el estudio relativamente sencillo de la interacción y regulación bidireccional célula-MEC. Más allá de la fascia, en otras situaciones patológicas donde el fibroblasto se ve transformado (i.e inflamaciones crónicas, procesos tumorales), el modelo de la HI ayudaría a comprender los mecanismos que actúan (Figura 3). Conjuntamente con la fascia, los estudios del músculo-TCI serían de ayuda en otros tipos de desordenes musculares. El resultado final de la aplicación del modelo de la hernia incisional en diversas patologías, hace que los beneficios en la salud del paciente en general se multipliquen y que la inversión destinada a la investigación se más eficiente en términos beneficio/coste.

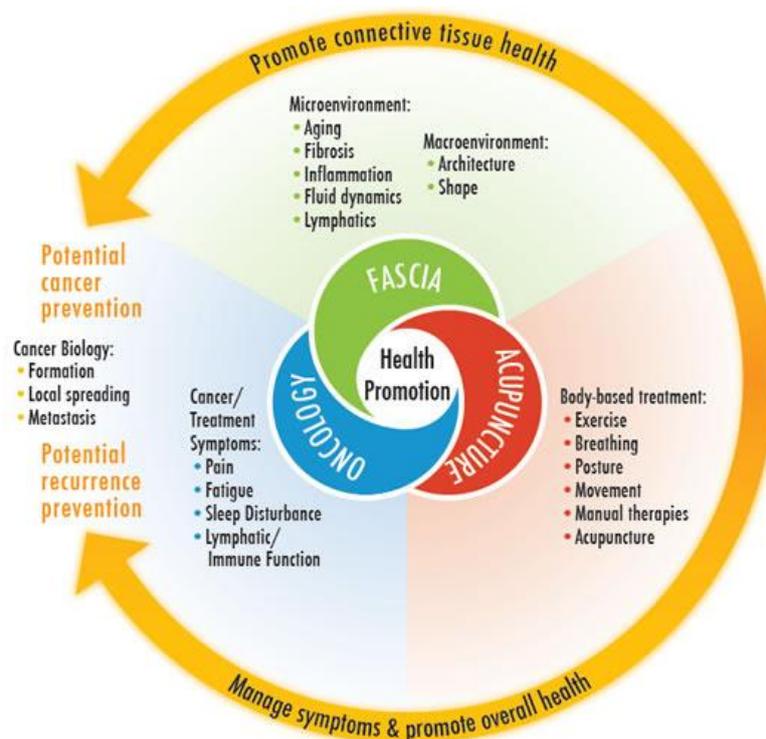


Figura 3 Diagrama del International Fascia Research Congress (FRC) del 2015 en el que se resalta la importancia del tejido conectivo en la biología del cáncer, y el rol de la acupuntura y la promoción de la salud en la prevención del cáncer, en un modelo integrado.

1.2 La pared abdominal y la reparación de la hernia abdominal

1.2.1 Pared abdominal: Estructura y función

La pared anterior abdominal está constituida por seis capas de tejido superpuestas, de las cuales la piel es la capa más externa, seguida de la fascia subcutánea, una serie de músculos planos, la fascia transversal, el tejido pre-peritoneal, y el peritoneo como capa más interna (Figura 4).

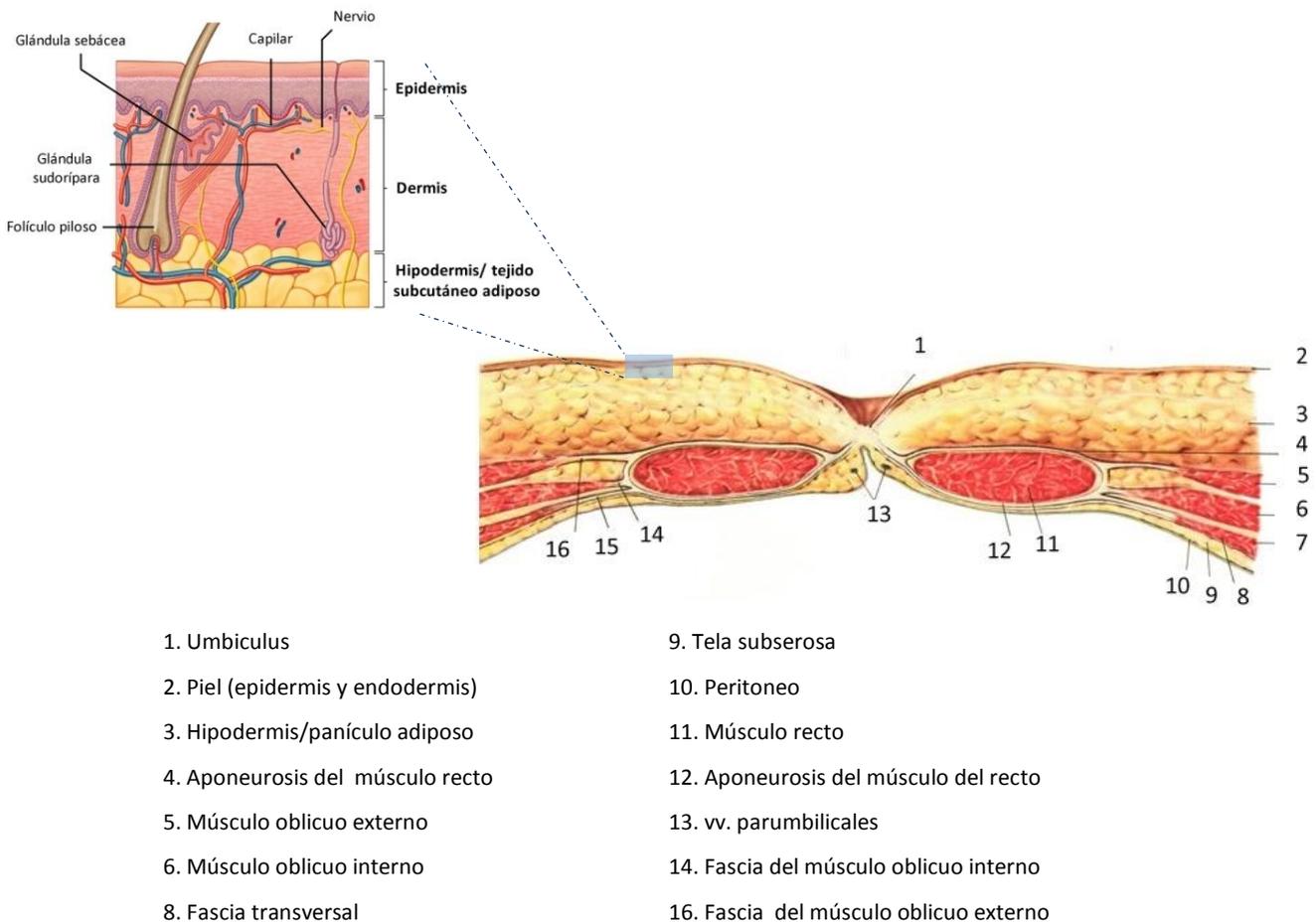


Figura 4. Estructura de la pared abdominal (sección transversal). Adaptado de Robinson JK y Anderson ER (*Skin structure and surgical anatomy: Surgery of the Skin*. 2005; p. 4.) y <http://accesssurgery.com>.

- Piel: Compuesta por dos capas, la epidermis y la dermis. La epidermis, la capa más superficial de la piel, está formada por células endoteliales no vascularizadas. Justo debajo de ésta se sitúa la dermis, la cual funciona como un tejido conectivo que contiene capilares, vasos linfáticos, folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y sus conductos, y fibras musculares lisas. A continuación encontramos la hipodermis, que consiste básicamente en una capa de tejido adiposo.
- Fascia subcutánea superficial: Formada por tejido conjuntivo con una proporción variable de células adiposas con depósitos de lípidos que se distribuyen de forma variable en grosor en la pared abdominal (29-31).
- Músculos abdominales, fascias y aponeurosis: La musculatura abdominal se organiza y estructura a lo largo de la pared abdominal en grupos de músculos: el transversal abdominal, el oblicuo interno, el oblicuo externo, el recto abdominal y el piramidal (de menor importancia y sólo presente en el 80% de la población). Estos grupos de músculos están empaquetados de forma diversa por un tejido conectivo llamado fascia, y se relacionan entre ellos o al esqueleto mediante una variedad de la fascia llamada aponeurosis. Los dos tejidos representan el componente contráctil y constituyen el elemento predominante en la estructura de la pared abdominal. Se encuentran en estrecha asociación, lo cual es esencial para el mantenimiento de la integridad y la función adecuada del músculo. Estos 4 grupos músculos, con las fascias relacionadas, proporcionan la resistencia mecánica, flexibilidad para el movimiento del torso y, al mismo tiempo, el esfuerzo necesario para soportar la presión ejercida por los órganos internos
- Peritoneo: Capa serosa que delimita la pared abdominal y los órganos internos. Facilita el movimiento de los órganos dentro de la cavidad abdominal

Estos tejidos se disponen y relacionan entre sí dando lugar a una configuración histoarquitectónica característica determinada por la función de la pared abdominal: la rotación del tronco y flexión de la columna vertebral, el soporte a la presión intra-abdominal o la espiración forzada.

1.2.1.1 Fascia y aponeurosis de la pared anterior abdominal

El conjunto de músculos que forman parte de la pared anterior abdominal se hallan envueltos por láminas de tejido conectivo o fascias a diferentes niveles, incluyendo el tejido conectivo intramuscular (32), que recubren a cada una de las fibras y de los músculos confiriéndoles unidad estructural y funcional. Por otra parte, como una prolongación de las fascias, la inserción de los músculos de la pared abdominal con el esqueleto, y de los músculos entre sí, se realiza mediante una variante de la fascia llamada aponeurosis que posee una estructura y función similar a los tendones de inserción.

1.2.1.1.1 Definición y nuevos conceptos asociados a la fascia

Tradicionalmente “fascia” ha designado, de forma poco precisa y ambigua, al tejido conectivo poco especializado presente en todo el organismo formando una matriz continua tridimensional y que proporciona soporte estructural envolviendo a todos los órganos y tejidos corporales más especializados. Inicialmente esta definición englobaba a todos los tejidos conectivos fibrosos, incluyendo aponeurosis, ligamentos, tendones y todas las estructuras del tejido conectivo intramuscular (33) Se trata de un tejido al que se le ha atribuido poco más que una función secundaria de soporte, subestimando de este modo su importancia en áreas como la biomecánica o la fisiología. Sin embargo, esta visión ha empezado a cambiar en los últimos años y, a pesar de que sigue siendo una entidad todavía poco precisa, los últimos avances en imagen médica, así como otros sistemas de análisis, aportan nuevos enfoques:

- 1) En su definición más reciente, la fascia es descrita como un tejido blando perteneciente al sistema conectivo que se extiende por todo el organismo, un conjunto de tejidos fibrosos colagenosos que formarían parte de un sistema de transmisión corporal de tensiones (34). Se trata, por tanto, de una red de láminas de tejido conectivo interconectadas por todo el organismo que actuarían como elemento elástico frente a las fuerzas externas en un modelo corporal de “tenseguridad” (*combinación de las fuerzas que existen en una estructura formada por una red finita de elementos de compresión o elementos rígidos interconectados a través de elementos tensiles o elásticos que le dan a la estructura su integridad total*). Conforme a esta definición, la fascia adapta la estructura y densidad de sus fibras a las demandas de tensión locales (Figura 5). De la misma manera, cualquier defecto o disrupción en este sistema, causa que la fascia modifique su estructura y composición. En esta línea, estudios recientes sugieren que determinadas patologías musculares se hallan asociadas a cambios en la estructura de la fascia que envuelve al músculo (35).

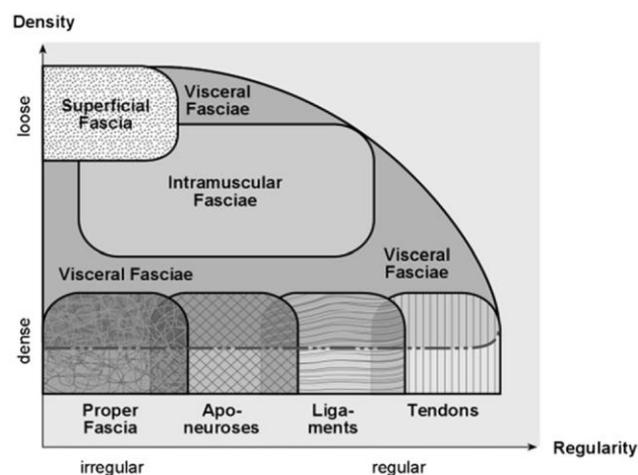


Figura 5. Diferentes tejidos considerados como fasciales en los congresos internacionales de investigación de la fascia. Los tejidos se diferencian en la alineación de las fibras de colágeno y la densidad Schleip, R., Chaitow, L., Findley, T.W., Huijing, P., 2012. *Fascia-The Tensional Network of the Human Body. The Science and Clinical Applications in Manual and Movement Therapy*. Elsevier).

- 2) Se trata realmente de un tejido conectivo continuo, que une e integra diferentes regiones en todo el organismo (34). Proporciona un marco estructural para el crecimiento en la medida en que se desarrolla alrededor de estructuras del organismo, adaptándose continuamente y transmitiendo señales mecánicas y químicas al tejido que se está diferenciando. Actúa, por tanto, como un sistema de mecano-señalización corporal (35), sobre todo si se tiene en cuenta que las células que residen en un tejido vivo responden a las fuerzas mecánicas de su entorno alterando su organización y composición bioquímica (36).
- 3) Conforme a lo mencionado en el punto anterior, la fascia es transmisora dinámica de tensión mecánica. Puede contraerse de forma parecida a como lo hace el músculo liso probablemente debido al comportamiento contráctil del citoesqueleto de las células que la integran (37). El citoesqueleto celular es capaz de generar y modificar fuerzas de tensión, y muestra una estructura y dinámica intracelulares que, al igual que sucede con la fascia a nivel del organismo, se adaptaría a un modelo de "tenseguridad" (38; 36)
- 4) Contiene abundantes fibras y terminaciones nerviosas (34; 39), lo cual sugiere que es un componente importante para el sistema propioceptivo del organismo (percepción de aquellos estímulos o sensaciones que provienen de los órganos internos del cuerpo humano y que nos da información acerca de los mismos). También se ha detectado presencia de nociceptores (receptores de dolor) (40). Asociados con daño tisular o celular, estos detectan cambios a nivel mecánico y químico, así como mediadores inflamatorios como la bradiquinina, serotonina y la prostaglandina E2. Transducen estímulos mecánicos nocivos y su respuesta es dependiente de su conexión física a la matriz extracelular.

En definitiva, aunque la función y estructura de la fascia todavía están por dilucidar completamente, durante los últimos años empieza a desvelarse que no sólo desempeña una función estructural de soporte de órganos y tejidos más especializados a los que envuelve o "infiltra" de forma pasiva, sino que tiene una importante función dinámica de mecanoseñalización, captando, transduciendo y expresando señales mecánico-moleculares a nivel de tejidos, órganos y del organismo entero.

1.2.1.1.2. Estructuras músculo-aponeuróticas

Entre las estructuras músculo-aponeuróticas que hallamos en el abdomen anterior, destacan:

1. *Fascia transversalis o fascia abdominal profunda*: Se trata de una lámina aponeurótica relativamente firme que reviste la mayor parte de la pared abdominal. Separa toda la musculatura anterolateral de la cavidad abdominal. Se encuentra entre el peritoneo y la musculatura. Cubre la superficie profunda del músculo transversal del abdomen y su aponeurosis; y los lados derecho e izquierdo se continúan en la profundidad con la línea alba.
2. *Vaina de los rectos*: Los tres músculos planos del abdomen terminan anteriormente en una aponeurosis robusta y fibrosa similar a una lámina. Las fibras de cada aponeurosis se entrelazan en la línea alba con sus

análogas del lado opuesto para formar la vaina de los rectos, que encierra en su mayor parte al músculo recto mayor del abdomen y al piramidal, y fija en su capa interior una serie de inserciones tendinosas que dividen las fibras del recto de forma transversal. En su interior también se hallan arterias y venas epigástricas, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. La vaina de los rectos tiene una capa anterior que consiste en sus tres cuartos superiores en la aponeurosis entrelazada del oblicuo externo y la lámina anterior de la aponeurosis del oblicuo interno. Una capa posterior que consiste en la lámina posterior fusionada de la aponeurosis del oblicuo interno y la del transversal del abdomen.

3. *Línea alba*: Aponeurosis de estructura tendinosa, que recorre de manera descendente la línea media del abdomen separando bilateralmente las vainas de los rectos. Está formada por la fusión de las aponeurosis del recto del abdomen derecho e izquierdo con las aponeurosis más finas procedentes de los extremos de los músculos oblicuos y el transversal del abdomen.
4. *Línea arcuata*: Línea semilunar que demarca el límite inferior de la pared posterior aponeurótica de la vaina del recto. Por debajo de esta línea sólo la fascia transversal cubre el recto inferior del músculo.

En general, la función más importante de fascias y aponeurosis es actuar como elemento clave en la coordinación de la actividad muscular. Separan grupos musculares funcionales evitando que se rocen y favoreciendo su movilidad. También actúa uniendo esos grupos funcionales con otros elementos anatómicamente más separados entre sí, como huesos u otros músculos y aponeurosis. Aparte de esta función mecánica de revestimiento, protección y compartimentación, participa en la transmisión de las tensiones en el músculo y se le reconoce un papel en situaciones patológicas, como la reparación tisular, la cicatrización, o la inflamación. En situaciones inflamatorias agudas pierde su capacidad elasticidad, tensándose. Del mismo modo, comportamientos posturales que mantienen la fascia en tensión, pueden causar dolor y la reducción de la circulación del tejido en áreas alejadas de la contracción. La fascia además tiene características piezoeléctricas, es decir transforma energía mecánica en eléctrica. La plasticidad de la fascia hace que se modifique su consistencia en situaciones de estrés, y que debido a su maleabilidad vuelva a recuperar su elasticidad.

1.2.1.1.3 Tejido conectivo intramuscular

Se organiza en tres estructuras básicas:

1. *Epimisio*: Es la capa de tejido conectivo más externa que engloba al músculo en su totalidad, confundándose con la fascia que envuelve a los diversos grupos musculares.
2. *Perimisio*: Se encuentra delimitando los fascículos o grupos de fibras musculares dentro del músculo.
3. *Endomisio*: Delimita a su vez cada fibra muscular. De este modo las fibras musculares quedan inmersas en la matriz de tejido conectivo, estando íntimamente asociadas a la ME, dando a lugar a una estructura organizada tridimensional de canales. A su vez, las células musculares también tienen su propia membrana basal que se funde con el endomisio (41) (Figura 6).

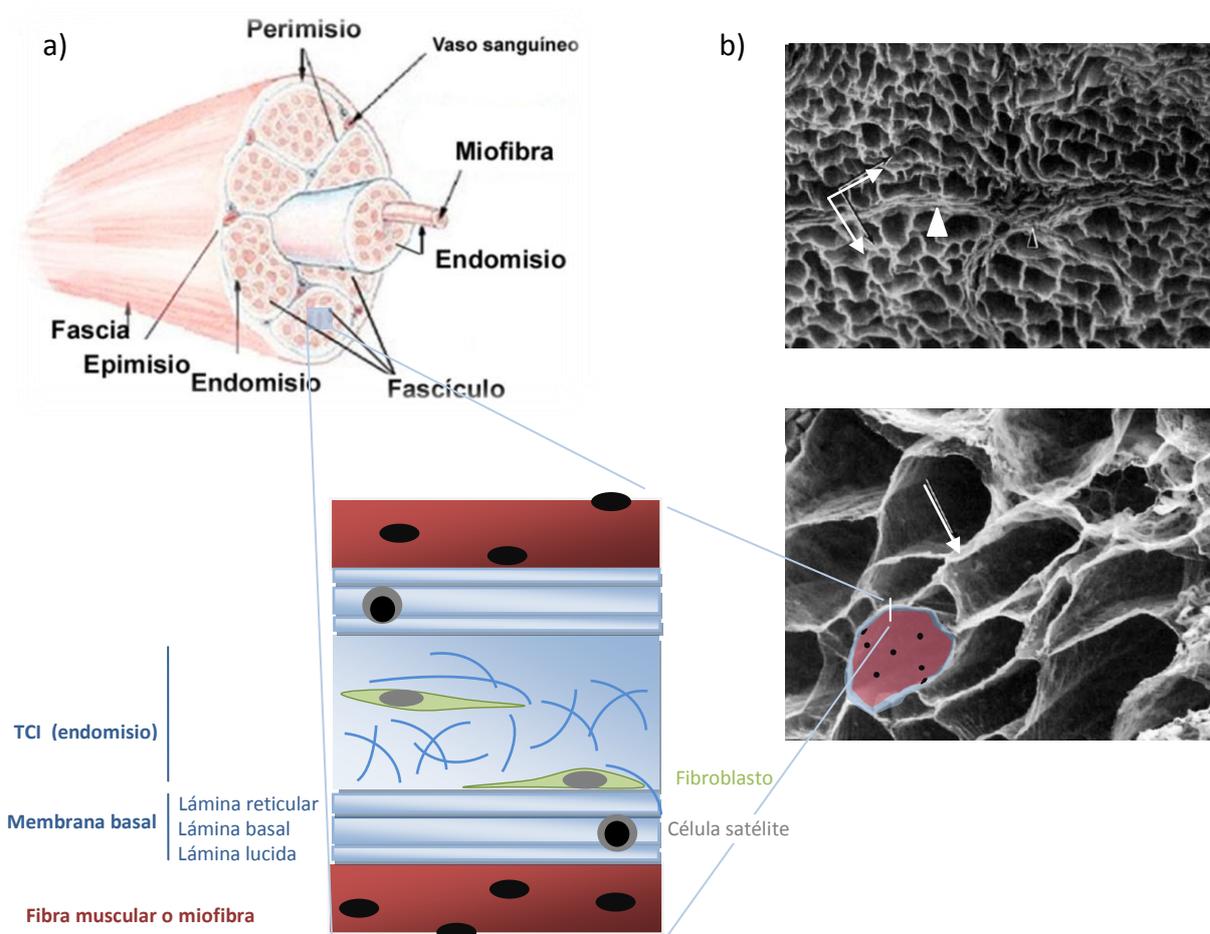


Figura 6. Estructura del músculo y el TCI. (a) Organización del tejido muscular y el TCI. (b) Micrografía de microscopía electrónica de scanning de las fibras de colágeno endomisial alrededor de las fibras musculares, después de digerir las fibras musculares con NaOH. En la imagen superior (flechas blancas) se observa la estructura tubular del endomisio en torno a las fibras musculares, y el perimisio (triángulo) como una zona engrosada de tejido conectivo. En la imagen magnificada inferior se puede observar de forma detallada la estructura fina del endomisio. Adaptadas de Allison R. Gillies BS y Richard L. Lieber (Muscle and Nerve 2011; 44: 318–331) (a) y Lewis MP, Machell JRA, Hunt NP, Sinanan ACM y Tippett HL (Eur J Oral Sci. 2011; 109: 209-22) (b) (42) (43).

1.2.1.1.4 Estructura y características del tejido

Aunque no existe una distinción clara, las aponeurosis están formadas por láminas de tejido conectivo denso compuestas básicamente por fibras de colágeno, altamente compactadas y ordenadas en una dirección (como los tendones y ligamentos) que rodean al músculo. Esto les permite resistir fuerzas extremas en un número determinado de planos, lo que las hace vulnerables a tensiones o fuerzas de cizalla en otras direcciones. Por el contrario, en las finas láminas de fascia que rodean las fibras musculares (formando el TCI), la ordenación de las fibras de colágeno es irregular, gracias a lo cual puede desarrollar un papel de tejido compactador con la capacidad de resistir fuerzas de tensión en múltiples direcciones (29) y permitir que las fibras se muevan independientemente.

Las unidades de colágeno de fascias y aponeurosis se organizan en fibrillas, fibras y haces, rodeadas de una matriz extracelular (MEC) compuesta por otras proteínas. Esta estructura permite soportar fuerzas de tensión elevadas, compartimentar algún posible daño y ejercer una fuerza estructural superior a la de todos sus componentes por separado. Aunque la composición exacta es difícil de concretar por la variabilidad que presenta el tejido en función de la zona, las fascias y aponeurosis están en general compuestas por H₂O (60-70 %), la mayoría asociada a los proteoglicanos (PGs) de la MEC. Del peso seco (ps) restante, el 70-85 % suele ser colágeno, siendo el predominante el tipo I (60 %), el segundo en abundancia el de tipo III (5-10 %), y por último el de tipo IV (2 %). El resto son proteínas/glicoproteínas (fibronectina, laminina) (4,5 % ps) y sustancias inorgánicas (0,2 % < ps). Respecto a la composición de la MEC del TCI, también en este caso el colágeno es la proteína estructural mayoritaria (1-10% del peso seco de la masa muscular), aunque podemos encontrar otros tipos diversos durante el desarrollo muscular (I, III, IV, VI, XI, XII, XIV, XV y XVIII), siendo los predominantes para el endo-, peri- y epimisio los de tipo I y tipo III. Diversos estudios indican que el colágeno de tipo I es predominante en el perimisio, mientras que el de tipo III lo es en el epimisio y endomisio. Si observamos la membrana basal, se encuentra básicamente constituida por una red de colágeno tipo IV, aunque podemos encontrar del tipo VI, XV y XVIII (43; 44; 45). En la MEC de la TCI encontramos PGs heparan sulfatos (perlecan, agrina, XV, XVIII), condroitín sulfatos (versicanos), y condroitin/dermatan sulfatos (biglicano, decorina, fibromodulina y lumicano) llegando a ser conjuntamente el colágeno XVIII, el perlecan y la agrina aproximadamente el 30% de los PGs. Los PGs participan en el mantenimiento de la estructura del TCI y la transmisión de la fuerza de forma lateral. Así, los colágenos XV y XVIII permiten la unión de membranas basales adyacentes a través del endomisio. Del mismo modo algunas glicoproteínas funcionan como conexión entre el colágeno IV de la membrana basal y el sarcolema. Este es el caso de la unión de las integrinas y α/β -dístroglicano del sarcolema de las células musculares a la laminina, y esta a su vez se une al colágeno IV de forma directa o indirecta a través de la fibronectina. También encontramos PGs heparan sulfatos de membrana como los sindecanos y el glipican que son expresados tanto por fibroblastos, como células musculares y otros tipos celulares residentes (43; 46).

El contenido de las fascias en fibras de elastina es variable y estaría relacionado con las propiedades elásticas del tejido: en aponeurosis es del 2%ps, haciendo que sea poco elástica, mientras que en el TCI puede ser del 15% (47).

El **fibroblasto** es el modelo celular preponderante en aponeurosis, disponiéndose en filas longitudinales a través del eje longitudinal de la aponeurosis, acompañado por células endoteliales, células nerviosas y células del sistema inmune en menor proporción. Son de origen mesenquimal, no totalmente diferenciadas, aunque la presencia de fibras de estrés de actina en respuesta a estímulos mecánicos, ha llevado a considerarlas miofibroblastos en muchos casos (34). En cambio, la fascia más fina se caracteriza por tener mayor diversidad celular. La MEC del TCI requiere un mantenimiento en el que participan diversos tipos celulares, realizándolo de forma más importante el fibroblasto, capaz de responder biológicamente a estímulos mecánicos del tejido (35). Otras células responsables de forma minoritaria de la producción de la MEC en la fascia muscular son los axones de las neuronas (agrina, proteoglicanos heparan sulfatos), las células de Schwann (laminina), células endoteliales (colágeno) y células inflamatorias (colágeno). Si bien se ha observado cierta actividad remodeladora de células miogénicas y satélites, la acción del fibroblasto es indispensable para el mantenimiento y reparación de la MEC. Al igual que el tejido conjuntivo de la aponeurosis, el TCI regula la actividad celular mediante mecanismos de mecanotransducción, citoquinas, enzimas y moléculas de adhesión (43; 46).

1.2.1.2 Musculatura de la pared abdominal

Las funciones de soporte/contención y postural que desarrolla la pared abdominal son ejercidas en su mayoría por cuatro grupos de pares de músculos y por las aponeurosis que los recubren. Los músculos oblicuos abdominales se encargan de rotar el tronco y realizar la flexión lateral de la columna vertebral, el transversal soporta en mayor medida la presión de intra-abdominal, como también la expiración forzada, y por último el recto abdominal se encarga principalmente de la flexión ventral de la columna vertebral.

1.2.1.2.1 Estructura y función (Figura 7)

- *Músculos oblicuos:* El *músculo oblicuo interno* se inicia de principalmente en la porción anterior de la cresta ilíaca y en la mitad lateral del ligamento inguinal, dirigiéndose en ángulo recto a aquellos del *músculo oblicuo externo*. Las fibras toman la forma de la cresta ilíaca en la que se despliegan en abanico para insertarse inferiormente en las costillas 10ª y 12ª. Estas fibras bordean el cordón espermático (o ligamento redondo), donde la mayor parte de las fibras inferiores se unen con fibras similares del músculo transversal abdominal para formar la unión tendinosa conjunta. Dentro de esta estructura, el ombligo marca un límite importante en la división de la aponeurosis del oblicuo interno. Por encima de este punto anatómico, la aponeurosis del músculo oblicuo interno se divide para envolver el músculo recto y se reincorpora posteriormente en la línea media, siendo su contribución a ésta algo más directa en la zona

inferior al ombligo. En esta localización, la aponeurosi permanece intacta y corre por delante del recto anterior contribuyendo finalmente a la línea media.

- **Músculo transverso**: Contribuye a la vaina del recto. Este es el más interno de los músculos laterales. Éste se origina entre el 7º y el 12º cartílagos costales, la cresta ilíaca, y el tercio lateral del ligamento inguinal. Los haces de este grupo transcurren básicamente de forma horizontal, excepto las fibras mediales más inferiores que cursan de forma inferomedial en su inserción en la cresta del pubis. Al igual que en el oblicuo interno, el ombligo es un punto de referencia en la división de las fibras del músculo transverso del abdomen. Esto hace que por encima del ombligo la aponeurosis del músculo transverso se una a la del oblicuo interno para formar una porción de la hoja posterior de la vaina, y que por debajo solo contribuya a la vaina anterior del recto. El lugar anatómico en el que estas fibras participantes terminan en la parte posterior del músculo recto es la línea arcuata.
- **Músculo recto abdominal**: El principal músculo vertical de la pared anterior abdominal. Este consiste en un par de músculos separados por la línea media. Su origen se encuentra en la 5ª costilla, en los cartílagos costales, para insertarse finalmente en la sínfisis del pubis y la cresta. En su parte superior, el recto es amplio, extenso y delgado, sin embargo es estrecho y grueso en la parte inferior, con la vaina de tejido conectivo dando lugar a línea semilunar de forma lateral. Cada segmentación del músculo se produce por intersecciones tendinosas que representan la inserción del músculo recto con la capa anterior de la vaina del recto. La irrigación sanguínea viene dada principalmente por las arterias superior e inferior epigástrica, y la inervación se da por los nervios intercostales 7º hasta el 12º. El resultado final es que el músculo recto se encuentra envuelto en una vaina derivada de la combinación de las aponeurosis de los músculos del oblicuo externo, oblicuo interno y transverso del abdomen.

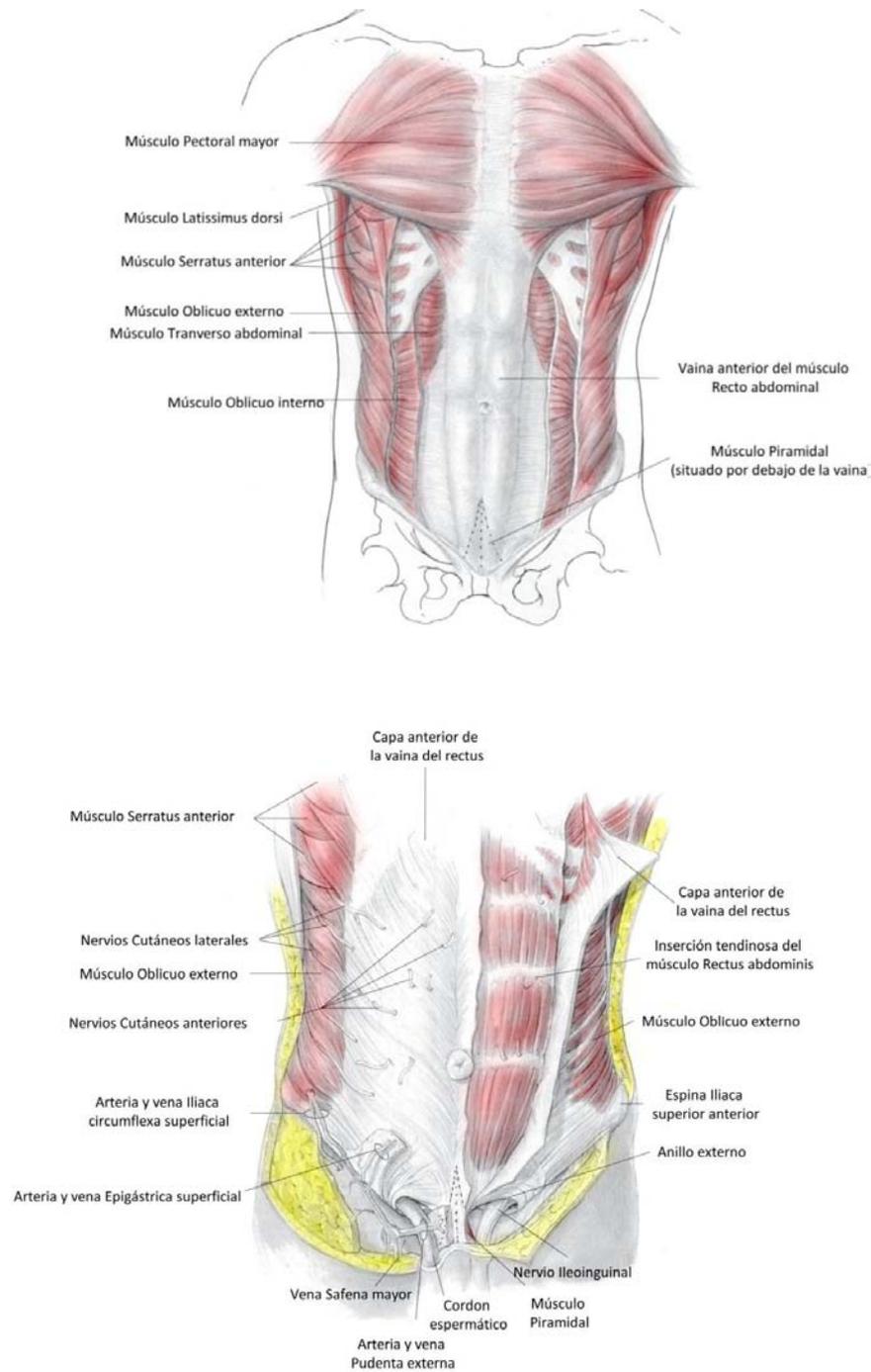


Figura 7. Musculatura de la pared abdominal anterior. Adaptado de Ahluwalia H S., Burger J P., Quinn T H. (Anatomy of the anterior abdominal wall. Operative Techniques in General Surgery. 2004; Vol 6, 3: 147-155).

1.2.1.2.2 Estructura sarcomérica y proteínas contráctiles

Las fibras musculares (miofibras) de los músculos de la pared abdominal son de tipo esquelético (estriado). La miofibras, células multinucleadas provenientes de la fusión diversos mioblastos, están conformadas por largas estructuras englobadas por la membrana celular o sarcolema. El sarcoplasma es un citoplasma especializado del músculo estriado, que contiene el aparato de Golgi, abundantes miofibrillas, el retículo sarcoplasmático (RS) (plasmático modificado), mioglobina y mitocondrias. Los túbulos transversos T se invaginan en el sarcolema, lo que permite que los potenciales generados en la unión neuro-muscular se propaguen, penetren y activen el RS, induciendo la liberación del Ca^{2+} en éste y habilitando la contracción muscular. Las miofibras están formadas por unidades contráctiles o miofibrillas, constituidas por la ordenación longitudinal de los miofilamentos. Los miofilamentos están constituidos por filamentos gruesos de miosina, y filamentos delgados de actina. El deslizamiento entre los filamentos de miosina y actina producen el fenómeno de contracción. Dentro de las miofibrillas se observan estriaciones o líneas/bandas observables al microscopio (A, I, M, H y Z), dando la denominación de estriado para el músculo esquelético. Estas bandas definen los sarcómeros, que son las unidades contráctiles dentro de la miofibrilla. Dos bandas Z contiguas delimitan a un sarcómero, siendo la línea donde se insertan los filamentos de actina, y los de miosina de forma indirecta por la titina. La zona de interacción entre la miosina y actina se denomina banda A. La contracción del sarcómero hace que las dos líneas contiguas se acerquen y por extensión todo el músculo. La contracción se transmite por el sarcolema hacia otras miofibras y la MEC mediante las uniones proteicas *costámeras* situadas en los discos-Z. Los componentes principales del sarcómero son la miosina, actina y titina, pero la se encuentran acompañadas por multitud de proteínas que estabilizan las estructuras, ayudan a la generación de la fuerza y a su transmisión (48) (49)(Figura 8).

La contracción de los sarcómeros se produce por repetidos contactos cíclicos entre los filamentos de actina y miosina. Los filamentos de actina están constituidos por monómeros de G-actina que forman una doble cadena α -hélice (F-actina). Al mismo otra doble cadena α -hélice de tropomiosina, gira acompañando a los filamentos de actina, por el surco dejado ente los dos filamentos de actina. A lo largo de los filamentos de actina, también se dispone un heterotrímero de troponina -T, -C y I (inhibidora), que interactúa con la tropomiosina y la actina para evitar el contacto con la miosina. Una vez se ha producido la entrada se Ca^{2+} se produce un cambio conformacional que permite el contacto entre al miosina y la actina produciéndose el ciclo de contracción.

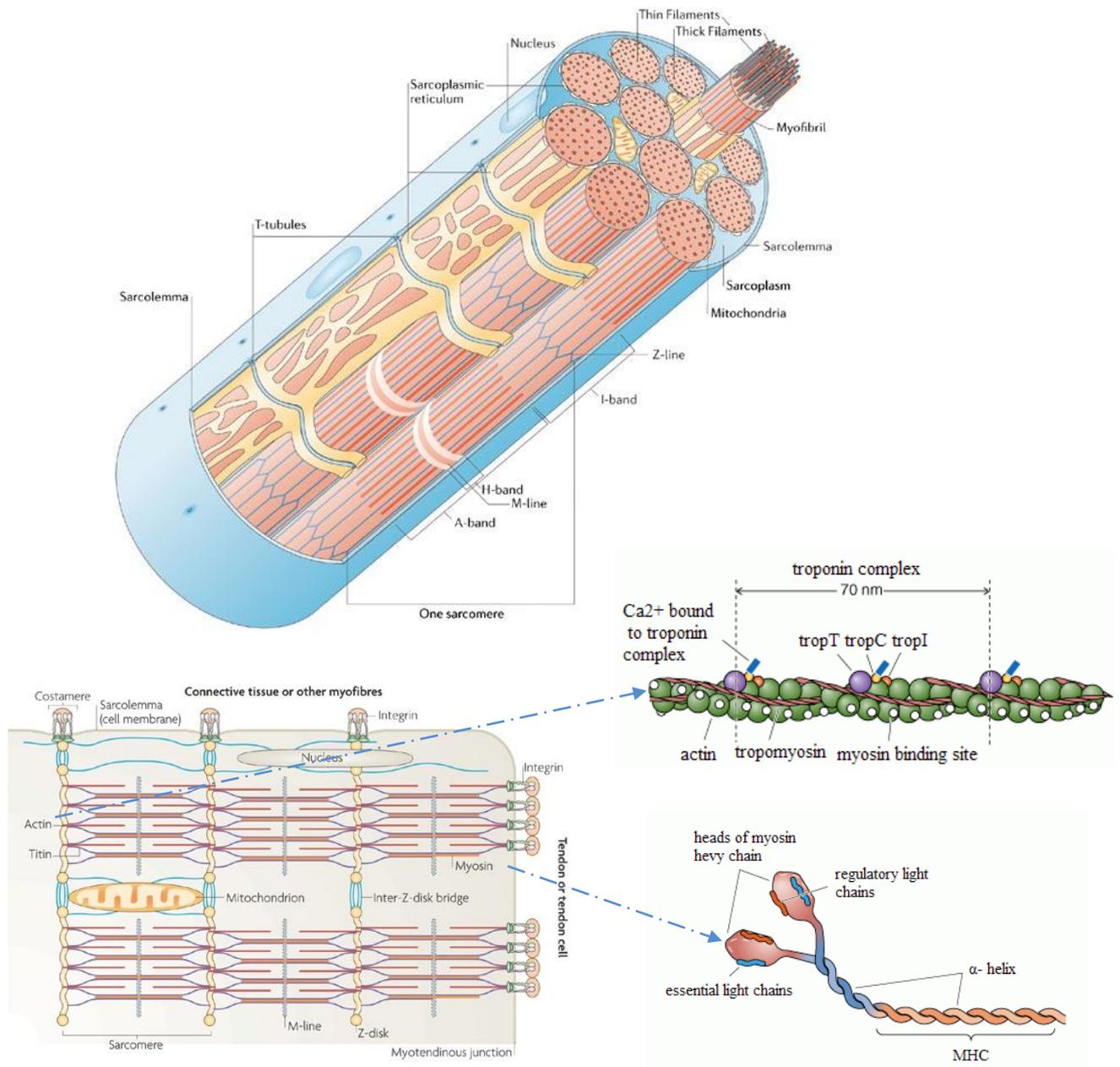


Figura 8. Esquema de la miofibra y del aparato contráctil. Davies KE, Nowak KJ (Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Oct; 7(10):762-73), y Sparrow JC, Schöck F. Nat (Rev Mol Cell Biol. 2009 Apr;10 (4):293-8) y de la estructura de los filamentos de actina y miosina (Boron W and Boulpaep E. Medical Physiology. 2012. Elsevier.

1.2.1.2.3 La cadena pesada de miosina

El filamento de miosina está formado por hexámeros de moléculas de miosina. Cada molécula de miosina se estructura por dos cadenas pesadas (*heavy chain; MyHC*) enrolladas entre sí en forma de α -hélice levógira, que terminan dos cabezas finales, donde se sitúan dos cadenas ligeras reguladoras (*light chain; MyLC*). En cada ciclo de puentes de unión entre la miosina y la actina, la unión de una molécula de ATP separa la cabeza de la MyHC de la actina. La hidrólisis del ATP por la función hidrolasa de la MyHC permite la unión de nuevo al filamento, al mismo tiempo que la liberación del Pi y el golpe de fuerza (contracción) que acorta el sarcómero y finalmente a todo el músculo. El ciclo de interacción entre la actina y la miosina termina cuando el sitio de unión del nucleótido de la MyHC es ocupado por el ADP, que deja al complejo *acto-miosina unido* (50) (Figura 9).

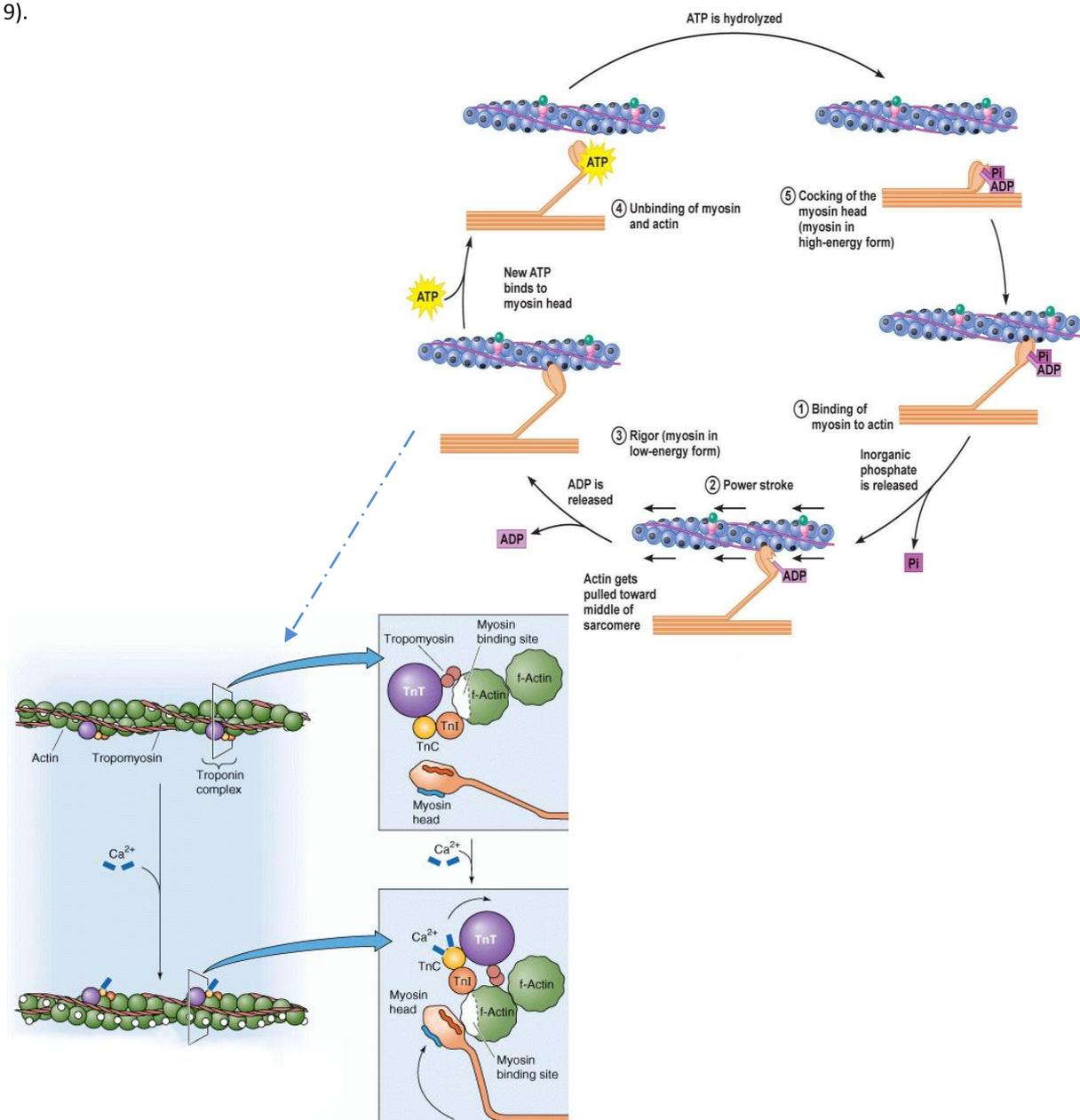


Figura 9. Contracción entre los filamentos de actina y miosina. Activación de la contracción mediante el Ca^{2+} (Boron W and Boulpaep E. *Medical Physiology*. 2012. Elsevier) y ciclo de contracción dentro del sarcómero (Pearson education. 2011)

Existen diversas isoformas de la MyHC, codificadas por una familia de genes muy conservada localizada en el cromosoma 17 en humanos (367). El ritmo o proporción de hidrólisis del ATP varía en función de la isoforma de MyHC, lo cual está asociado a las diferencias que hay en la cinética de los ciclos de activación/desactivación de los puentes cruzados entre actina y miosina (51).

1.2.1.2.4 Tipificación de las fibras musculares

La composición en isoformas de la MyHC de las fibras musculares es esencial para la tipificación de las fibras musculares. Esta se corresponde con la clasificación histoquímica de rutina basada en la actividad de la ATPasa miofibrilar y en la determinación de la actividad metabólica de las fibras.

- ATPasa miofibrilar: Permite clasificar a las fibras musculares esqueléticas como fibras de tipo I, IIA y IIB/IIX mediante el análisis histoquímico de la actividad ATPasa miofibrilar frente a pre-incubaciones a pH alcalinos y ácidos (52; 53).
- Actividad metabólica: La caracterización más tradicional de las fibras musculares consistía en la detección histoquímica de enzimas metabólicos con actividades oxidativas o glucolíticas, lo cual clasificaba a las fibras en lentas y rápidas. Actualmente, se realiza la detección cuantitativa histoquímica de la actividad succinato deshidrogenasa o NADH (52; 53).
- Expresión de las isoformas de la cadena pesada de la miosina: Las fibras musculares esqueléticas en el ser humano adulto se clasifican en tres tipos: tipo I, tipo IIA y tipo IIX. Las fibras (unidades motoras) de tipo I son las denominadas de contracción lenta, oxidativas (metabolismo aeróbico mitocondrial), características de la función anti-gravitatoria y postural, y resistentes a la fatiga. Las de tipo IIA son de contracción rápida, oxidativas-glucolíticas, menos resistentes a la fatiga y encargadas de la locomoción sostenida. Por último, las de tipo IIX son las que tienen una velocidad más rápida de contracción, metabolismo glucolítico y más facilidad de fatiga, características de movimientos explosivos. Respecto al poder de contracción que ejercen (energía mecánica generada/ unidad de tiempo), el orden es: tipo I < IIA < IIX. A pesar que existen las isoformas de las MyHC para cada tipo de fibra, la adaptabilidad de estas permite que encontremos fibras híbridas que expresan diferentes tipos de MyHC al mismo tiempo (51) (54).

1.2.1.2.5 Tipos de fibra en el músculo de la pared abdominal

Se conoce muy poco sobre la composición específica de fibras musculares en los diferentes músculos de la pared abdominal humana (55). Las técnicas histoquímicas convencionales sugieren que a pesar de las distintas propiedades funcionales de los diversos músculos de la pared anterior abdominal, no se encuentran diferencias en la composición de sus fibras musculares, aunque sí una gran variabilidad inter-individual. En general, y coincidente con la función postural de estos músculos, la proporción de fibras de tipo I (resistentes a la fatiga) es del 55-58%, del 15-23% para las fibras de tipo IIA y del 21-28% para las de tipo IIB (IIX). Así, parece que los

diferentes músculos de la pared abdominal poseerían una capacidad funcional similar, aunque una elevada variabilidad funcional inter-individual.

1.2.1.2.6 Desarrollo embrionario de las fibras musculares

El músculo esquelético, a excepción de los músculos craneales, deriva de células precursoras originadas del **somites** (esferas epiteliales) que se encuentran en el mesodermo paraxial al lado del tubo neural y la notocorda. Progresivamente el somite se subdivide en dos compartimientos: el *dermomioto* (dorsal) y el *escleroto* (ventral). El dermomioto se divide a su vez en el *dermatom* y *miotom* en las fases más tardías del desarrollo para dar a la dermis y los músculos del tronco, respectivamente. En la formación del miotom, las células precursoras miogénicas logran la transición epitelial-mesenquimal gracias a señales del entorno generadas por el dermomioto, delaminándose y acumulándose debajo de este. El dermomioto también se puede definir dos regiones: una dorsal (*epaxial*) y una ventral (*hypaxial*). La proteína *Sonic hedgehog (SHH)* es secretada desde la placa basal y la notocorda, determinando el dermomioto epaxial, dando lugar al *miotom epaxial* que dará lugar a su vez a los músculos dorsales. Por el contrario, el dermomioto hypaxial es definido por señales del ectodermo dorsal (vía *Wnt*) y el mesodermo lateral (vía *BMP4*), generando el *miotom hypaxial* que dará lugar a los músculos de las extremidades, diafragma y paredes del cuerpo (Figura 10).

Durante el transcurso de diferenciación embrionaria del músculo esquelético las células precursoras miogénicas del dermomioto siguen los pasos secuenciales de determinación del linaje, deslaminación, migración y por último de diferenciación. La expresión de los factores de transcripción Pax3 y Pax7 participa en estos pasos. La expresión de Pax3 conduce a la diferenciación de las células del somite en células musculares precursoras, y la consecutiva de Pax7 conduce a la diferenciación de estas en células satélite (CS). En la fase de diferenciación o miogénesis, una vez finalizada la migración, la expresión de Pax3 y Pax7 disminuye gradualmente al mismo tiempo aumenta la expresión de un sub-grupo de factores de transcripción **helix-loop-helix (bHLH)**, los **factores reguladores miogénicos (myogenic regulatory factor; MRFs)**: *Myf5*, *MyoD*, *Myog*, y *Mrf4*. Los MRFs determinan el destino de las células precursoras hacia mioblastos que se fusionan y por último término se diferencian en fibras musculares esqueléticas. La expresión de los MRFs se realiza de forma secuencial. Las células precursoras mesenquimales comienzan a sobre-expresar *MyoD* y *Myf5* lo que las hace proliferar, denominándose mioblastos (el *Myf5* se cree que participa además en la renovación de las CS en el músculo adulto). Estas son secuestradas del ciclo celular para diferenciarse en miocitos que expresan los MRFs más tardíos, Miogenina y MRF4, y a continuación genes como la cadena pesada de la miosina y la creatina quinasa muscular. Por último, los miocitos mononucleados se fusionan de forma específica para formar un sincitio multinucleado, que evoluciona o madura hacia fibras musculares contráctiles. Durante el transcurso del desarrollo del músculo, una subpoblación de los mioblastos no alcanza a diferenciarse permaneciendo asociada a la superficie de las miofibras como células *satélites* (CS) quiescentes que expresan de forma característica Pax7. En la edad adulta, el músculo se encuentra caracterizado por fibras musculares multinucleadas post-mitóticas (56; 57; 58) (Figura 11).

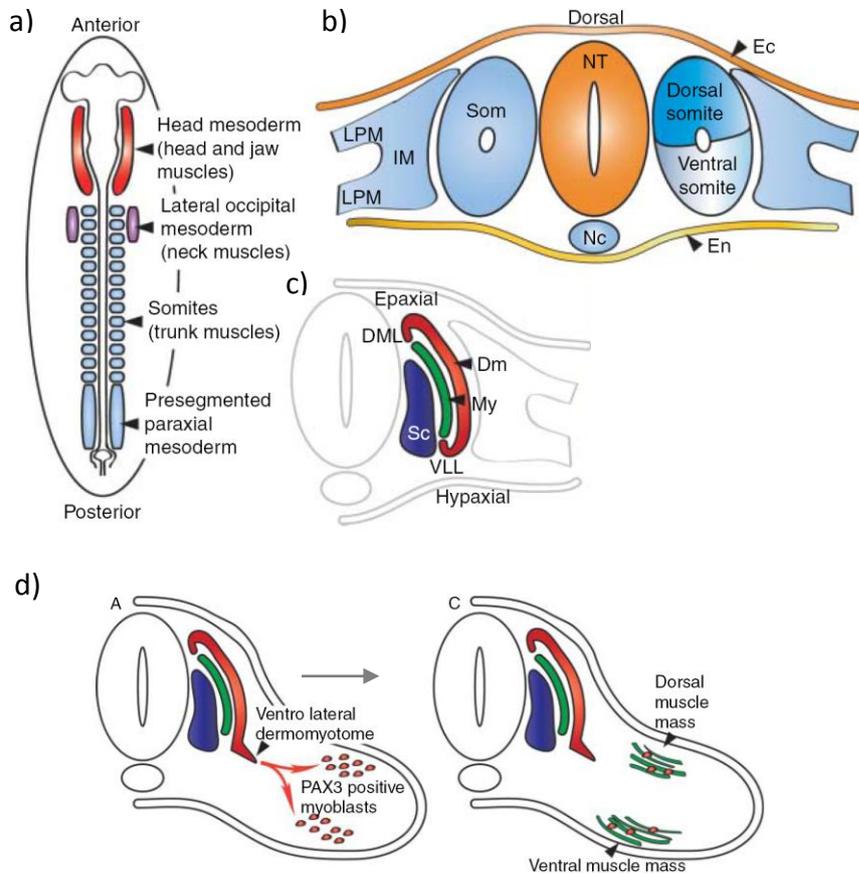


Figura 10. Desarrollo embrionario de las fibras musculares a) Esquema de las áreas miogénicas de un embrión amniota de 13 somites en el estado 11 de Carnegie (24 días). b) Sección transversal de un embrión indicando la disposición de los derivados mesodérmicos (azul), derivados ectodérmicos (naranja) y los del endodermo (amarillo). El somites dorsal genera el dermomyotono y el ventral el esclerotomo. c) Organización del somite en su diferenciación (dermomyotono, azul; miotono, verde; esclerotomo, azul). d) Migración de los mioblastos en los primordios de las extremidades, y posterior diferenciación en miotubos diferenciados (verde) y células precursoras indiferenciadas (algunas de ellas darán lugar a células satélites; rojo). LPM, mesodermo lateral; IM, mesodermo interno; Som, somite; NT, tubo neural; Nc, notocorda; Ec, ectodermo; En, endodermo; Dm, dermomyotomo; My, miotomo; Sc, esclerotomo; DML, labio dorsomedial del dermomyotomo; VLL, labio ventrolateral del dermomyotono. Adaptado de Yokoyama S. y Asahara H (Reproduction .2011; 141 301–312).

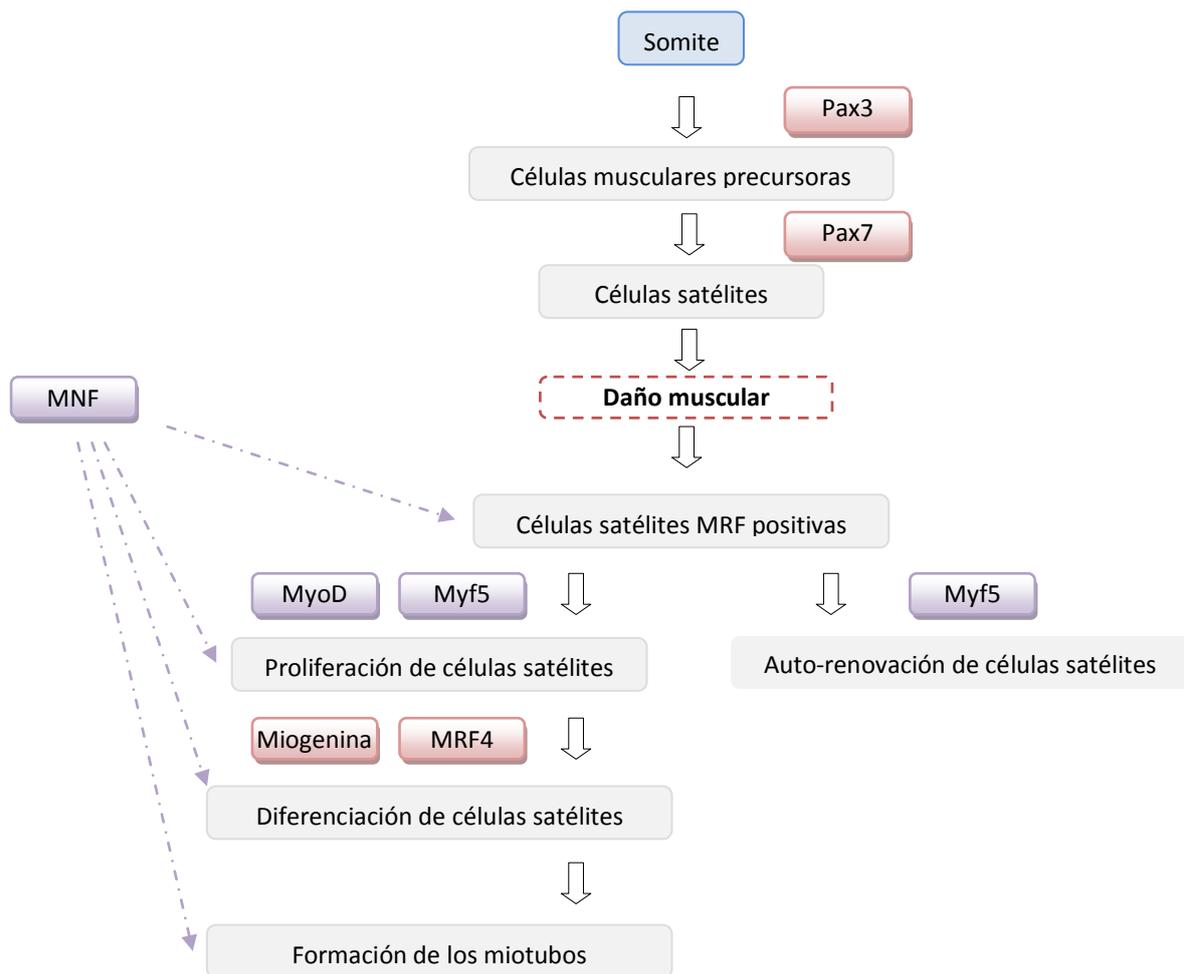


Figura 11. Programa de especificación, activación y diferenciación de las CS, durante el desarrollo y regeneración del músculo. Secuencia de expresión de Pax3/7 y de MRFs; la acción del MNF es específica del proceso de regeneración

El desarrollo del músculo embrionario (al igual que su reparación), se ve regulado por todo tipo factores de crecimiento y diferenciación (HFG, FGF, BMPs), pero también además por el TCI. Este influye en la migración, proliferación y diferenciación interaccionando con las células miogénicas. Un ejemplo es la adhesión y la proliferación de los mioblastos promovida por la fibronectina, y al mismo tiempo que inhibe la diferenciación. También los PGs (GAGs) participan en los procesos desarrollo embrionario y reparación. Sindecanos, glipican (situados en la membrana), perlecan, biglicano y decorina (secretados a la MEC), regulan la diferenciación celular. En el caso de los sindecanos (1 y 3) son capaces de suprimir la acción del FGF-2 (potente inhibidor de la diferenciación) mediante su infra-expresión, ya que colaboran en la transeñalización con el propio receptor del FGF-2 (59; 60; 43).

1.2.2 Las incisiones en la pared abdominal y el cierre de la laparotomía media

Al realizar la incisión en la intervención quirúrgica de la laparotomía la fascia pierde su integridad que irá recuperando en el proceso de recuperación, que puede alargarse hasta 70 días. Mientras se llega a ese punto, las suturas soportan los bordes de la fascia sin ninguna ayuda, que si no son capaces de soportar la presión abdominal llevarán a la dehiscencia de la herida, la evisceración, y más alejado en el tiempo, a la hernia incisional. El hecho que la incisión se haga en la línea alba, facilita estos tipos de complicaciones. En la línea alba convergen diversas tensiones ejercidas, desde la propia presión intra-abdominal, hasta la ejercida por los músculos laterales, que hace que la tendencia, después de una incisión, sea que separen los bordes suturados de la pared. Se ha descrito que la resistencia mecánica no depende del entrecruzamiento de las fibras de la fascia si no de su espesor y densidad (61).

El cierre de la laparotomía debe basarse en la elección de la técnica más eficaz (considerando los costes económicos y la facilidad de ejecución), que nos ofrezca la menor tasa de complicaciones a corto plazo, como evisceraciones e infecciones, y largo plazo, con la aparición de hernias y granulomas. El cierre de la pared abdominal se puede realizar mediante el *cierre en masa* o *el cierre por planos*. El cierre en masa se realiza agregando un estrato de grasa subcutánea, músculo recto, aponeurosis de los rectos y fascia transversalis (opcionalmente el peritoneo). Su uso aumenta la cantidad de tejido bajo la espiral con un tipo de sutura continua. El resultado es una disminución de la fuerza por unidad de superficie (pero no de forma absoluta) sin perder adherencia la herida, y de forma importante, evita el riesgo de necrosis isquémica y evisceración. En el cierre por planos las suturas de los bordes de la herida, se hacen de forma particular en cada plano de la incisión (fascia, tejido subcutáneo). La sutura del peritoneo no influye ni en el dolor post-operatorio, ni en la cicatrización de la herida, además puede provocar adherencias viscerales como complicación. La fascia ofrece la mayor parte de la fuerza tensil durante la cicatrización, por tanto la sutura debe ser capaz de sustituirla hasta que la fascia sea capaz de responder adecuadamente. En la sutura de la fascia se debe evitar el desgarro del tejido por excesiva tracción y la excesiva eliminación de grasa subcutánea. El cierre del tejido subcutáneo disminuye el riesgo de disrupción de los bordes de la herida con una grasa superior a 2 cm (un 34% menos), eliminando espacios vacíos evitando la aparición de seroma o hematomas. Diversos estudios comparativos en paciente indican que el cierre en masa aporta un índice menor de dehiscencias y hernias incisionales, concluyendo además que combinada con la sutura continua, es más rápida y eficiente (61).

Aparte de la aproximación general de cómo se realiza el cierre, también es importante como se realizan los puntos de sutura. El cierre se puede realizar con puntos de sutura continuos o sueltos. De los dos, el primero, conjuntamente con un material de absorción lenta y la doble lazada de sutura, ofrece en la laparotomía media una menor probabilidad de aparición de la hernia. La ventaja de la continua es que requiere menos tiempos, menos nudos-material (con lo que se reduce la reacción de cuerpo extraño) y permite un reparto de la tensión más uniforme en la línea de sutura. Esta última es importante ya que evita la isquemia en los tejidos, con lo que se evita las dehiscencias y otros mecanismos degenerativos del tejido que a posteriori puedan causar la

aparición de la hernia incisional. De forma remarcable, la relación entre la longitud de la sutura (longitud del hilo de sutura empleado) y la longitud de la herida 4:1 es la que tiene mejor propiedades biomecánicas, reduciendo el riesgo de la hernia incisional (61).

Independientemente de la técnica de cierre y sutura, la sutura de la fascia se debe realizar sin tensión, con los bordes bien encajados, no realizándose cerca del límites del tejido, al menos a 1 cm de del borde de las fascias, para que la cicatrización sea normal y que la resistencia de esta sea la adecuada. En cambio el músculo no debe suturarse ya que se pueden producir desgarros posteriores, y en el caso del peritoneo dependerá de las características del paciente (riesgo o no de infección, adherencias). Respecto al tipo de material en la sutura pueden ser actualmente sintético absorbible o no absorbible. Las suturas absorbibles se degradan con el paso del tiempo, perdiendo su capacidad de ejercer la fuerza de tensión. Este tipo de material es mejor en el aspecto de su desaparición ya que no deja ningún cuerpo extraño, mejorando el proceso de cicatrización. Esta desaparición de la sutura absorbible debe ir acompañado del incremento de la tensión de la fascia en reparación, para que la sutura sea eficiente. Estas suturas pueden ser suturas trenzadas o monofilamento, compuestas por ácido poliglicólico, poliglactina, Lactomer, poliglecapona- glycomer, poligluconato o polidioxanona, las dos últimas de absorción lenta. Las no absorbibles se caracterizan por la buena tolerancia y la resistencia permanente siendo más resistentes a la infección (mayor oposición a la absorción y la proliferación bacteriana. Pueden estar compuestas, monofilamento de polipropileno, monofilamento de poliéster o sutura trenzada de poliéster, monofilamento de PVDF o monofilamento microporoso de PTFE (Gore-tex®). A estos materiales se les ha asociado dolor prolongado y mayor *sinus* en la sutura (62) (61). Además del uso de suturas absorbibles o permanentes, este ha sido acompañado del uso creciente de adhesivos en base de fibrina (*fibrin glues*) especialmente en la reparación hernia inguinal y la paraesofageal, como es el caso de Tissucol®/Tisseel® y Evicel® (63). La utilización de un tipo de cierre y/o sutura dependerá de las características del paciente (62).

1.3 Etiología de la hernia incisional

El enfoque o aproximación terapéutica a la patología de la hernia incisional abdominal se ha fundamentado básicamente en la búsqueda de soluciones prácticas de reparación de la fascia/aponeurosis, basadas en la mejora de las técnicas quirúrgicas con ayuda de la evolución de las mallas protésicas y suturas (64; 65). Sin embargo, de forma sorprendente, poco se ha avanzado específicamente en la investigación de las bases celulares y moleculares del inicio, desarrollo y recurrencias de la hernia incisional, o la también llamada **biología de la formación de la hernia**. De hecho, de estos pocos estudios, la gran mayoría hacen referencia a la hernia inguinal, y sus resultados sirven para intentar explicar los mecanismos biológicos de la formación de la hernia incisional (2; 9; 66). Diversos estudios *in vitro* (67-70) y modelos en animales de experimentación han intentado establecer las primeras hipótesis de aparición para la patología (71-75). Los primeros, en su gran mayoría, se basan en cultivos celulares no humanos y/o de líneas establecidas, y los segundos tratan de validar nuevas técnicas quirúrgicas con o sin el uso de mallas. Por tanto, el conocimiento recogido es disperso, y de difícil transposición a la patología en humanos.

Este hecho queda reflejado simplemente realizando una búsqueda por artículos publicados en la biblioteca digital MEDLINE® (*PubMed*®; U.S. National Library of Medicine), a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esta búsqueda direccionada (en cualquier sección de un artículo desde el año 1813) hacia términos como hernia incisional, fibroblasto y otros términos relacionados con la biología molecular, demuestra que el número de los estudios sobre la hernia incisional son muy inferiores a la de las otras hernias abdominales. Esto es todavía más evidente respecto a la biología molecular de la hernia incisional (Figura 12 Figura 13).

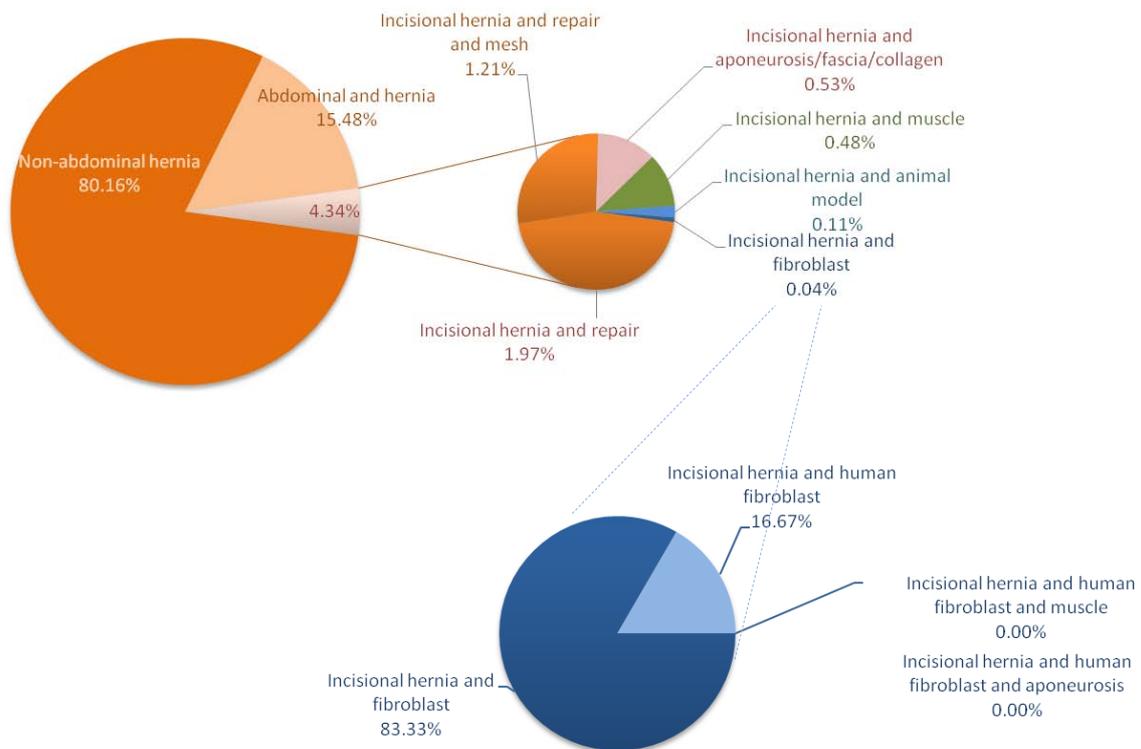


Figura 12. Búsqueda de términos en la biblioteca digital MEDLINE® (PubMed®) en relación con la hernia incisional. Se indican los términos de búsqueda, el nº de artículos encontrados y el % respecto al total.

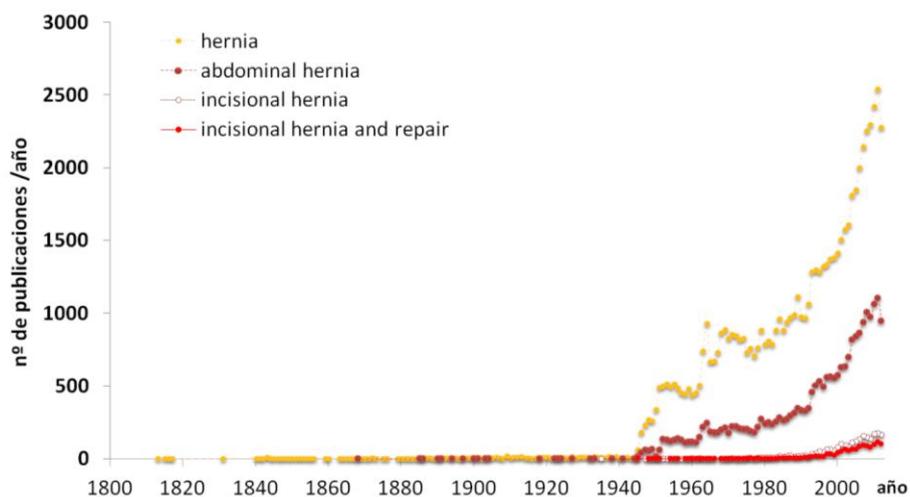


Figura 13. Evolución histórica de las publicaciones sobre la patología de la hernia en la biblioteca digital MEDLINE® (PubMed®).

1.3.1 Factores de riesgo conocidos

La hernia incisional es una patología afectada por múltiples factores. La clasificación actual o clásica de *los factores de riesgo* asociados a la génesis de la hernia incisional se divide en *factores de tipo general* que pueden estar relacionados con características generales del paciente (ej. edad, sexo, comorbilidades) o dependientes del tratamiento quirúrgico, y *factores biológicos (intrínsecos)* que englobaría las propiedades celulares y moleculares del paciente, que no siendo patológicas, afectarían potencialmente a la recuperación frente a la cirugía abdominal. Los de tipo general, aún siendo factores asociados, tienen finalmente una base celular y molecular (2; 76; 66; 9) (Figura 14).

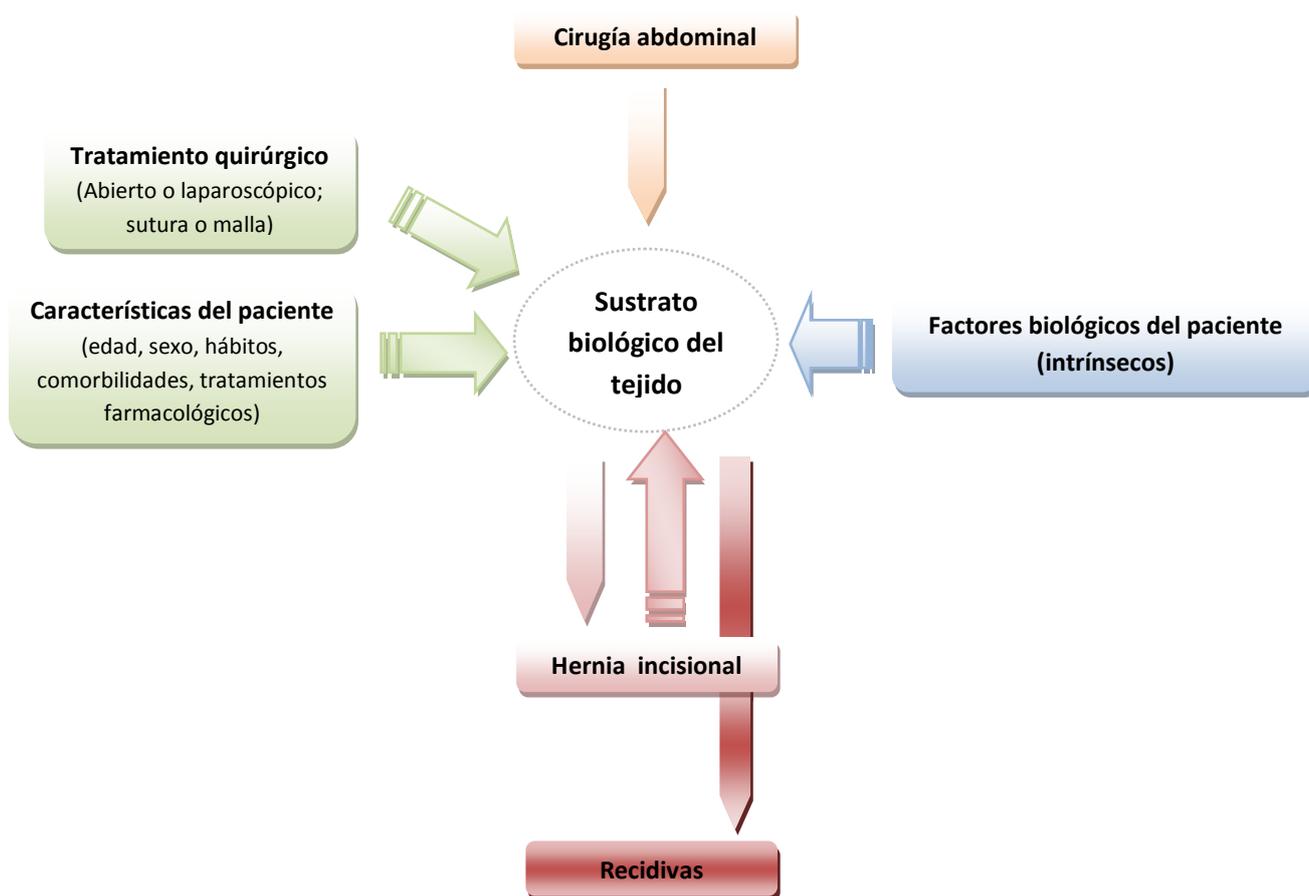


Figura 14. Factores de riesgos asociados a la génesis de la hernia incisional. Esquema general.

1.3.1.1 Factores técnicos

Dentro de los factores de riesgo generales, los factores técnicos desempeñan un papel muy importante en la aparición de la hernia. Los más estudiados son los que se relacionan con el tipo de incisión, la técnica de cierre y el tipo de sutura.

Tipo de incisión

La elección de la incisión depende básicamente de la zona a explorar en la cavidad abdominal, si es una intervención urgente o electiva, y de las preferencias del cirujano. A pesar de estas reglas básicas, no existe una opinión única de cuál es la más ventajosa para una determinada situación. Incluso no se tienen evidencias sobre si es mejor el uso del bisturí normal o el eléctrico. A pesar de que el tipo de laparotomía realizada (localización, longitud) afecta al dolor post-operatorio, a la infección de la herida (el problema más común de la laparotomías) y al índice de hernias incisionales, esta falta de aplicación de una técnica de uso común y prioritaria dificulta la evaluación de la eficiencia de las técnicas.

La laparotomía media (la que suele realizarse incidiendo la línea alba) sigue siendo uno de los abordajes realizado con más frecuencia ya que permite un acceso adecuado con mínima afectación para el músculo, nervios, y grandes vasos. Al realizar la incisión la fascia pierde su integridad, que irá recuperando en un proceso de reparación que puede alargarse hasta 70 días. Mientras se llega a ese punto, las suturas soportan los bordes de la fascia sin ninguna ayuda. Si éstas no son capaces de soportar la presión abdominal llevarán a la dehiscencia de la herida, la evisceración, y más alejado en el tiempo, a la hernia incisional. El hecho que la incisión se haga en la línea alba, facilita este tipo de complicaciones. En la línea alba convergen diversas tensiones, desde la propia presión intra-abdominal hasta la tensión que efectúan los músculos laterales. La consecuencia es que después de una incisión los bordes suturados de la pared tienden a separarse. Se ha descrito que la resistencia mecánica no depende del entrecruzamiento de la las fibras de la fascia si no de su espesor y densidad (61).

Técnica de cierre

El tipo de cierre debería ser el que comporte la menor tasa de complicaciones inmediatas (evisceración, infección de la herida) y/o tardías (eventración, granulomas). Los diferentes tipos de cierres se basan en diferentes combinaciones de las diversas capas de la pared abdominal a saturar, lo cual influye en el riesgo de fracaso. A pesar de las ventajas de la laparotomía media, la línea alba es un punto débil de la pared abdominal y por tanto se requiere un cierre minucioso, en el que las claves para realizarlo con éxito son tanto el factor técnico como el factor humano.

El cierre de la pared abdominal se puede realizar mediante el *cierre en masa* o el *cierre por planos*. El cierre en masa se realiza agregando un estrato de grasa subcutánea, músculo recto, aponeurosis de los rectos y fascia transversalis (opcionalmente el peritoneo). Su uso aumenta la cantidad de tejido bajo la espiral con un tipo de

sutura continua. El resultado es una disminución de la fuerza por unidad de superficie (pero no de forma absoluta) sin que la herida pierda adherencia, y de forma importante, evita el riesgo de necrosis isquémica y evisceración. En el cierre por planos, las suturas de los bordes de la herida se hacen en cada plano de la incisión (peritoneo y fascia). La sutura del peritoneo no influye en la cicatrización de la herida, pero puede provocar adherencias viscerales como complicación. La fascia ofrece la mayor parte de la fuerza tensil durante la cicatrización, por tanto la sutura debe ser capaz de sustituirla hasta que la fascia sea capaz de responder adecuadamente. En la sutura de la fascia se debe evitar el desgarro del tejido por excesiva tracción y la excesiva eliminación de grasa subcutánea. El cierre del tejido subcutáneo disminuye el riesgo de disrupción de los bordes de la herida con una grasa superior a 2 cm (un 34% menos), eliminando espacios vacíos evitando la aparición de seroma o hematomas. Diversos estudios comparativos en pacientes indican que el cierre en masa aporta un índice menor de dehiscencias y hernias incisionales, concluyendo además que combinada con la sutura continua, es más rápida y eficiente (61).

Independientemente de la técnica de cierre y sutura, la sutura de la fascia se debe realizar sin tensión, con los bordes bien encajados, no realizándose cerca de límites del tejido, al menos a 1 cm de del borde de las fascias, para que la cicatrización sea normal y que la resistencia de esta sea la adecuada. En cambio el músculo no debe suturarse ya que se pueden producir desgarros posteriores. En el caso del peritoneo dependerá de las características del paciente (riesgo o no de infección, adherencias).

Tipo de sutura

Es importante cómo se realizan los puntos de sutura. El cierre se puede realizar con puntos de sutura continuos o sueltos. De los dos, el primero, conjuntamente con un material de absorción lenta y la doble lazada de sutura, ofrece, en la laparotomía media, una menor probabilidad de aparición de la hernia. La ventaja de la sutura continua es que requiere menos tiempo, menos nudos-material (con lo que se reduce la reacción a cuerpo extraño) y permite un reparto de la tensión más uniforme. También evita la isquemia en los tejidos, con lo que se atenua la aparición de dehiscencias y otros mecanismos degenerativos del tejido que a posteriori puedan causar la génesis de una hernia incisional. De forma remarcable, la relación entre la longitud de la sutura (longitud del hilo de sutura empleado) y la longitud de la herida 4:1 es la que tiene mejores propiedades biomecánicas, reduciendo el riesgo de la hernia incisional (61).

Respecto al tipo de material, la sutura puede ser actualmente sintético absorbible o no absorbible. Las suturas absorbibles se degradan con el paso del tiempo, perdiendo su capacidad de ejercer fuerza de tensión. Este tipo de material es mejor en el aspecto de su desaparición ya que no deja ningún cuerpo extraño, mejorando el proceso de cicatrización. Para que la sutura sea eficiente, la degradación de la sutura absorbible debe ir acompañada del incremento de la tensión de la fascia en reparación. Las suturas no absorbibles se caracterizan por la buena tolerancia y la resistencia permanente siendo más resistentes a la infección (mayor oposición a la absorción y a la proliferación bacteriana). A estos materiales se les ha asociado dolor más prolongado y mayor *sinus* en la sutura (62) (61). Además del uso de suturas absorbibles o permanentes, también hay un uso

creciente de adhesivos en base de fibrina (*fibrin glues*) (63). La utilización de un tipo de cierre y/o sutura dependerá de las características del paciente (62).

La dificultad de restaurar la capacidad de sostén de la pared abdominal puede ser superada mediante el uso de prótesis, que reducen el número de recidivas. A pesar de su efecto positivo, las prótesis pueden llevar asociados a su vez problemas de infección, adhesión, seroma y dolor (por la reacción a cuerpo extraño), que impiden la resolución correcta de la reparación.

Todas estas influencias técnicas (incisión, tipo de cierre y sutura) se ven a su vez magnificadas o superadas por el factor humano. La pericia del cirujano determinará si al final se aprovecha toda la tecnología disponible para la reparación de la pared abdominal. En algún estudio se ha podido comprobar que el grado de experiencia del cirujano contribuye a la aparición de dehiscencias. Finalmente, a pesar de que el uso de la laparoscopia, como de técnica mínimamente invasiva, parecía ofrecer una alternativa a la laparotomía, la incidencia de la hernia incisional que se ha observado puede llegar al 4% (13) (61).

Los factores técnicos juegan un papel importante en la aparición de la hernia. La elección de la incisión depende básicamente de la zona a explorar en la cavidad abdominal, si es una intervención urgente o electiva, y de las preferencias del cirujano. A pesar de estas reglas básicas no existe una opinión única de cuál es la más ventajosa para una determinada situación. Incluso no se tienen evidencias si es mejor el uso del bisturí normal o el eléctrico. A pesar de que el tipo de laparotomía realizada (localización, longitud) afecta al dolor post-operatorio, la infección de la herida (el problema más común de la laparotomías) y el índice de hernias incisionales, esta falta de aplicación de una técnica de uso común y prioritaria dificulta la evaluación de la eficiencia de las técnicas. En el caso de la laparotomía media, esta sigue siendo uno de los abordajes realizado con más frecuencia ya que permite un acceso adecuado con mínima afectación para el músculo, nervios, y grandes vasos. A pesar de estas ventajas, la línea alba es un punto débil de la pared abdominal y por tanto se requiere un cierre minucioso, en el que intervienen su éxito tanto el factor técnico, como el factor humano. Dentro del factor técnico tenemos el tipo de cierre. Este debería ser el que implique la menor tasa de complicaciones inmediatas (evisceración, infección de la herida) y tardías (eventración, granulomas).

Los diferentes tipos de cierres implican diferentes combinaciones de las diversas capas de la pared abdominal a saturar, influyendo en el riesgo de fracaso. Incluso el tipo de material de sutura podría influir en el éxito del cierre, como la relación entre la longitud de la sutura y la del trauma. Un primer efecto de una sutura deficiente es la dehiscencia de sutura (por realización defectuosa o infección) obliga a una nueva operación de forma inmediata, incrementando la probabilidad de la hernia incisional. Así mismo, la aparición infecciones, hematomas y seromas derivados del proceso quirúrgico, que pueden afectar al tejido en el desarrollo normal de su reparación, facilitarán la aparición de la hernia. En pacientes con hernias incisionales, el tamaño de defecto herniario y el número de recidivas contribuye determinante en la aparición. La dificultad de restaurar la capacidad de sostén de la pared abdominal es superada por el uso de prótesis, que reduce el número de

recidivas. A pesar de su efecto positivo la prótesis a su vez los problemas de infección, adhesión, seroma y dolor (por la reacción de cuerpo extraño), que impiden la resolución correcta de la reparación. Todas estas influencias técnicas (incisión, tipo de cierre y sutura) se ven a su vez magnificadas o salvadas por el factor humano. La pericia del cirujano determinará si al final toda la tecnología disponible para la reparación de la pared abdominal sea bien aprovechada. En algún estudio se ha podido comprobar que el grado de experiencia del cirujano contribuye a la aparición de dehiscencia. A pesar de que el uso de la laparoscopia, como de técnica mínimamente invasiva, parecía ofrecer una alternativa a la laparotomía, su incidencia de la hernia incisional se ha observado que puede llegar al 4% (13) (61).

1.3.1.2 Susceptibilidad del paciente

Durante el transcurso de décadas hasta hoy multitud de *factores de riesgo* han sido asociados en la génesis de la hernia incisional (Tabla 2). A pesar de esto no existen estudios que pongan de manifiesto la contribución discreta de cada uno estos en la génesis de la patología, existiendo un efecto combinado en la inducción de esta. Estos factores generales se pueden dividir en aquellos dependientes de la técnica quirúrgica y aquellos relacionados con el paciente. En el caso de los relacionados con el paciente, se indican tanto características demográficas, estado del paciente, como tratamientos farmacológicos y patologías asociadas (comorbilidades) (2; 76; 77).

Demográficos

La edad y el sexo son factores de riesgo en la mayoría de estudios. La atrofia de la pared abdominal, los cambios en el tejido conectivo y un deterioro en mecanismos de reparación tisular pueden estar relacionados con el aumento del riesgo de padecer una hernia incisional en pacientes de mayor edad. Si además durante la cirugía se produce alguna hemorragia la probabilidad de producirse la hernia se multiplica por 3 (78). Por otra parte, en distintos estudios se muestra un mayor riesgo en hombres que en mujeres, aunque se desconoce la causa. Se especula con la posibilidad de que el tabaco actúe como factor de confusión en series antiguas, o que los hombres experimenten mayor presión intraabdominal (11).

Patologías asociadas

Diferentes patologías pueden provocar un aumento de la presión intraabdominal, incrementando la tensión en la cicatriz de la laparotomía. Este tipo de afecciones muestran un incremento significativo en la incidencia de hernia incisional, como la enfermedad pulmonar crónica (EPOC), la obesidad (79; 80) o el íleo post-operatorio. En el caso de la obesidad aunque en algunos estudios no se han observado diferencias estadísticas, poniéndose en duda su contribución a las recurrencias (81), se acepta que está íntimamente relacionada con el riesgo de infección, que a su vez incrementa de forma significativa, hasta 5 veces, la probabilidad de aparición de una hernia incisional (12; 82). Otras situaciones como la diabetes (83) (84), las alteraciones hereditarias del tejido conectivo, la malnutrición, el cáncer, la anemia, o la ictericia (93), se acompañan de alteraciones en la cicatrización, justificando una mayor incidencia de hernia en estos pacientes. A pesar de que está descrito que

los pacientes afectados por diabetes tienen la capacidad de reparación de las heridas disminuida (77; 85), existe cierta controversia respecto a su influencia en la recurrencia de las hernias (86). La diabetes, al igual que otros de los factores mencionados que afectan a la reparación del tejido o asociados a aumentos intermitentes de la presión intra-abdominal, parece no impactar en el proceso de **recurrencia** de las hernias. Aunque en este caso muchos estudios realizados se caracterizan por estar repletos de sesgos y ser deficientes en poder estadístico, estos no parecen sugerir que las comorbilidades afecten significativamente a la recurrencia de la hernia incisional (2).

Una de las patologías más relacionada directamente es el aneurisma aórtico abdominal (AAA), describiéndose un riesgo significativo de desarrollar una hernia 3 veces superior en pacientes intervenidos por aneurisma comparado incluso con otras patologías de origen vascular. Aunque no se conocen exactamente los mecanismos que explican este mayor riesgo, el conocimiento de las bases celulares y moleculares de esta patología crece rápidamente, sobre todo respecto a la MEC y la respuesta inflamatoria, pudiendo servir como punto de partida para entender las de la hernia incisional (87; 88).

Factores exógenos

El tabaquismo ha sido reconocido como factor de riesgo significativo e independiente en la génesis y la recurrencia de la hernia incisional en diferentes estudios multivariados, describiéndose parte de su base molecular en algunos trabajos (11) y siendo a su vez un factor de riesgo en la AAA (89). Otros agentes externos que también influyen en el proceso de cicatrización, tales como los tratamientos con esteroides (79), quimioterapia (90) y radioterapia (91), también influirían en la aparición del proceso herniario.

Factores relacionados con la intervención

Existe evidencia de un mayor riesgo de desarrollo de hernia incisional significativo en factores relacionados con la intervención, como la utilización de incisiones previas, la infección y el carácter urgente de la intervención. Es sabido que la aparición de infecciones, hematomas y seromas derivados del proceso quirúrgico, que pueden afectar al tejido en el desarrollo normal de su reparación, facilitarán la aparición de la hernia. Por otra parte, en pacientes con hernias incisionales, el tamaño del defecto herniario y el número de recidivas contribuye de forma determinante en la aparición de otra hernia (77; 92).

Tabla 2. Factores generales descritos asociados al desarrollo de la hernia incisional (2; 76; 90).

Estado del paciente/comorbilidades	Técnica quirúrgica y particularidades
Género masculino	Cierre de la fascia
Edad avanzada	Continúa vs. discontinua
Obesidad	Sutura absorbible vs. permanente
Malnutrición	Relación longitud de la sutura radio de la trauma
Anemia	Uso de malla y tipo
Alcoholismo	
Tabaquismo	Localización de la incisión
	Hematoma /seroma post-operativo
Aneurisma aórtico abdominal	Tamaño del defecto fascial
Diabetes	Experiencia del cirujano
Patología obstructiva pulmonar crónica	Re-operación temprana
Patología Renal	Dehiscencia
Neoplasias malignas	Infección
Hemofilia o tratamiento anti-coagulante	
Hipertrofia benigna de próstata	
Tratamientos farmacológicos	
Esteroides	
Radioterapia	
Quimioterapia	
Transfusión de sangre	

1.3.1.2.1 Respuesta sistémica del organismo a la cirugía.

Independientemente de las comorbilidades, la cirugía abdominal es la que desencadena la aparición de la hernia incisional. La cirugía en sí misma una agresión (trauma) al paciente. *La respuesta temprana e innata del sistema inmune a este trauma es la **respuesta de fase aguda** (acute-phase response) que abarca diferentes respuestas pato-fisiológicas, tanto a nivel sistémico como local, como la pirexia, leucocitosis, alteraciones hormonales y metabólicas, y procesos de reparación. En él participan de forma coordinada también el sistema neuroendocrino y el central nervioso (con estructuras del sistema nervioso autónomo asociadas). Como parte de esta respuesta, se produce un aumento de ciertas proteínas plasmáticas secretadas mayoritariamente por el hígado llamadas **proteínas de fase aguda** (acute-phase proteins), inducida por las citoquinas generadas en el proceso inflamatorio. Linfocitos, monocitos y otras células del sistema inmune expresan receptores para neurotransmisores y neuropéptidos. De igual forma, en células neurales y en órganos endocrinos se identifican (en condiciones fisiológicas y de estrés) receptores para citoquinas derivadas de linfocitos. De este modo, los*

mediadores hormonales y neuropeptídicos definen los ejes de señalización hipotalámico-pituitario-adrenal, hipotalámico-pituitario-gonadal, hipotalámico-pituitario-tiroideo y el hipotalámico-hormonas de crecimiento, que interrelacionan los tres sistemas. Esta respuesta auto-limitada es capaz de controlar el daño en el tejido, eliminar células no funcionales e inducir los procesos de reparación para restablecer la funcionalidad del tejido. Si existen algún desequilibrio, esto puede llegar a generar una hiperactivación o supresión de la respuesta inmune no resolviéndose de forma adecuada el trauma (93- 97).

En las primeras posteriormente al trauma se produce rápidamente la infiltración de células inflamatorias. Los neutrófilos entre la 1-6 h y entre 24-48 h después los macrófagos. Este grupo de células inflamatorias inician la respuesta inmune secretando citoquinas pro-inflamatorias como IL6, IL1 β , IL8, TNF α , TGF β , e IFN γ de forma local, provocando respuestas a nivel local y sistémico. Como consecuencia se produce la activación (quimiotaxis) de leucocitos, fibroblastos, células endoteliales, que liberan e incrementan los niveles de citoquinas circulantes. El rápido y elevado incremento de citoquinas induce a los hepatocitos a sintetizar y secretar las **proteínas de fase aguda**, siendo principalmente reguladas por el TNF α , IL6 y IL1 β . La función principal de estas proteínas es la opsonización y secuestro de los agentes patógenos (también de sus componentes), activación del complemento, captura de componentes de células muertas, neutralización de enzimas, retirada de hemoglobina (Fe) y radicales, y la modulación de la repuesta inmune (primero la innata y después la adquirida) .De forma general las proteínas de fase aguda se pueden dividir en *positivas*, si aumentan en los niveles circulantes (proteína C reactiva o CRP, proteína serum amiloide A, *alpha-1 acid glycoprotein*), y *negativas*, si disminuyen (albúmina, transferrina) (Figura 15). A pesar de denominarse proteínas de fase aguda, las encontramos en situaciones de inflamación crónica, ya que el estímulo pro-inflamatorio se mantiene (ej. Artritis reumatoide). En este caso los niveles circulantes son menores comparados con aquellos de la respuesta de fase aguda. Desordenes metabólicos, como la obesidad, la diabetes tipo II, están asociados a inflamaciones crónicas baja intensidad (*chronic low-grade inflammation*) y la CRP, la proteína serum amiloide A, IL6 y TNF α son utilizados como indicadores también. De igual forma que se liberan proteínas de fase aguda con carácter pro-inflamatorio, se liberan citoquinas y proteínas de fase aguda para controlar y restringir la extensión de la respuesta inflamatoria (98-102).

Como parte de la respuesta sistémica existe también una **respuesta metabólica**, en la que el organismo reacciona de forma sistémica e instantánea para recuperar la homeostasis (evitar la pérdida del medio interno). Esto se consigue mediante la actuación del sistema nervioso central, el endocrino y el inmune. Los centros reguladores del sistema central y el autónomo reciben aferencias en diferentes niveles de su estructura - corteza cerebral motora, hipotálamo-neurohipófisis, hipotálamo-adenohipófisis, mesencéfalo, centros vasomotores bulbares, y reflejos de la médula ósea- alertando de la situación (103; 104).

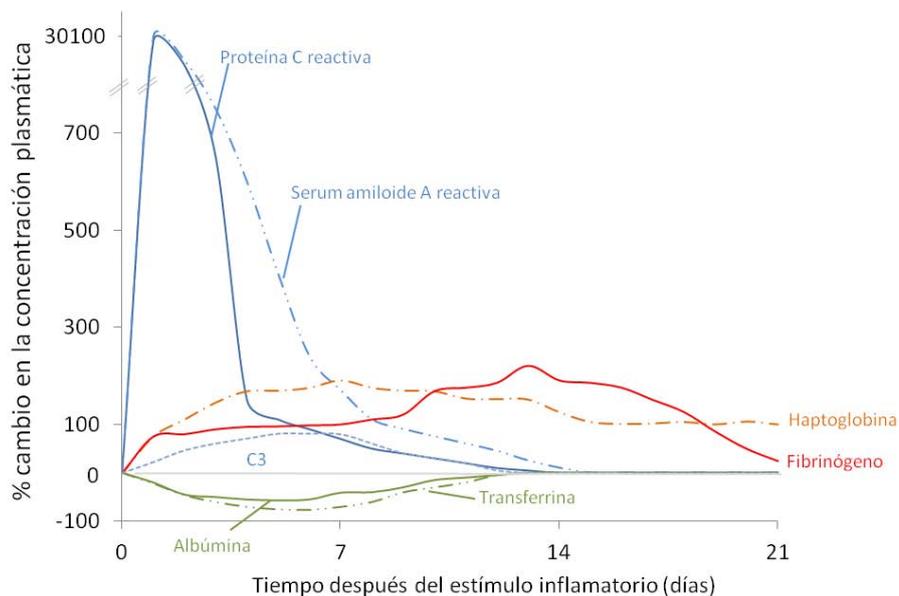


Figura 15. Cinética de la producción de las proteínas de fase aguda después de un estímulo inflamatorio moderado. Adaptado de Gabay C. (Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. 2006; 8 (Suppl 2:S3).

Simultáneamente, existe toda una respuesta metabólica para recuperar la homeóstasis fundamentada en una respuesta catabólica de estrés. El metabolismo anabólico basal disminuye, se incrementa el catabólico y aparece un hipermetabolismo. Si bien en condiciones fisiológicas normales la energía obtenida es mediante la oxidación aeróbica de carbohidratos y ácidos grasos, y proteínas son dirigidas hacia la síntesis de proteínas, en traumas importantes parte de esta proteína se destina a la producción de energía (incluso aquellas de vísceras y músculo esquelético). Estos cambios hormonales y metabólicos que comienzan en los primeros momentos del trauma se revierten en dos semanas, donde predomina el efecto de las hormonas anabólicas, iniciándose el proceso de reparación con síntesis de nuevos componentes de la masa magra del individuo (músculo, piel, vísceras) (105- 108).

1.3.1.2.2 Patologías-síndromes con similitudes con la hernia incisional

Algunas patologías o síndromes de carácter inflamatorio, podrían servir de base en las hipótesis que explicarían el inicio y desarrollo de la hernia incisional desde un punto de vista biológico. Aquí se describen tres: el aneurisma aórtico abdominal, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica-inmunosupresión, y las tendinopatías. En estas patologías la desregulación de la expresión de citoquinas y factores de crecimiento, incremento de la degradación de la MEC, estados de hipoxia, y generación de radicales libres participan de forma activa.

Aneurisma aórtico abdominal

El AAA es una de las patologías asociadas a la hernia abdominal (inguinal e incisional). Los pacientes que han sufrido una laparotomía media debida a una AAA tienen un riesgo aproximado 3 veces superior de desarrollar posoperativamente una hernia incisional comparados con los de aneurisma aortoiliaco. Se trata de una patología crónica degenerativa del tejido conectivo de la pared aórtica, donde se desarrolla un proceso proteolítico (inicialmente contra la elastina de la lámina media y posteriormente al colágeno de toda la pared), de carácter inflamatorio orquestada por el sistema inmune. Al igual que en la hernia incisional, (al menos en un sub grupo de pacientes donde aparece de forma tardana), los mecanismos que inician y amplifican la AAA son desconocidos, y no parece que existan factores genéticos asociados (mutaciones, polimorfismos). La infiltración de células inflamatorias, conjuntamente con la actividad de fibroblastos y células musculares lisas de la pared, desemboca en una reacción inflamatoria intensa que provoca un desequilibrio entre la actividad MMPs (sobretudo MMP2 y MMP 9) y TIMPs. El resultado final es una actividad proteolítica neta incrementada y la apoptosis de fibroblastos y células musculares lisas que son los encargados del mantenimiento de la MEC, con el consiguiente debilitamiento y aparición del aneurisma (87; 88; 109; 110). El hecho ser una patología silente en los primeros estadios ha hecho que se explore la presencia de biomarcadores para su diagnóstico y progresión, describiéndose en estudios transversales un incremento en plasma, entre otros, de la MMP9, el dímero-D y IL-6 (111).

Del mismo modo que en la AAA, la actividad proteolítica se encuentra exacerbada en la hernia incisional conduciendo a la pérdida de propiedades funcionales de la pared abdominal. La asociación y similitudes entre ambas patologías nos sugieren que muy probablemente exista un trasfondo biológico común en ellas. En este sentido, en nuestro grupo han descrito en las aponeurosis de pacientes con hernia incisional un incremento significativo en los ratios MMPs/TIMPs (observándose una actividad MMP 3/9 significativamente incrementada) (28). Lo más remarcable es que se produjo de forma concomitante con una desregulación de la vía de señalización inflamatoria, donde se existía una tendencia al incremento de la expresión de TNF α e IL6. Los dos hechos hacen plantear la hipótesis que la remodelación y destrucción de la MEC en los pacientes con hernia incisional estuviese ligada a la desregulación de la expresión de citoquinas, lo que favorecería un tipo de patología de inflamación crónica de baja intensidad (*chronic low grade inflammation*) (28).

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica: inmunosupresión

El sistema inmunitario también responde de forma particular delante de la cirugía. Hoy es aceptado de forma general que en los traumas graves (como la cirugía), hemorragias, quemaduras graves y procesos de sepsis, se puede generar el *síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica*, caracterizado por una *inmunosupresión pato-fisiológica*. En este síndrome, después de un trauma grave o cirugía mayor, se ven afectados de forma crítica el sistema inmune innato y adaptativo. En una primera fase del síndrome se produce una respuesta inflamatoria exacerbada (síndrome sistémico inflamatorio) mediado por el sistema inmune innato, seguido por una inmunosupresión (síndrome de respuesta antiinflamatorio compensatorio) guiada por

el sistema adaptativo inmune. El resultado final es la supresión de la inmunidad mediada por células, siendo un factor pronóstico desfavorable de la evolución de la herida del paciente y la aparición de infecciones, y en casos graves de sepsis. Esta supresión es el resultado combinado de niveles determinados de citoquinas circulantes y en los tejidos, excesiva activación y reclutamiento de neutrófilos, la no adecuada presencia de macrófagos reguladores con actividad anti-inflamatoria, la apoptosis de linfocitos en pacientes con sepsis, y el cambio de proporción de linfocitos T-helper (Th) Th1/Th2 hacia Th2 (y en especial los T reguladores), los cuales son unos potentes supresores de la respuesta innata y adaptativa del sistema inmune (97; 112- 117).

En este sentido, en el caso de la cirugía de la hernia incisional, con reparación primaria, se ha descrito un aumento significativo del recuento leucocitario y de neutrófilos, y una tendencia de los niveles de CRP/IL6 a ser superiores a los pre-operatorios una semana después de la intervención (118). También se ha descrito la disminución de linfocitos T_H1 colaboradores (119), al igual que en caso de la hernia inguinal (tanto disminución o cambió de subpoblación de linfocitos Th1/Th2) (120). Curiosamente en un estudio con pacientes que sobrellevaron una hernioplastia de Lichtenstein debido a una hernia inguinal unilateral, se demostró que los pacientes de más avanzada edad (82.4 ± 4.7) presentaban una respuesta inflamatoria más enérgica (hiperreactividad) y de más larga duración delante del estrés quirúrgico, que aquellos más jóvenes (51.8 ± 8.9). En la respuesta de fase aguda (48h después de la cirugía) de los pacientes más ancianos presentaban un recuento de neutrófilos más elevado, al igual que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias de TNF α , IL β 1, y CRP. Esto introduce a la edad como posible factor de incremento a la susceptibilidad de sufrir complicaciones post-operativas (121).

Existen también otros estudios donde se ha evaluado los niveles de citoquinas con carácter diagnóstico-pronóstico después la reparación herniaria. En uno de ellos un BMI elevado en los pacientes, con niveles pre-operatorios bajos de proteínas séricas/albumina y altos de IL1 β ra, podría predisponer a la formación de seroma (122). También se ha evaluado el drenaje de pacientes después de la reparación primaria observándose la típica respuesta pro-inflamatoria con niveles elevados de IL1 β , IL1 β ra, IL10, IL6 y b-FGF que decrecen a partir del 1er día después de la intervención (el seguimiento de los niveles fue realizado durante 4 días). En cambio los niveles de IFN γ y VEGF se elevaban a partir del 3er día de la operación (121). En todos los casos, esté desequilibrio inicial en la respuesta inflamatoria podría impedir una correcta regulación de la función de los fibroblastos en fases posteriores y de la reparación de la pared abdominal.

Posibles similitudes con otros tejidos conectivos densos: Tendinopatías

A pesar de no tratarse de una patología asociada a la hernia incisional, las características del tendón como tejido conectivo denso y su función estructural nos podrían facilitar un punto de partida para encontrar similitudes con el proceso que sufre la aponeurosi de los pacientes con hernia incisional. Tanto un tejido como otro se pueden encontrar sometidos a un sobreesfuerzo mecánico en condiciones límite (por intensidad y/o

duración), laceraciones o cortes quirúrgicos, y cuando se produce el daño tisular la recuperación de ambos pasa ineludiblemente por la intervención del sistema inmune a través de un proceso inflamatorio agudo inicial.

Estos últimos 10 años, el estudio de las tendinopatías ha mostrado un cambio en el paradigma de la necesaria presencia de un infiltrado celular inflamatorio para ejercer una acción deletérea sobre el tejido donde actúa. De forma habitual, hasta ahora, se hacía referencia a la *tendinitis* como un proceso inflamatorio con una sintomatología de dolor crónico. Sin embargo los diversos tratamientos antiinflamatorios existentes no han tenido la capacidad para controlar dichos procesos, mostrando los estudios histológicos de muestras humanas lesiones degenerativas, sin inflamación aparente o mínima. Debido a esto, el concepto de tendinitis ha ido siendo abandonado por el de tendinopatía, y cobra fuerza la hipótesis de que el tendón puede sufrir procesos inflamatorios (*tendinitis*) y degenerativos (*tendinosis*) secuenciales, o coexistentes (123; 124). Así, se pueden dividir las tendinopatías en: tendinitis agudas; tendinitis agudas seguidas por una tendinosis crónica; y tendinosis crónicas. El primer tipo suele responder a procesos de laceración/incisión quirúrgica o esfuerzo puntual, mientras que los otros dos a fenómenos de sobrecarga o esfuerzo continuo. Un hecho muy importante a considerar es con frecuencia la tendinopatía tiene una fase silente (sin dolor) que es difícil de diagnosticar, dificultando el diagnóstico y pronóstico de la patología (125), al igual que en muchos casos de hernia incisional.

Al igual que en la patología de la hernia incisional, existen estudios epidemiológicos que demuestran la existencia de factores extrínsecos e intrínsecos asociados a las tendinopatías por sobrecarga del tendón. Entre los extrínsecos podemos describir, la sobrecarga en actividades como el deporte y la vida laboral, errores en la metodología en el entrenamiento deportivo y la fatiga. Otros factores de tipo físico/químico pueden ser las condiciones ambientales adversas, el uso de drogas como antibióticos, estatinas y corticoesteroides. Por lo que hace referencia a factores intrínsecos, se asocian patologías endocrino-metabólicas (obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipidemia, hiperuricemia, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo), infecciosas, renales (fallo renal crónico), como inflamatorias (psoriasis, lupus eritematoso sistémico). El envejecimiento también es un factor de riesgo en sí mismo. Al progresar la edad se produce una reducción del flujo arterial, resultando en una hipoxia local, generación de radicales libres, y un metabolismo/nutrición deficientes que genera una condensación no enzimática de la glucosa y sacáridos reductores no utilizados en los grupos aminos del colágeno, dándose una acumulación de glicanos o *advanced glycation end products (AGEs)* (común en pacientes con diabetes). Esta glicosilación provoca que los tendones se vuelvan más rígidos y con menos capacidad de resistencia a tensiones. Estos *AGEs* modulan la actividad de los fibroblastos y células endoteliales mediante receptores de membrana, mediando señales de proliferación y/o apoptosis, y la secreción de factores de crecimiento (126; 127).

Respecto a la histología, las zonas en donde se observan procesos inflamatorios y procesos degenerativos se encuentran a menudo colindantes, y no de forma aislada. Los tendones afectados muestran una estructura intratendinosa poco definida, perdiéndose la estructura típica del tendón mostrándose amorfa. El 90% de la

muestras biopsiadas de zonas sintomáticas de pacientes presentan cambios histológicos degenerativos (hipóxicos, hialinos, mucoides, fibrinoides y inclusiones de tejido adiposo). Curiosamente, la celularidad del tejido no es homogénea. En unas se encuentra incrementada, y en otras se pueden encontrar áreas con ninguna o pocas células con núcleos picnóticos. Las fibras de colágeno se encuentran comúnmente desunidas y con depósitos de GAGs y glicoproteínas (mucoide), entre ellas. Al igual que en la hernia incisional, los pacientes afectados presentan un mayor porcentaje de colágeno III, el cual es deficiente en número de uniones entre si y dentro del tropocolágeno. Algunos tipos de tendones presentan neovascularización, relacionándose de forma positiva con los pacientes que sufren dolor. Sorprendentemente parte/combinaciones de estas características también se pueden observar en la población aparentemente en la población no afectada (menor de 35 años asintomáticos). Por lo que hace referencia a la zona peritendinosa se observan con frecuencia cambios que están más presentes en tendones con vaina sinovial. Al igual que en el área intratendinosa, en la fase aguda de la patología se presentan zonas con infiltrado inflamatorio (con fibroblastos proliferantes en el exudado), concomitante con zonas degenerativas Posteriormente en la fase crónica se observa un engrosamiento del tejido con la presencia de fibroblastos y miofibroblastos remodelando el tejido (126; 127) .

Está perfectamente documentado y descrito que el ejercicio realizado de forma correcta, y de larga duración, en condiciones fisiológicas, refuerza el tendón. Durante el entrenamiento y/o ejercicio se adapta bioquímicamente liberando factores de crecimiento y hormonas inflamatorias de forma local y sistémica. Está liberación permite la remodelación y crecimiento de las fibras. En cambio si se produce una sobrecarga del tendón (por exceso y/o duración), las fibras de colágeno comienzan a desunirse, dándose a lugar microtraumas, perdiendo el tejido su estructura funcional. Si se permite la recuperación en un tiempo adecuado se conseguirá volver al estado inicial previo al microtrauma bajo unas condiciones óptimas de irrigación sanguínea. Por el contrario si se repite de forma persistente la generación de microtraumas/microrupturas, la capacidad de recuperación podría ser excedida, con el consiguiente daño a la vascularización. La extensión de las microrupturas (área y frecuencia) en el tejido, conjuntamente con el daño vascular, son los elementos que parecen detonar la tendinopatía (126; 127) . *Michele Abate et al.* (123) proponen la hipótesis (“*Iceberg Theory*”) que en condiciones de anoxia los mecanismos de reparación se activan para reparar el tejido (MMPs, ADAMTS, NOS, GDFs and Scx), pero al mismo tiempo se genera una reacción sobreestimada inflamatoria que daña el tejido. Esta es ejercida por la sobreexpresión de MMP-3, citoquinas y hormonas pro-inflamatorias (VEFG, PDGF, leucotrienos y PGE2). De hecho la hipoxia regula la sobreexpresión de VEGF (vía *hypoxia-inducible factor 1; HIF1*) que a su vez induce la expresión de MMPs y la infraexpresión de TIMP-3. El efecto final es el debilitamiento de la estructura y función del tendón, iniciándose la neoangiogénesis. Acompañando está neoangiogénesis, se produce la proliferación de nervios que determina de forma histológica el paso de la fase asintomática a la sintomática de la tendinopatía. En esta fase los niveles locales de glutamato pueden elevarse de forma muy pronunciada promoviendo la apoptosis de las células de tejido. Durante la proliferación se liberan los neuropéptidos *substance P (SP)* y *calcitonin gene-related peptide (CGRP)* por mastocitos cercanos, además de mediadores celulares (histamina, prostaglandinas, y leucotrienos), regulando la actividad de los fibroblastos y la permeabilidad vascular. Según los autores, esta la liberación podría generar un proceso de

inflamatorio de origen neurogénico. Esta hipótesis o teoría descrita por estos autores explicaría la aparición de los síntomas después de una recuperación no adecuada, de forma que aunque no existiese dolor, la estructura intratendinosa se encontraría dañada. Al mismo tiempo explicaría como se podría producir una ruptura del tendón con signos evidentes de degeneración sin dolor aparente. Esta forma silente de desarrollo de la tendinopatía sugeriría similitudes con la hernia incisional, que podría darse antes de la incisión (debido al efecto deletéreo de las patologías asociadas y a otros factores biológicos) y después.

1.3.2 Nuevos escenarios: ¿Hacia una biología de la hernia incisional?

Como ya hemos indicado previamente, la historia de la investigación sobre la hernia incisional se ha centrado casi íntegramente en resolver la preocupación necesaria y primaria del cierre de la pared abdominal, sin profundizar en los mecanismos biológicos silentes que predisponen al paciente al desarrollarla después de la cirugía. Independiente del factor técnico de la cirugía, la aparición y desarrollo de la hernia incisional es multifactorial asociándose a multitud de patologías o situaciones adversas. En su conjunto, todas ellas tienen el nexo común de que pueden inducir un efecto deletéreo sobre la pared abdominal: anoxia, desnutrición, inflamación, alteración de la dinámica de la ME. Esto supondría un esfuerzo adicional a los mecanismos de reparación del organismo después de la cirugía. Los factores que pueden afectar a la reparación del tejido son tanto sistémicos como locales, pero al final recaen sobre la fascia y el músculo de la pared abdominal. Esto sugiere que características no patológicas (o silentes) propias de la pared abdominal podrían habilitar la aparición de la hernia incisional después de la cirugía. Esta hipótesis tiene su mayor base, en un subgrupo de pacientes sin defectos previos en la cicatrización, o con antecedentes familiares, que desarrolla la patología al cabo de diversos años. Evidentemente, en aquellas hernias incisionales que aparecen de forma rápida, el componente multifactorial hace difícil establecer que factores han podido contribuir de forma significativa y la magnitud de la incidencia, e incluso si son o no de tipo técnico.

El enfoque que se ha seguido hasta ahora es asociar la hernia incisional a una determinada patología o situación de estrés, para evaluar el riesgo asociado de su aparición. Quizás se tendría que cambiar el foco de atención y situarlo dentro del tejido, a nivel celular y molecular (biológico), para entender el origen y desarrollo de la patología. Si al final todos los efectos nocivos de los factores asociados y características propias del paciente transcurren en el tejido, es razonable pensar que los mismo actores a nivel celular y molecular (fibroblasto, respuesta inflamatoria, mecanotransducción) deben estar operando de forma similar. Esto suprimiría el ruido de fondo (el origen multifactorial) que no nos permite observar el origen biológico de la hernia, y sobre todo en qué medida colaboran de forma característica los diversos factores (patologías asociadas) a nivel molecular. Por extensión, la investigación en el campo de la hernia podría ser aplicada a aquellas patologías a las que en un primer momento se las asoció, y de las cuales se desconocían los mecanismos celulares y moleculares por las que actuaban en la pared abdominal y en otros tejidos.

El foco nuevo de estudio, por tanto, se centraría en el fibroblasto y su microentorno tisular, en el que se caracterizarían tanto la célula como la MEC, y los mecanismos de regulación bidireccional entre los dos. Si bien se han estudiado ciertos actores a nivel celular y molecular en la hernia incisional (estudios en fibroblastos, MMPs, colágeno, citoquinas), para la comprensión global del sistema biológico de la pared abdominal se requerirían disciplinas de las ómicas (i.e genómica, transcriptómica, proteómica). Los resultados obtenidos revertirían directamente en el diseño de nuevas prótesis o *biological scaffolds* más eficientes en la reparación. Además la revelación de los mecanismos podría habilitar métodos de diagnóstico, para la utilización preventiva, por ejemplo, de prótesis. En estas nuevas aproximaciones el estudio del músculo debería ganar más importancia, por ejercer la mayor parte de la fuerza en la pared abdominal. Su características más dinámicas en los procesos regenerativos y inflamatorios, sugiere también un papel crucial en el inicio y perpetuación de la patología.

1.4 Tratamiento actual

El objetivo de cualquier tratamiento de la hernia es restablecer la continuidad y funcionalidad de la pared abdominal. La solución más empleada a la actual (previa a los años 60) era la reconstrucción anatómica por simple sutura de aproximación (o *rafias*). En está, el cirujano hacía una incisión en la pared abdominal (en la zona afectada por la hernia), recolocaba la víscera en su posición normal dentro de la cavidad y por último suturaba la abertura. Esta sutura creaba una distorsión de las fibras musculares, una elevada tensión, lo cual causaba dolor y un período de recuperación más largo. La tensión en la cicatriz podía llegar a provocar la isquemia del tejido y *dehiscencia* de la herida (apertura espontánea de la cicatriz después de la sutura), además de dar lugar a un índice de recurrencia muy elevado. Más tarde surgieron técnicas de auto-plastia (i.e fascia, músculo y piel), con el objetivo de eliminar la tensión que ofrecían las rafias, que solían desembocar en fracaso (4). De este modo, los inconvenientes técnicos condujeron al cambio de la opción de reconstrucción anatómica por la de sustitución sin tensión de la zona afectada mediante materiales protésicos (material de elevada biocompatibilidad y funcionalidad), que ofrecían una continuidad en la pared, evitando distorsionar la anatomía. Este cambio de cómo abordar la reparación se inició por O. Witzel en 1900 (128) y fue instaurado por Francis C. Usher en 1963. Esto facilitó la reconstrucción de los defectos con unas suturas libres de tensión (129;130; 131).

Desde los años 80 el polipropileno, el poliéster y el politetrafluoroetileno, y sus posteriores modificaciones, han llegado a ser los materiales protésicos (mallas o parches) de uso más común en la cirugía de la pared abdominal. Los tres poseen una buena capacidad de integración en el paciente sin perder su resistencia estructural, pero con diferencias condicionadas a su estructura y composición. Las modificaciones posteriores han mejorado aspectos de biocompatibilidad y han explorado la biodegradabilidad (132; 133). La aplicación de las prótesis y el desarrollo de la técnica laparoscópica desde los años 90 han permitido el abordaje de cualquier área dañada simplificando sensiblemente la reparación (134). A pesar de ello, la restauración óptima está todavía por llegar con una tasa de recidivas elevada dependiendo de la complejidad de los casos, complicaciones asociadas a la cirugía, y sin olvidar tampoco la funcionalidad disminuida de la pared abdominal resultante (2). Diferentes esfuerzos se han realizado para poder sistematizar el tratamiento de las hernias incisionales con el objetivo de mejorar los resultados, tanto en el sentido de recoger la información de forma correcta y apropiada para poder analizarla, como en el sentido de poder aplicar un diagrama de actuación claro y definido. Uno de los más recientes es el realizado por *The ventral Hernia Working Group* formado por investigadores de diferentes centros de investigación de los Estados Unidos. Este grupo de trabajo propuso un sistema de clasificación de pacientes según el grado de gravedad basado en los factores de riesgos del paciente y de la herida. Esto permitiría al cirujano seleccionar la técnica quirúrgica y los materiales más adecuados para el tratamiento (135).

1.4.1 Manejo de la hernia incisional

En la actualidad la mayoría de las hernias incisionales se reparan mediante cirugía, incluso cuando son asintomáticas (en ciertos casos). La elección de la cirugía se aconseja cuando son hernias sintomáticas, tienen posibilidades de incarceration (aprimamiento de los órganos internos con posterior estrangulación y/u obstrucción intestinal), o porque por su gran tamaño puedan generar problemas en las actividades cotidianas. El tratamiento no quirúrgico (i.e fajas ortopédicas) se encuentra asociado a una gran incidencia de incarceraciones, que conllevan obstrucciones intestinales, estrangulaciones, y elevada mortalidad; sin embargo, puede ser el tratamiento de elección (con un seguimiento adecuado) en los casos en que el paciente presenta comorbilidades significativas o una hernia estable asintomática de pequeño tamaño. En este supuesto, el equipo médico realiza un análisis riesgo/beneficio de la reparación quirúrgica considerando la mortalidad asociada a la reparación electiva, la posibilidad de recurrencia, la de incarceration, y la esperanza de vida del paciente (2; 136; 137).

1.4.2 Evaluación del paciente y preparación pre-operativa

Los pacientes con hernia incisional presentan con más frecuencia incomodidad y malestar que en las demás hernias abdominales. La mayoría de pacientes se caracterizan por presentar síntomas crónicos que los dirigen a una evaluación electiva. Al menos un 25% presentan incarceraciones de diferente grado y una incidencia de estrangulaciones del 1%. El enfoque o acción terapéutica resigue un protocolo que considera una serie de variables (136; 138;139):

a) Estado general del paciente (estado nutricional, actividad profesional), edad, sexo, patologías asociadas (diabetes, obesidad, trastornos cardiorespiratorios) y tratamientos farmacológicos (corticosteroides, quimioterapia)

b) Ubicación topográfica, volumen del saco herniario, tamaño y estado del orificio de este (fibrosis, rigidez, forma)

c) Presencia de una hernia multirrecidivada

La preparación pre-operatoria aconseja, cuando la hernia abdominal es compleja o el examen clínico es considerado no suficientemente concluyente (particularmente en hernias recurrentes con múltiples defectos), el análisis de las imágenes realizadas por tomografía computarizada. Esta facilita la delimitación de las capas de la pared abdominal y cualquier defecto presente. Así también, algunos autores sugieren la administración de antibióticos de forma profiláctica, sobre todo con el uso de materiales protésicos, aunque no se han realizado todavía estudios aleatorios controlados que demuestren su utilidad. En ciertas circunstancias el paciente es sometido a una preparación pre-operatoria que puede implicar la pérdida de peso y fisioterapia respiratoria con el objetivo de conseguir un resultado final óptimo. Las dehiscencias se resuelven con diferentes técnicas y con suturas absorbibles o/y mallas (140; 141). En este sentido, el uso preventivo de mallas para evitar el

proceso herniario en pacientes con factores de riesgo asociados se encuentra en debate (142), como es el caso del aneurisma aórtico abdominal (143). En este sentido, y como se comentará más adelante, el uso preventivo de mallas para evitar el proceso herniario en pacientes con factores de riesgo asociados se encuentra en debate (142), como es el caso del aneurisma aórtico abdominal (143).

1.4.3 Técnica operatoria y abordajes

La intención de la técnica operatoria debería ser restablecer la funcionalidad de la pared abdominal y obtener una auténtica reparación dinámica sin una tensión excesiva o inadecuada. La pared abdominal es una estructura de soporte y reacciona dinámicamente a las fuerzas externas e internas. Una tensión no suficiente ocasiona una separación de los límites de la herida y una pobre organización del colágeno en la incisión. Por el contrario, una tensión excesiva conduce a isquemia y a una dehiscencia de la herida. Por tanto, una tensión fisiológica adecuada, nos sitúa entre estos dos límites con un resultado óptimo. De forma general el plan de reparación sigue las siguientes pautas comunes independientemente de la técnica operatoria (136):

- a) Diseño o planificación de la aproximación técnica dependiendo del tamaño de la hernia*
- b) Aislamiento del saco herniario y liberación de su contenido con adhesiolisis completa*
- c) Comprobación, desde la vertiente intraperitoneal, de la existencia de orificios secundarios o satélites al orificio principal herniario*
- d) Retirada de las suturas previas si son hernias multirrecidivada con comprobación bacteriológica mediante cultivo*
- e) Refrescamiento (limpieza) de los límites del orificio herniario*
- f) Reparación del defecto con cierre del orificio herniario*

Para este esquema de actuación, las técnicas actuales se podrían dividir de forma general en dos grupos: las técnicas basadas en la autoplastia y las basadas en el uso de materiales protésicos. A su vez también se las podría clasificar en técnicas de cierre con tensión y sin tensión. De la intersección de las dos clasificaciones aparecen los tratamientos que se emplean en estos momentos (144; 131):

- a) Cierre primario o reparación primaria.*
- b) Técnica abiertas (ej. Laparotomía media) con el uso de materiales protésicos/mallas*
- c) Técnica laparoscópica con el uso de materiales protésicos/mallas*
- d) Técnica de separación de partes (components' separation technique) (autoplastia de la propia fascia-musculo sin tensión, indicada en grandes reparaciones)*

1.4.4 Prótesis: la evolución durante el siglo XX hacia los biomateriales

Aunque los estudios y aplicaciones de prótesis se iniciaron con las prótesis de carácter metálico al inicio del s.XX (sobre todo con gasas de tantalio, usadas de forma habitual), su uso ha quedado reducido especialmente en aquellas situaciones de infección. Este tipo de material protésico provocaba una reacción inflamatoria elevada que las hacía poco biocompatibles, a pesar de estar caracterizadas por su buena resistencia mecánica y permanencia. Así, se planteó la necesidad de encontrar un material no metálico que fuese permanente, pudiese tener una función de refuerzo-sustitución, fuese estable delante de infección y que la respuesta inflamatoria fuese reducida (145-148).

Poco después de la segunda mundial (1948) el avance en la síntesis de polímeros ofreció una nueva oportunidad para el diseño de nuevos materiales protésicos sintéticos. Pero nos tenemos que situar ya en 1958 cuando Usher publica su técnica de reparación usando una malla de polipropileno, o con los estudios Koontz y Kimberly, para poder observar los primeros avances en las prótesis no metálicas. Sucesivamente, en estudios pre-clínicos en animales, se fueron estudiando otros materiales como la tela de Orlon (poliacrilonitrilo), la tela de Dacron (poliester), la fibra de vidrio, la tela de Fortisan (celulosa) (149), la tela de nylon (150), la esponja de polivinilo (*Ivalon*: polímero de alcohol polivinílico, con formaldehído) (151) (152) y polímeros de silicio (*Silastic*) (153). El resultado final fue la selección de tres tipos de mallas sintéticas no-reabsorbibles, que son empleadas todavía hoy en día. Estas son: la prótesis de poliester (*Mersilene*®, *Dacron*®), la prótesis de polipropileno (*Marlex*®), y la prótesis de politetrafluoroetileno expandido o ePTFE (*Soft TissuePatch*®; *MycroMesh*®; *DualMesh*®).

La aplicación clínica general de las mallas empieza durante los años 50 con la utilización de la tela de *Dacron*® comercial y la mallas de polipropileno *Marlex*® en la reparación de hernias inguinales y ventrales. La tela de *Dacron*® fue la primera malla no metálica de uso clínico que ofreció resultados esperanzadores ya que la cicatrización de las heridas se realizaba sin grandes complicaciones, además de aportar resistencia desde el inicio (154). Su eficacia fue reconocida más tarde en la década de los 80 y 90 por Stoppa (155) y Wantz respectivamente (156). A pesar de esto, su uso fue y ha ido decreciendo en favor de la malla más eficiente de polipropileno. Usher, por su parte, fabricó, desarrolló e introdujo la prótesis de polipropileno o *Marlex*®, que debido a sus ventajas (sobre todo a su flexibilidad e integridad), extendió su uso con facilidad desplazando a las prótesis metálicas (157) (158) (159). El mismo Usher mejoró la primera versión en 1963, diseñando una red tejida de fibra de monofilamento de polipropileno que se comercializa hasta nuestros días como *Marlex*® (160). Durante el transcurso de casi 3 décadas los buenos resultados en la reparación de la hernia con la prótesis *Marlex*®, con una eficiente respuesta en presencia de infección, fueron reconocidos en los estudios de Peacock (161) y Lichtenstein publicados en 1989 en *The American Journal of Surgery* (162). La aplicación de este tipo de malla ha ido creciendo desde ese momento con el desarrollo de nuevas técnicas que han permitido el abordaje de grandes hernias incisionales, con conservación del peritoneo entre los órganos y la prótesis. También el número de recidivas se ha reducido con un pequeño porcentaje de infecciones que no requieren la eliminación de

la prótesis (163) (164) (165). El uso habitual del *politetrafluoroetileno (PTFE)* fue posterior. Aunque ya se había utilizado con anterioridad, no fue hasta 1963 con Oshige quien describió un proceso para expandirlo mejorando su resistencia mecánica, dando lugar al *ePTFE* (166). Gore mejoro esta técnica y se aplicó primeramente de forma clínica en prótesis vasculares, para posteriormente ampliar su aplicación (en forma de hojas micro porosas) en la reparación de hernias y otros defectos de tejidos blandos (167; 168). A través de la denominación comercial de *Soft TissuePatch*[®], se introdujo clínicamente por primera vez en 1983 (169). Esta prótesis ofrecía una resistencia comparable a las de poliéster y polipropileno. Más tarde se realizaron modificaciones comercializándose como *MycroMesh*[®] (incorporando macroporos, mejorando la integración tejido-prótesis) y *DualMesh*[®] (incorporando una capa no porosa para evitar adherencias con las vísceras). Los resultados obtenidos en trabajos clínicos, ya a mediados de los años 80, destacaron su alta capacidad como prótesis (sobre todo las disminución de adherencias) (170) (171) (172), que continuaron durante la década de los años 90, confirmándolo (173) (174) (175).

1.4.4.1 Biomateriales

Los inconvenientes encontrados con los materiales sintéticos no-reabsorbibles, sobretodo en el aspecto de la integración, llevó al desarrollo en los años 80 de los llamados **biomateriales**. Estos biomateriales, idealmente, conseguirían una integración y reparación óptima, sin alterar los tejidos del paciente ni su calidad de vida. Dos tipos de biomateriales empleados en mallas son el ácido poliglicólico (*Dexon*[®]) y la poliglactina 910 (*Vicryl*[®]). Su primera aplicación fue como material de sutura que se absorbía lentamente, y dado del éxito, se abordó su uso como prótesis. La malla de *Dexon*[®] está formada por fibras trenzadas de ácido poliglicólico, dando lugar a una red elástica, blanda, distensible y biodegradable. Por el contrario, el *Vicryl*[®], es una tela fina tejida de forma compacta que no es elástica. Las características de ambos (excesiva y poca elasticidad, respectivamente) hacen que no deban utilizarse como prótesis única en la reparación de las hernias abdominales.

A partir del año 2000, las investigaciones sobre materiales no-sintéticos, ofrecieron la matriz de colágeno dérmica acelular (de origen humano o porcino, *Alloderm*[®] o *Permacol*[®]) o la matriz porcina de colágeno acelular de la submucosa del intestino delgado (*Surgiris*[®]) para la reparación de tejidos blandos. Estas matrices también denominados **implantes biológicos derivados de la MEC (IBMEC)** tiene la gran ventaja de promover el crecimiento celular dentro de ellas y la revascularización (debido a su similitud con los tejidos adyacentes), evitando las infecciones, y llegando a integrarse en el cuerpo del paciente durante el proceso de remodelación. Al mismo tiempo, reducen la posibilidad de inflamación crónica, la formación del tejido denso fibroso y la formación de adherencias. En resumen, presentan una posible mejor biocompatibilidad. Respecto al origen, los IBMEC derivan de tejidos de mamíferos (dermis, pericardio, submucosa de intestino delgado), con una estructura de soporte de colágeno. Un aspecto que se debe señalar es que el origen (conjuntamente con la edad del donante) influye en la composición del implante, tanto de proteoglicanos como y de diferentes tipos de colágenos, afectando las propiedades mecánicas, el tamaño y grosor del implante. Para poder obtener estos implantes se deben eliminar las células de ellos, de forma ligera, manteniendo gran parte de la diversidad de las biomoléculas, o extensa, en la que solo queda básicamente el colágeno. Además, para estabilizar esta

matriz o andamio de colágeno, se realiza un *crosslink* químico (ej. glutaraldehído, hexametildisocianato) entre las moléculas para poder evitar la degradación *in vivo*. Por último, los diferentes modos de elaboración hacen que la respuesta biológica del tejido del paciente también pueda ser diferente, tanto por las características mecánicas (que van variando con el tiempo), como biológicas de interacción implante-huésped. La evolución de las IBMEC a lo largo plazo todavía no se ha podido definir de forma concluyente, ni tampoco cómo afecta al estado final del tejido. En todo caso, su uso queda, hoy por hoy, circunscrito a situaciones en donde la utilización de prótesis sintéticas esté desaconsejado, como es el caso de cirugías sépticas o contaminadas, o pacientes inmunodeprimidos. Esto es debido a que la resistencia mecánica disminuye rápidamente y a su elevado coste, de manera que normalmente se utiliza material sintético absorbible como el Vicryl® (61) (176) (177) (178). A pesar de estos inconvenientes, se están realizando grandes esfuerzos en el diseño de IBMEC.

La dificultad de elección de una malla de características ideales fue el desencadenante del desarrollo de las mallas compuestas por más de un material o *composites*, en la última década del s.XX. La mayor ventaja de estos materiales es que pueden ser aplicados en el espacio intraperitoneal por su bajo índice de adherencias. La mayoría de estos *composites* continúan usando los materiales básicos anteriores sintéticos no-absorbibles - polipropileno, polyester, ePTFE- pero además se combinan con otros tales como titanio, omega 3, Monocril®, PVDF y ácido hialurónico. En los apartados siguientes la descripción de las características y comportamiento de la mallas se centra básicamente en aquellas sintéticas, que son las que de forma clara la elección mayoritaria en la cirugía abdominal

1.4.5 Características de las prótesis y aplicaciones

El objetivo del uso de las mallas en su inicio fue bastante simple: la malla era un material que podía ser usado como refuerzo de la pared abdominal con la formación del tejido de cicatrización. Por tanto, era de esperar que aquellas con una resistencia mecánica más elevada y con una capacidad elevada de generar una buena *respuesta de cuerpo extraño (RCE)*, y por tanto de fibrosis, fuesen consideradas las mejores. Más tarde se fue comprobando que la reacción fibrótica generaba dolor y restricción de movimientos, y que esta se debía limitar. De hecho, la resistencia mecánica o tensil de las mallas, necesaria para soportar la presión abdominal máxima, es una décima parte de la que pueden llegar a alcanzar. Por tanto, se llegó a la conclusión de que quizás con menos material prostético/malla se generaría una función de soporte correcta pero sin generar una fibrosis tan pronunciada. En este punto, se consideró el hecho de introducir mallas de ligeras o de peso menor (*light-weight meshes*) en el tratamiento de la hernia incisional en 1998 con las mallas Vypro®. Hoy en día se asume las mejores prestaciones de este tipo de malla respecto a las más pesadas *heavy-weight meshes* (133; 179; 65).

El diseño de la malla actual, composición y estructura, se basa en la **biocompatibilidad**, idea que introduce un nuevo concepto: **el biomaterial**. Según la definición de Williams (1990), se consideran biomateriales *aquellos*

materiales de origen natural o sintético que tienen como finalidad conseguir una función específica en el organismo humano, reemplazando o reforzando parcial o totalmente tejidos dañados (180). Así el requerimiento principal del biomaterial debe ser su biocompatibilidad, a partir de la cual se podrá generar una buena funcionalidad de la misma. Un claro ejemplo de cuando un material no es biocompatible es el ataque del sistema inmune en la RCE, pudiéndose producir una respuesta local (que afecta a la zona circundante e inflama los tejidos adyacentes), o bien una respuesta sistémica (pudiendo llegar a afectar a otros órganos del cuerpo) (181). Los criterios de selección que debería cumplir un material protésico eficiente han ido evolucionando desde los años 50, cuando Cumberland y Scales enumeraron los 8 primeros iniciales, hasta hoy, cuando Ponka y Greenstein (182) (183) (184) los ampliaron (Tabla 3). El criterio de elección también dependerá su finalidad: si es como sustituto funcional de la pared o como simple refuerzo tras el cierre de la hernia y del tipo de qué se trate. Así, el biomaterial debería poseer unas características adecuadas para cada determinada situación. La realidad es, sin embargo, que no existe de momento el biomaterial ideal y que debemos escoger aquel que se adapte mejor a las necesidades requeridas. Además de la elección del biomaterial como sustituto de la pared abdominal, el futuro diseño de los biomateriales debería contemplar la interacción activa y positiva en el rescate de la pared de los pacientes afectada a nivel celular y molecular. Esto comportaría la acción sobre el fibroblasto y demás células residentes con la finalidad de dirigir su fenotipo hacia una reparación adecuada.

Tabla 3. Criterios para la elección del biomaterial (182; 183; 184)

1. *No ser físicamente modificado por los fluidos receptores*
2. *Ser químicamente inerte*
3. *No despertar una reacción inflamatoria o de cuerpo extraño*
4. *No ser carcinógeno*
5. *No producir un estado de alergia o hipersensibilidad*
6. *Ser capaz de resistir tensiones mecánicas*
7. *Poder ser fabricado en la forma requerida*
8. *Poder ser esterilizado*
9. *Ser poroso*
10. *Ser flexibles y fácilmente manejables*
11. *Coste económico no muy elevado*
12. *Buen comportamiento ante la infección*
13. *Buen comportamiento en contacto con las vísceras abdominales*

1.4.5.1 Estructura, propiedades y biocompatibilidad

Las mallas pueden estar constituidas por monofilamentos, multifilamentos (entrelazados) o láminas (ej. ePTFE). El tamaño del poro, el peso y la composición determinarán las propiedades y las posibles aplicaciones. La presión intra-abdominal generada al toser o saltar en un adulto suele situarse alrededor de 170 mmHg. Luego las mallas usadas en reparaciones de grandes hernias deberían soportar al menos 180 mmHg antes de ceder a tal presión. Esto no es un problema para las mallas utilizadas actualmente. Así, las de bajo peso pueden llegar a soportar presiones hasta 360 mmHg sin llegar a romperse. Por lo que hace referencia a la reacción del cuerpo extraño, la porosidad es el mayor factor a considerar. Los poros deben ser de más de 75 μm para permitir la infiltración de macrófagos, vasos sanguíneos, fibroblastos y la deposición de colágeno. Las mallas con mayores poros permiten un mayor crecimiento del tejido blando y son más flexibles debido a la falta de formación de puentes entre los granulomas (nódulos inflamatorios) creados en torno a los filamentos de las mallas durante la RCE. El engrosamiento, por causa del granuloma, de las fibras de la malla puede llegar a ser confluyente con las adyacentes, generando una dura lámina de cicatrización con reducida flexibilidad. Este hecho es característico de mallas con poros inferiores a 800 μm .

El peso de la malla depende del peso del polímero y del poro de la malla (cantidad de material usado). Las *mallas pesadas* (100 g/m^2 ; 1.5 g para una malla de 10x15 cm) utilizan polímeros con densidad elevada, tienen poros pequeños y una alta resistencia mecánica derivada la gran masa de material, que promueve una gran RCE, resultando en una gran cicatriz. Por el contrario, las *mallas ligeras* (33 g/cm^2 ; 0.5 g para una malla de 10x15) están compuestas de finos filamentos formando una red de poros más grandes que las anteriores (>1 mm). El resultado es una RCE menos intensa y una malla más flexible manteniendo la capacidad mínima de resistir presiones de 170 mmHg (16 N/cm). Considerando que la pared abdominal tiene una elasticidad propia del 38% a 32 N/cm por la presión intra-abdominal, las mallas pesadas, que tienen una elasticidad propia solo del 4-16% a 16 N/m (las ligeras la tienen del 20-35%), pueden suponer un obstáculo para la distensión correcta del abdomen. Otro factor a considerar es la degradación de la malla o la calcificación, que se ha observado principalmente en mallas de polyester (que podría ser ocasionada por hidrólisis) y en mallas de poros pequeños, respectivamente (133) (185) (186).

Respecto a la biocompatibilidad de los materiales actuales, estos son física y químicamente inertes. De forma general son estables, no inmunogénicos, ni tóxicos. A pesar de ello, no son biológicamente inertes ya que generan la RCE. Esta respuesta modulada por el sistema inmunitario, que implica inflamación, fibrosis, calcificación, trombosis y la formación de granulomas, es muy diferente a aquella que ocurre en la reparación por simple sutura. Si bien el tamaño de poro define la magnitud de la RCE, esta es bastante uniforme independientemente de la composición de la malla, aunque su presencia altera la composición del colágeno en torno a ella. Así, la relación colágeno tipo I/III (el tipo III, típico de fases iniciales de la reparación) es inferior en el tejido circundante a la malla, comprometiendo la resistencia y estabilidad mecánica del complejo tejido-malla (187-190).

1.4.5.2 Complicaciones en el uso de las mallas: infección, adhesión, seroma y dolor

Las complicaciones que presentan las mallas son un reflejo de sus propiedades. Uno de las principales complicaciones es la infección ya que es difícil de eliminar, incluso con la extracción de la malla. La bacteria se adhiere al polímero sintético creando un biofilm que la protege ante la respuesta del sistema inmunitario, cronificándose la infección. Este riesgo está principalmente relacionado con el tipo de filamento y el tamaño de poro. Mallas con microporos (ex. ePTFE) o multifilamento presentan un riesgo mayor de infección debido a que los neutrófilos y macrófagos no pueden pasar a través de poros inferiores a $< 10\mu\text{m}$, pero sí las bacterias que penetran y residen fácilmente. Así, las mallas con menor riesgo de infección son aquellas monofilamento con poros mayores de $75\mu\text{m}$ (133).

El riesgo de adhesión también es considerado como una complicación importante. Esta adhesión es resultado del exudado de fibrina que ocurre durante un trauma. La fibrina forma adhesiones temporales hasta que el sistema fibrinolítico la absorbe. De forma crítica esta absorción está disminuida en situaciones de isquemia, inflamación o RCE (ej. mallas), dando como resultado a adhesiones no temporales si no permanentes. Todas las mallas generan adhesiones dependiendo del tamaño de poro, estructura de filamento y su superficie. Las mallas pesadas inducen una fuerte reacción fibrótica que genera una gran adhesión. En cambio, las mallas de microporos de ePTFE no generan adhesiones, pero no se adhieren fuertemente a los tejidos circundantes. Para resolver esta situación se diseñaron los *composites*. En los *composites* existe una capa de material en contacto con las vísceras que no genera adherencias (ni una fuerte RCE), mientras otra se encuentra orientada a la musculatura y fascia abdominal que si lo hace. La combinación más frecuente en los *composites* era la de polipropileno/ePTFE, pero se han ido añadiendo otras sustancias como el PDVF, celulosa y ácidos grasos omega-3 (191). El riesgo de dolor crónico asociado con el uso de mallas es reducido comparado con el de la reparación por simple sutura, aunque sigue siendo grave. Esto se argumenta debido a la aplicación de técnicas libres de tensión más que al uso de las mallas en sí. Aún así el dolor crónico llega alcanzar un riesgo asociado por encima del 50%. Este dolor se puede dar por diversas razones. Cuando se inicia justo después del periodo post-operativo es usualmente debido a un nervio dañado durante la cirugía. En cambio, si este comienza 1 año más tarde es debido a la RCE. Esto se pone de manifiesto cuando se extraen las mallas ya que se observan fibras nerviosas y fascículos en la RCE dentro de la malla (neuromas) (192).

1.4.5.3 Recuperación de la resistencia tensil de la pared abdominal después de la cirugía

En el proceso de sanación de la pared abdominal después de la cirugía se genera la cicatriz en los tejidos más superficiales y la reparación del tejido subcutáneo de la miofascia. Durante este, la resistencia tensil de la pared abdominal a la presión interna de la cavidad abdominal y a los esfuerzos físicos va incrementándose paulatinamente. La resistencia tensil óptima se conseguirá con el progreso adecuado en las fases antes descritas de la reparación. Así, el riesgo de sufrir una dehiscencia, aunque bajo (0.1% de incidencia), es mayor en aquellos momentos donde tanto la cicatriz, como el tejido miofascial, no han conseguido recuperar una

estructura y propiedades físicas óptimas (*lag phase*, o fase de retardo o latencia). De hecho algunos autores sugieren que la baja incidencia de la dehiscencia es en realidad del 11% en las hernias desarrolladas en un periodo de 2-4 años posterior a la cirugía. En estos pacientes, la cicatriz superficial se ha formado correctamente pero el tejido miofascial no lo ha hecho de la misma forma, comprometiendo la resistencia tensil de la pared abdominal (9; 193). En este sentido, un estudio experimental en nuestro laboratorio en ratas, indicó que la administración de L-arginina en ratas a las que se les había incorporado una malla de polipropileno, mejoraba la resistencia de la malla a largo plazo, reduciéndose al mismo tiempo la dureza debida a la RCE mejorando la integración (194). Esto pone en evidencia que no solo la malla en sí, si no las condiciones del receptor, pueden influir en el rendimiento de las prótesis (Figura 16).

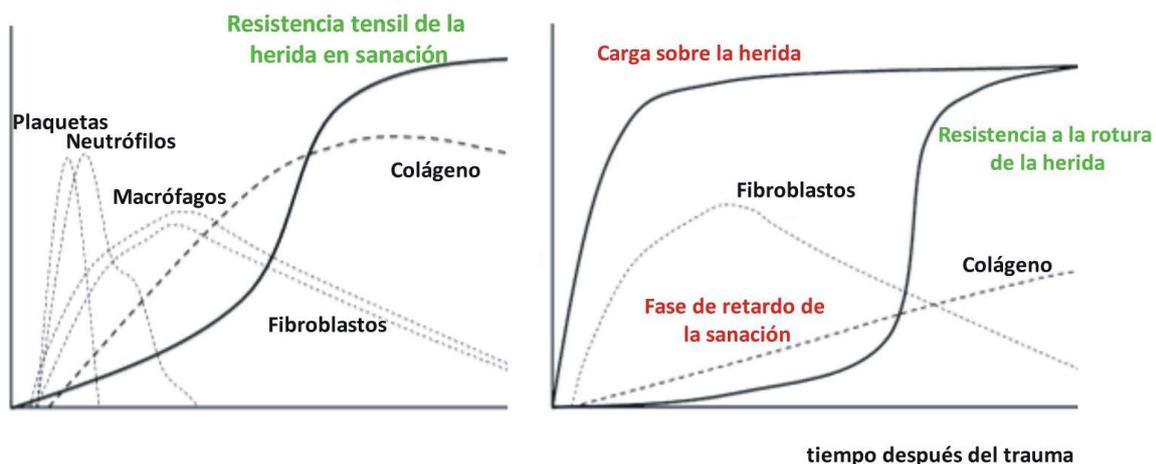


Figura 16. Evolución de la resistencia tensil de la herida durante el proceso de reparación. Adaptado de Franz MG (*The Biology of Hernia Formation. Surg Clin North Am. 2008; 88(1): 1–vii*).

1.4.6 Prevención de la hernia incisional

La prevención de la hernia incluiría tanto factores técnicos como factores biológicos relacionados con el paciente. Dentro de los factores técnicos, la prevención comprende todos aquellos procesos que puedan afectar a la recuperación apropiada del tejido. Uno de los más importantes sería que el cirujano debería aplicar la mejor aproximación técnica para la incisión y cierre de la laparotomía (ya descritos anteriormente) necesarios para resolver un determinada situación. Esto incidiría directamente sobre el riesgo de infección, seroma y demás complicaciones, que aumentan la incidencia de la hernia incisional. En la decisión quirúrgica de la mejor técnica a aplicar, la investigación de los factores biológicos (intrínsecos y no patológicos) del paciente, con una base celular y molecular, podría abrir la puerta a la estratificación o segregación de los pacientes de riesgo y así individualizar la cirugía. En este sentido, el uso de mallas profilácticas, en la prevención de la hernia, estaría fuertemente justificado, ya que estas comportan un riesgo asociado. Por otra parte, su aplicación debería mejorar el riesgo asociado de desarrollar la eventración sin su uso, y tener una tasa de complicaciones al menos similar. Dos ejemplos en los que se ha podido aplicar la malla de forma preventiva han sido los casos de cirugía bariátrica y los pacientes con aneurisma abdominal aórtico, en los que ha

disminuido el porcentaje de eventraciones y complicaciones asociadas. En el futuro, el estudio de las bases celulares y moleculares de la génesis y desarrollo de la hernia incisional deberían ayudar a seleccionar los grupos o pacientes de alto riesgo para la aplicación de las prótesis preventivas. El mismo estudio facilitaría el diseño de las prótesis idóneas para cada paciente en particular. Sin embargo, se deberán evitar las características o factores relacionados con el paciente que puedan generar un efecto dañino en el tejido abdominal y que dificulten su regeneración después de una cirugía, entre ellos la malnutrición, la obesidad, tabaquismo, o tratamientos inmunosupresores y corticoesteroides.

1.5 Biología celular y molecular de la hernia

Pocos son los estudios que se centran en la biología de la hernia incisional intentando elucidar los mecanismos moleculares que determinan su aparición y progresión. No está claro cómo los *factores generales* pueden actuar sobre las bases celulares y moleculares del tejido, ni cómo estos interactúan entre sí dentro del tejido del paciente. Por otro lado, lo que sí parece poner en evidencia la cirugía previa a la hernia incisional son los puntos débiles de la homeóstasis de la pared abdominal del paciente. Esto es así ya que las posibles limitaciones de las técnicas quirúrgicas no explican el subgrupo de pacientes que desarrollan la hernia incisional al cabo de varios años. Si la frecuencia y recurrencia de las hernias incisionales fuese solo debida a factores técnicos quirúrgicos, la incidencia disminuiría en el tiempo desde la realización de la intervención (195). Esto sugiere que existen *factores de índole biológica*, característicos del paciente, que se ponen de manifiesto después de la cirugía.

De forma inicial, los primeros candidatos a considerar como factores biológicos fueron los relacionados con la estructura y composición de la matriz extracelular de la aponeurosis, dejando de lado el músculo de la pared abdominal. Desde entonces hasta hoy se han ido sumando nuevas hipótesis a la *biología de la hernia incisional* (9). Los estudios realizados hasta este momento se han basado en comparar el grupo de pacientes que han desarrollado la patología después de la cirugía *versus* aquellos que no la desarrollan. Los nuevos estudios deberían describir las características de los pacientes con la patología antes de este evento, para poder observar mecanismos celulares y moleculares propios (y silentes) que facilitan el inicio de la hernia incisional. Todo ello podría posibilitar la selección de dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas estrategias.

1.5.1 El fibroblasto como factor de riesgo independiente

El *fibroblasto* es el modelo celular preponderante en la aponeurosis, disponiéndose en filas longitudinales a través del eje longitudinal de la aponeurosis, acompañados por células endoteliales, nerviosas y del sistema inmune, en menor proporción. Son células de origen mesenquimal, no totalmente diferenciadas. La forma especializada del fibroblasto es el *miofibroblasto* que solo aparece en situaciones de reparación tisular, o en situaciones patológicas, siendo encargados de remodelar y reparar el tejido. Debido a su plasticidad mesenquimal el origen de los miofibroblastos podría ser que no fuese el de los fibroblastos residentes. Se tienen evidencias de que podrían derivar, además, de monocitos y fibrocitos de la médula ósea (que circulan por los vasos, anidando en la región del trauma), de células endoteliales, musculares lisas y epiteliales (estas en situaciones patológicas). Los fibroblastos, como los miofibroblastos, son capaces de percibir alteraciones de tensión en la MEC del tejido mediante mecanismos de *mecanotransducción* y de dar respuestas mediante la síntesis/degradación /modificación de la MEC circundante (como en situaciones de sobrecarga). Además los fibroblastos extienden proyecciones celulares a través de la MEC estableciendo contacto con otros fibroblastos a través de uniones tipo *gap junctions* (vía connexinas), *adherens junctions* (vía caderinas/ α - β cateninas) o *fibronexus cell-to-cell contacts* (vía integrinas/fibronectina). El resultado es una red tridimensional celular que

percibe las alteraciones de la tensión de su entorno de forma unitaria y genera una respuesta celular de la misma forma. Un ejemplo es la vía de señalización mediante la activación de la *focal adhesion kinase (FAK)*, que actúa a través diversas quinasas (c-src / PI3K/ ATK y ERK) regulando el ciclo celular, la mitosis, y la apoptosis. De la misma forma, la actividad del fibroblasto está regulada por citoquinas y canales intercelulares (196; 197; 198; 46; 199).

Aparte de ser una célula efectora en la reparación tisular, participa en la respuesta inmunitaria y el reclutamiento de sus células al lugar del daño. Son capaces de producir agentes inflamatorios, como prostaglandinas, leucotrienos y especies reactivas de oxígeno, e incrementar la síntesis de PGs (ej. versicanos -1 y - 2) que facilitan la invasión del componente inflamatorio. El fibroblasto se ve afectado de forma paracrina tanto por la acción de otras células (PDGF, IL-6, IL-13, FGF, leucotrienos eicosanoides) como por él mismo (IGFBP-3/5, IGF-II, CTGF, IL-33, CXC/CC citoquinas, especies reactivas de oxígeno). Un ejemplo es la IL6 producida por linfocitos T, macrófagos, músculo esquelético y fibroblastos. En situaciones de daño tisular o patológico tiene un carácter pro-inflamatorio pudiendo desembocar en fibrosis. Contraponiéndose, existen factores paracrinos como la prostaglandina E2 y la prostaciclina (eicosanoides ambos) que inhiben la respuesta fibrótica. Al mismo tiempo, tanto TGF β 1, IL1 β , IL6 pueden actuar de forma autocrina en el fibroblasto siendo pro-inflamatorio y pro-fibróticos, neutralizados por los efectos autocrinos anti-inflamatorios, por ejemplo, del HFG. El papel de fibroblasto es tan diverso que participa también en la angiogénesis liberando VEGF que actúa sobre las células endoteliales, como también en la formación del tapón hemostático liberando PAs y PAIs (199). Recientemente se ha podido observar que los propios fibroblastos pueden incrementar la respuesta inflamatoria a través de los *toll-like receptors*, que son receptores que reconocen patrones de moléculas de agentes infecciosos y a su vez fragmentos endógenos que proceden del daño tisular (200) (201) (202). Esto permite elaborar nuevas hipótesis sobre el inicio y desarrollo de la hernia incisional, ya que otorga al fibroblasto un papel más autónomo susceptible de ser desregulado independientemente de otros estímulos, sumándose al papel de la mecanotransducción propia.

A pesar de su papel central en la reparación y respuesta inflamatoria, se ha investigado poco en torno a la disfunción de los fibroblastos de la pared abdominal en aquellas ocasiones de fallo en la reparación y cicatrización de la herida, tanto de tipo agudo como crónico. De hecho, la gran mayoría de estudios se centran en modelos de re-epitelización de queratinocitos. Se desconoce si existe un reclutamiento y/o una regulación deficiente de la función del fibroblasto, si los fibroblastos reclutados pertenecen a una población diferente de la de pacientes no afectados, o si los mecanismos que regulan la actividad del ciclo celular en determinadas situaciones están afectados (9). Entre estos pocos estudios, en un estudio de 16 pacientes con heridas ulcerosas por presión se describieron que los cultivos de fibroblastos primarios del lecho ulceroso llegaban más rápidamente a la fase de senescencia que aquellos que procedían de piel normal. Además, los fibroblastos senescentes de la úlcera secretaban de forma significativa más *plasmína* que los de piel normal senescentes y no senescentes. También sintetizaban más *plasminogen activator inhibitor-1* y *TGF β 1* que los senescentes de piel normal. Esta desregulación, según los autores, sugería que la respuesta prolongada inflamatoria en el

transcurso de la ulceración podía ser un factor que contribuía a las condiciones de la herida crónica (70). Otro estudio sobre la influencia de los estrógenos sobre la expresión génica del colágeno en cultivos primarios de fibroblastos humanos de cicatriz de piel (con solo un paciente por grupo de estudio), mostraba que aquellos que provenían de pacientes con hernia incisional recurrentes presentaban un ratio colágeno I/III inferior. Cuando los fibroblastos eran estimulados con β -estradiol, solo el del grupo de mujeres no afectadas veían alterada la expresión génica del colágeno tipo I y III, y no el de hombres sanos y mujeres afectadas. Así mismo, en el de hombres afectados tampoco tenía influencia, demostrándose que β -estradiol no podía ser utilizado como hormona para el cambio de la síntesis del colágeno. A pesar del resultado, lo más remarcable de este estudio es que los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes afectados por hernia incisional recurrente presentaban una relación de expresión génica colágeno tipo I/III alterada, sin presencia de células inflamatorias, de una MEC pre-existente, o de una red tridimensional celular. Por tanto, los fibroblastos de hernia incisional retenían su fenotipo alterado bajo condiciones “*in vitro*” (68).

1.5.1.1 Proliferación

Los fibroblastos se ven sometidos a diversos estímulos que regulan el ciclo celular y la proliferación, que influyen en la respuesta frente a la cirugía. La proliferación es el proceso que resulta del incremento de células, y se define como el balance entre las divisiones celulares (mitosis) y la pérdida de células por muerte celular o diferenciación. El ciclo celular se encuentra altamente controlado por diferentes mecanismos que permiten su progresión, o detención. El grupo de proteínas principales que tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular son las ciclinas, las ciclinas dependientes de quinasas (*cyclin dependent kinases; Cdk*s), y sus sustratos, los inhibidores de las *Cdk*s (*Cdk*s inhibitors; CKI), y los genes supresores de tumores p53 y pRb (*retinoblastoma protein*) (Figura 17). El control de la proliferación ocurre usualmente en la primera fase (G1) del ciclo celular. Factores de crecimiento, citoquinas, la adhesión celular al sustrato (mecano-transducción), o eventos de daño en el ADN, regulan la entrada en la fase S, donde el ADN se replica. De este modo, el control de la fase G1 está intrínsecamente unida al control de la diferenciación, la quiescencia (estado en que células no se dividen, con baja tasa metabólica a la espera de señales de proliferación; G0) de las células progenitoras, senescencia (estado en que las células salen del ciclo celular de forma permanente, no dividiéndose más, por defectos celulares, para finalmente morir), y respuesta a diferentes tipos de estrés. El paso de la fase G1 a la S, es paso de no retorno, que en ausencia de algún tipo de stress (ej. daño celular), conduce a completar el ciclo celular y dividirse, y por tanto está altamente regulado. Durante la fase S, la célula es poco sensible a estímulos extracelulares, completa la fase S, hasta la fase G2 y entonces entra en mitosis. La decisión de avanzar de G1 a S, es punto de restricción y está controlada primariamente por la vía de la pRb. La regulación de esta vía está principalmente regulada por ciclinas y sus inhibidores, CKIs. De forma general, las señales mitogénicas (ej. factores de crecimiento, adhesión al sustrato, adhesión célula-célula), inducen la síntesis de las ciclinas de tipo D, activando la CDK4 y CDK6, que inducen a las ciclinas del tipo E para activar CDK2. La ciclina-D-CDK/6 y la ciclina-E-CDK2, fosforilan las proteínas de la familia pRB haciendo que la supresión que existía sobre el factor

de transcripción EF2 cese, permitiendo que los genes diana se EF2 se expresen, habilitando la transición G1/S (203).

En el caso de la transición de G2-mitosis, esta está controlada por la activación de la CDK1 por la ciclina B. El complejo ciclina-B-CDK1 fosforila diversas proteínas durante G2 y al inicio de la mitosis que inicia la separación de los centrosomas, la dinámica del Golgi, la rotura de la membrana nuclear y la condensación nuclear, participando además en los controles de seguridad o *checkpoints* de la formación del huso acromático, evitando *la catástrofe mitótica*. Las proteínas INK4 (*inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*) inhiben específicamente CDK4-6, mientras que la familia de CKIs p21 (incluye p17, p21, p27) actúa sobre diferentes ciclinas. En el caso de p21, su expresión está positivamente regulada por el factor de transcripción p53, en parte. Cuando la célula se adhiere a la MEC mediante integrinas, estas activan la FAK que directamente participa en el proceso de ubiquitinación y degradación proteosomal de p53, con la consecuente disminución de p21, que permite la progresión del ciclo celular. Los estudios sobre el ciclo celular indican que un nivel bajo de actividad CDK en G1 es suficiente para la proliferación en respuesta de niveles fisiológicos de mitógenos, mientras que niveles significativamente elevados son característicos de situaciones hiper-proliferativas, inducidas por oncogenes activados (203) (204) (205).

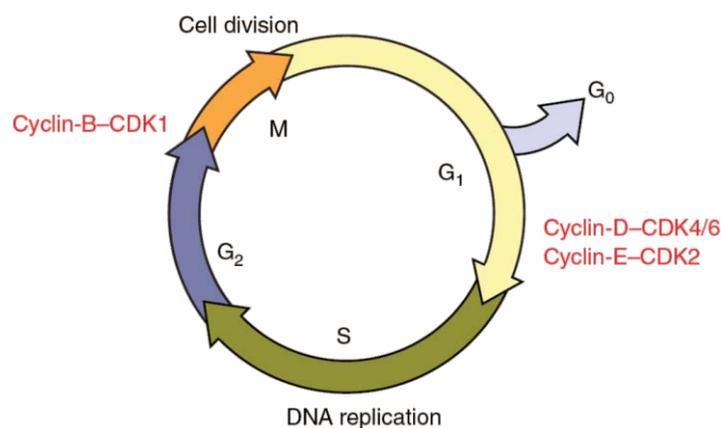


Figura 17. El ciclo celular se divide en cuatro fases G1, S, G2 y M, controlado por las Cdk y las ciclinas. La transición de G1 a S está controlada por el complejo ciclina-D-CDK4/6 y ciclina-E-CDK2, mientras que el paso a G2 hacia la mitosis está controlada por el complejo ciclina-B-CDK1, donde la célula se divide. Las células pueden pasar a G0 (quiescencia) desde G1 a la espera de señales de proliferación. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation (*Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Mar 1;5(3))

1.5.1.2 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular que elimina y retira las células que no son deseadas por diversos motivos. Las células que sobrellevan apoptosis, son desmontadas literalmente de forma controlada para minimizar los efectos dañinos a las células vecinas, de ahí también que se llame muerte celular programada. Dentro del proceso de reparación-inflamación es un evento necesario para cesar la respuesta celular de forma ordenada para evitar procesos tales como la fibrosis, donde los fibroblastos continúan la remodelación de la MEC incontroladamente. Dentro de las muertes programadas celulares encontramos la apoptosis (tipo I), la autofagia (tipo II), y la necroptosis (tipo III), en contraposición a las no programadas de la necrosis y la pyroptosis. La apoptosis se caracteriza por ser inducida por iniciadores como el TNF α , FasL o TRAIL, patógenos, o falta de adherencia al sustrato, teniendo como intermediarios las enzimas proteolíticas de las caspasas, no produciéndose la rotura de la célula, acompañada de la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (empaquetamiento de los orgánulos celulares) (206). El material celular resultante de la apoptosis es eliminado por macrófagos. En el proceso de apoptosis las células pierden adherencia con la MEC, redondeándose y produciéndose el “blebbing” de la membrana, con la reversión de la membrana celular mostrando los ácidos fosfatidil-colina al exterior, para finalmente producirse los cuerpos apoptóticos. Dentro de la célula se produce la condensación del núcleo y su segmentación, y la hidrólisis extensiva del ADN. Al mismo tiempo las mitocondrias y el aparato de Golgi son fragmentados. La inducción de la apoptosis activa la cascada proteolítica de las caspasas que convergen en la activación de la caspasa-3, -6 y -7, degradando multitud de proteínas. Esta activación de las caspasas provoca un debilitamiento estructural de la célula, actuando proteolíticamente sobre los componentes del citoesqueleto citoplasmático y nuclear. En el proceso de muerte programada las caspasas actúan sobre factores de transcripción y a nivel ribosomal, para detener de forma ordenada la actividad celular. La célula en apoptosis también envía señales de atracción para las células fagocitarias en forma de *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), como ATP y HMGB1 (*high-mobility group box-1 protein*), y al mismo tiempo muestran en la membrana ligandos específicos (ej. fosfatidil-colina, calreticulina) para la que los fagocitos las engullan (207).

De forma esquemática, las vías de activación de las caspasas son tres (a pesar que tienen puntos en común): la vía extrínseca, la intrínseca, y la vía del *Granzyme B* (Figura 18). De forma esquemática, las vías de activación de las caspasas son tres (a pesar que tienen puntos en común): la vía extrínseca, la intrínseca, y la vía del *Granzyme B* (Figura 18). La vía extrínseca se caracteriza por la unión de ligandos extracelulares-como FasL, TNF α - a receptores de transmembrana de muerte (*transmembrane death receptors*). La unión de los ligandos a los receptores induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras (ej. *Fas-associated death domain protein*; FADD) que promueve la unión de moléculas de caspasa-8 y su activación. Esta activación inicia la cascada de activación de las caspasas activándose proteolíticamente la caspasa-3 y -7, que a su vez activan otras caspasas, provocando la proteólisis de componentes celulares y la muerte celular. La vía extrínseca es activada por agentes quimioterapéuticos, irradiación o falta de señales inducidas por la depleción de factores de crecimiento o falta de contacto-adherencia a la MEC (estrés celular). Estos estímulos pro-apoptóticos son

detectados por uno o más miembros de la *BH3-only protein family* (BID, BAD, PUMA/p53 *upregulated modulator of apoptosis*, NOXA, BIM activándose (fragmentándose) y sobrepasando los efectos anti-apoptóticos de las proteínas de la *cell lymphoma-2 (BCL-2) family* (BCL-2, BCL-XL), promoviendo la unión de los oligómeros de BAK–BAX en la membrana externa mitocondrial. Esto permite la pérdida del citocromo c hacia el citoplasma desde la mitocondria, promoviendo la formación del apoptosoma, formado por 7 moléculas del *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF1) y 7 homodímeros de caspasa-9. El resultado es la activación de la caspasa-9 que inicia la activación de demás caspasas. Además, la vía intrínseca controla la progresión del ciclo celular en la mitosis, que si enlentece puede provocar la catástrofe mitótica. En esta situación, se produce un pérdida de los miembros de la familia BCL-2, promoviéndose la liberación del citocromo c mitocondrial, activando la des-condensación del ADN y su degradación.

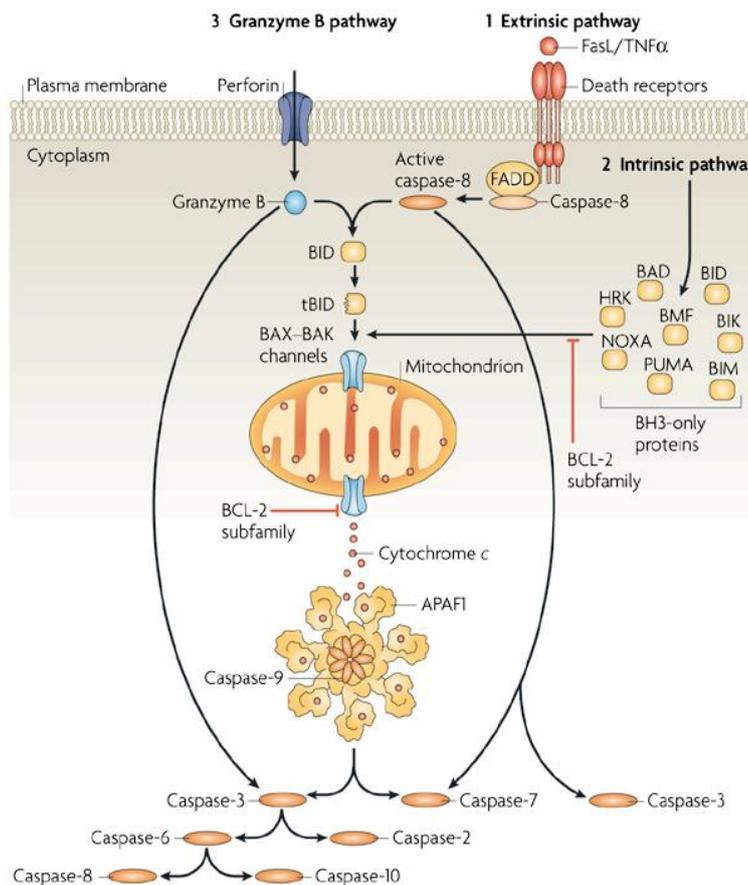


Figura 18. Esquema de las vías de activación de las caspasas. De forma general se puede clasificar las vías de activación de la vía de la caspasa en extrínseca, intrínseca y del granzyme B. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (Apoptosis: controlled demolition at the cellular level (Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Mar; 9(3):231-41).

La vía de las proteasas del granzyme B características de los linfocitos T citotóxicos y los *natural killers*, se requiere de la liberación del granzyme B dentro de la célula diana mediante unos poros en la membrana conformados por la proteína perforina. Esto se consigue con la de-granulación de vesículas especializadas en la célula a eliminar. En algunas ocasiones, la vía extrínseca y la del granzyme B pueden activar la vía intrínseca mediante la caspasa-8 y la propia actividad del granzyme B, respectivamente. Ambas proteasas proteolizan BID,

activándolo (*truncated BID; tBID*), induciendo la pérdida de citocromo c de la mitocondria y induciendo la apoptosis (207).

Los mecanismos de apoptosis siempre están en equilibrio con los mecanismos de supervivencia. Cuando algún estímulo externo o interno altera este equilibrio, y la viabilidad celular no es posible, se produce la muerte celular programada para evitar propagar el daño y la respuesta inflamatoria. A pesar de la rápida eliminación de las células apoptóticas, nuevas evidencias indican que estas secretan moléculas que podrían inducir la proliferación, o incluso la apoptosis de células vecinas. Esta función pro-apoptótica en células vecinas, ofrece una nueva visión de las patologías degenerativas en las que no hay componente inflamatorio, en donde se observa una celularidad reducida y un aumento de la apoptosis (208). Las patologías inflamatorias también se han relacionado con la reducida eliminación de componentes residuales de la apoptosis. Todos aquellos tratamientos (ej. glucocorticoides, estatinas) o estrés oxidativo que afecta a la capacidad de engullir células o cuerpos apoptóticos, o a su reconocimiento por las células fagocitarias, inducen una respuesta inflamatoria incrementada y/o crónica. Esta alteración sugiere una posible diana terapéutica (209).

1.5.2 Inflamación y degradación tisular

En apartados anteriores describimos la respuesta sistémica del organismo, tanto inflamatoria como metabólica, frente al trauma de la cirugía. Esta respuesta permite gestionar la respuesta entre los diversos sistemas del paciente, incluida la **respuesta local** de carácter inflamatorio que se produce en el tejido agredido que es el efector final de la respuesta global de todo el organismo. La correcta coordinación entre la respuesta sistémica y global es necesaria para la resolución correcta de la reparación como ya indicamos en el apartado de *susceptibilidad del paciente*. El desarrollo correcto de la inflamación, determina un balance apropiado de síntesis/ degradación de la MEC, que si no lo es puede dar lugar a fenómenos de fibrosis o degeneración (210; 211). El efector final de la reparación tisular es el fibroblasto, que se ve afectado por la regulación del sistema inmunológico, y en recientes investigaciones se pone de manifiesto que es capaz de actuar de forma autónoma perpetuando la patología inflamatoria (200). Esto, desde el punto de vista de la hernia incisional, es interesante, ya que el propio fibroblasto podría ser el causante del inicio y desarrollo de la patología, a partir de un primer estímulo desencadenante.

1.5.2.1 La reparación del tejido

La reparación del tejido después de la laparotomía, implica un proceso complejo, dinámico y organizado. El tejido resultante de la reparación ofrecerá una estructura similar, o igual, previa al trauma con las mismas funciones, además de no necesitar ningún drenaje ni apósito. Este proceso involucra la MEC (interacciones célula-MEC), mediadores solubles (citoquinas, factores de crecimiento y hormonas), células residentes (fibroblastos, células endoteliales, leucocitos, neuronas) e infiltradas (leucocitos, fibroblastos). En los casos en que esto ocurre en un tiempo determinado se trataría de una *reparación aguda de una herida o trauma (acute*

wound healing). Una definición de reparación aguda sería: “la *disrupción de la integridad de la piel y tejidos subyacentes que evoluciona hacia un proceso de sanación ordenado y sin complicaciones*” (212). En cambio, si esta reparación se prolonga en el tiempo sin detenerse, y sin producirse una reparación total, estaríamos hablando de *reparación crónica de una herida (chronic wound healing)*. Serían los casos de infecciones recurrentes, traumas con patologías asociadas como la diabetes, o el propio caso de la hernia incisional. Además, alteraciones durante el proceso pueden inducir una reparación excesiva, dándose a lugar a queloides y cicatrices hipertróficas (210; 211).

Dependiendo de la magnitud del trauma, se describen diferentes tipos de reparación de la herida aguda: la *reparación primaria (o de primera intención)*, y la *reparación secundaria (o de segunda intención)*. La reparación por primera intención ocurre en incisiones quirúrgicas y laceraciones limpias. Implica la destrucción de la membrana basal del epitelio, con la muerte de relativamente pocas células y del tejido conectivo, con lo que predomina la re-epitelización sobre la fibrosis (la herida se cierra en 12-24h con la ayuda de grapas, sutura o adhesivos). La reparación por segunda intención se da en heridas con pérdidas grandes de tejido como en el caso de traumas severos, quemaduras o por una intervención quirúrgica. En este caso la re-epitelización no es suficiente para volver a conseguir la estructura previa, generándose un *tejido de granulación* (conjunto de vasos de neo-formación, tejido conectivo, y componente inflamatorio) con acumulación de MEC. Aquí los miofibroblastos juegan un papel importante en la contracción y cierre de la herida, con la ayuda suplementaria de la re-epitelización. El proceso de reparación, tanto en el caso de primera o segunda intención, se divide en 4 fases superpuestas en el siguiente orden: **Homeóstasis, inflamación, proliferación y remodelación** (210; 211)

(Figura 19).

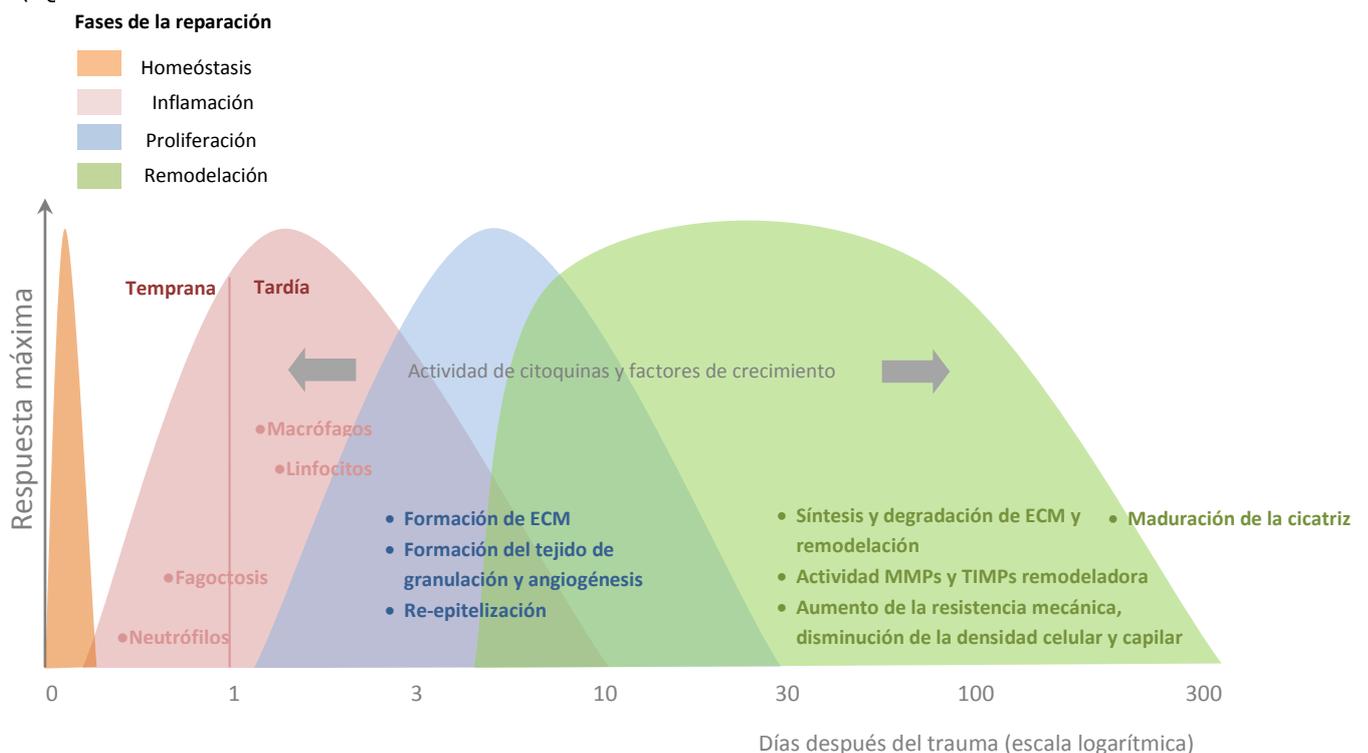


Figura 19. Fases de la remodelación. Adaptado de Williamson D, Harding K Medicine (Wound healing. Dermatology 1. 2004; Issue 12, 4-7)

Homeóstasis

Durante el trauma se ocurren roturas microvasculares. Como respuesta se produce una vasoconstricción periférica, la activación de la coagulación y la agregación plaquetaria. Rápidamente, la respuesta innata del sistema inmune se activa. Las plaquetas entran en contacto con la superficie dañada (a través de componentes de la ECM y celulares) y degranulan sus *gránulos α* liberando factores de coagulación, quimoquinas, proteínas de adhesión, factores mitogénicos y reguladores de la angiogénesis (ej. PDGF, IGF1, EGF, TGF β , *Platelet Factor IV*, β -*Thromboglobulin*, IL8, ATP, trombohexano 2, trombina y aminas vasoactivas). Este proceso determinante en la homeóstasis y la respuesta inflamatoria, produce una activación celular -fibroblastos, células endoteliales, leucocitos residentes y circulantes-, la formación del tapón hemostático (fibrina insoluble), la extravasación de células inflamatorias y la activación del complemento. El tapón hemostático de fibrina supone un buen sustrato para la migración celular, que ayudado por la liberación de serotonina de los *gránulos α* (incremento de la permeabilidad vascular con formación de un exudado en el espacio extravascular), resulta en un modo eficiente de reclutar células. De este modo, quedan atrapados leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos y otros linfocitos polimorfonucleares) en el tapón, que también amplifican el reclutamiento celular mediante citoquinas. Todos estos procesos se realizan en una situación de isquemia/anoxia que no se revierte hasta la nueva formación de vasos (angiogénesis) en fases posteriores. Esta anoxia también modula la función inmune y metabolismo de las células implicadas (108;210; 211; 213)

Inflamación

En la fase de inflamación (inicio-3^{er} día) participan diversas células inflamatorias de forma programada que definen una fase temprana y una tardía. En la fase temprana (inicio-2^o día), se desencadena la activación del sistema del complemento tanto por la presencia de patrones de moléculas asociadas a patógenos (en infecciones), como por patrones de moléculas asociadas a situaciones de riesgo (ej. trauma, quemaduras), de forma directa o también ayudada por la cascada de coagulación. La formación del tapón hemostático de fibrina y la activación de complemento, promueve la infiltración en la herida de neutrófilos atraídos por quimioatrayentes (TGF β , componentes del complemento C3a/ C5a, IL-8, IL6sr, MCP-1, fragmentos de la ME, LPS y péptidos formil-metionil bacterianos). Las células endoteliales, que han sido activadas por citoquinas pro-inflamatorias (IL β 1, TNF α , IFN γ), expresan entonces diversas clases de moléculas de adhesión (P/E selectinas, VCAM-1, ICAM 1/2) que interaccionan con las α/β integrinas presentes en la membrana de los neutrófilos (LFA1, MAC1, *Integrin $\alpha_b\beta_2$*) permitiendo la adhesión y diapédesis de los neutrófilos. Ya dentro de la zona afectada, los neutrófilos reclutados comienzan la fagocitosis de agentes infecciosos, restos celulares y de MEC. Para conseguirlo, estos liberan sustancias antimicrobiales (especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos catiónicos, eicosanoides) y proteasas (elastasa, catepsina G, proteinasa 3, *urokinase-type plasminogen receptor*). Además también liberan *alarminas* (*cathelicidins*, α -Defensinas, lactoferrina, *high-mobility group box-1 protein* (HMGB1)) con efectos bactericidas, quimiotáctiles y, de forma significativa, con la capacidad de movilizar y activar a las células presentadores de antígenos (APC), incrementando de la respuesta innata y adaptativa. Si el estímulo para el reclutamiento de los neutrófilos cesa, la infiltración se detiene, entran en

apoptosis (inducida en parte por el complejo IL6-IL6rs) y son más tarde fagocitados por los macrófagos. Durante este periodo, las células basales de los bordes del trauma del epitelio incrementan su actividad mitótica y migran a lo largo de la dermis depositando la nueva membrana basal. Así también, los mastocitos de la epidermis degranulan ayudando a la respuesta inflamatoria (210; 211).

La fase inflamatoria tardía (situada entre el 2^o-3^{er} día) se caracteriza por la infiltración de macrófagos. Los monocitos circulantes son atraídos por diferentes quimioatrayentes como el complemento, componentes del clavo hemostático, fragmentos de IgG, elastina y colágeno, citoquinas y agentes pro-inflamatorios (leucotrieno B₄, PDGF, TGFβ, MIP 1-α, MCP-1, RANTES). El origen de estos quimioatrayentes es de forma mayoritaria de fibroblastos, queratinocitos hiper-proliferativos y ciertos grupos de leucocitos. Una vez los macrófagos llegan al trauma interactúan con las moléculas de adhesión del endotelio vascular, permitiendo su diapédesis. Dentro del tejido los monocitos son activados mediante la unión a fragmentos de moléculas de patógenos o de moléculas con patrón de alarma -vía receptores de Fc y complemento, y *toll-like receptors*-, por la presentación de estos ayudada por linfocitos CD4⁺ T helper y por el entorno pro-inflamatorio de citoquinas. Esto hace que los monocitos pasen a ser a macrófagos activados maduros, funcionando como células presentadoras de antígeno y fagocitarias. En este punto, pasan a ser las células más importantes en el proceso ya que, además de estimular la respuesta inflamatoria, también regulan el proceso de reparación a través de la producción de citoquinas (TNFα, TGFβ, TGFα, bFGF, PDGF, VEGF, HB-EGF, IL1, IL6) y MMPs. Su acción recae sobre fibroblastos, células musculares lisas del endotelio y endoteliales, que promueven la aproximación, proliferación, síntesis de MEC y la angiogénesis. Recientemente se ha podido observar que los propios fibroblastos pueden incrementar la respuesta inflamatoria a través de los *toll-like receptors*, siendo activados a través de ellos secretando citoquinas y MMPs. Esto podría ser una forma adicional de cómo el fibroblasto se desregula de forma autónoma. Durante esta fase se aprecian fibras de colágeno en los bordes de la herida (en posición vertical) con un engrosamiento progresivo de la epidermis. En el caso de traumas por segunda intención, donde la pérdida de tejido es superior, existe una respuesta inflamatoria es más acentuada debido a la generación de fragmentos celulares por el trauma, y de posibles contaminaciones de patógenos. También existe un tejido de granulación mayor con el objetivo de acercar el defecto (202; 210; 214-217).

Proliferación

Durante la fase de proliferación (desde el 3^{er} día hasta la 2-4^a semana) los fibroblastos migran atraídos por citoquinas (PDGF, TGFβ, TNFα, IL6, IL1), y proliferan hacia la MEC provisional de las fases anteriores. Al mismo tiempo que los fibroblastos comienzan a sintetizar y depositar MEC, se inicia la angiogénesis formándose el tejido de granulación (3^{er}-5^o día). El resultado inicial es una estructura poco organizada y con poca resistencia tensil. A medida que avanza la fase de de-proliferación hacia la fase de remodelación, se incrementa la síntesis de colágeno I en detrimento del de tipo III, formándose una estructura organizada en forma de malla con gran resistencia mecánica. Los fibroblastos inmersos en la MEC comienzan a diferenciarse en miofibroblastos (fibroblastos con características de células musculares lisas, como la expresión α-actina). El cambio de fenotipo se da gracias al estrés mecánico debida a la rigidez de la MEC (generada por ellos mismos), al estímulo del

TGF β 1 y a la producción de la fibronectina ED-A (debida a un *splicing* particular) sintetizada por los fibroblastos. Los miofibroblastos (con una presencia máxima en la 2^a-10^a semana) traccionan y contraen de forma sostenida la MEC circundante, resultando vital en el cierre de la herida (sobre todo en aquellas de segunda intención). En cuanto a la angiogénesis, diversos factores de crecimiento, la hipoxia y elevados niveles de ácido láctico están implicados en su estimulación. Se asume que la vía común final es la producción de factores de crecimiento (VEGF, bFGF, PDGF, y TGF β) por parte de macrófagos, células endoteliales y células epidérmicas activadas. Esto permite a las células endoteliales segregar MMPs y activadores del plasminógeno que degradan la lámina basal, induciendo a las mismas células endoteliales a la proliferación, migración y formación de vasos. Los mismos enzimas degradan la MEC, facilitando la expansión y formación de los nuevos vasos inmaduros (edematosos). La presencia de estos capilares en forma de rizo dentro de la MEC provisional ofrecen una apariencia granular roja, que da nombre al *tejido de granulación*. A medida que se deposita la nueva MEC provisional el tejido de granulación se retira (210;217-221).

Remodelación

Una vez se ha conseguido la deposición de MEC, la remodelación (desde la 1^a semana- meses) de la MEC provisional es necesaria con el objetivo de re-estructurar el tejido al estado previo al trauma con unas funciones fisiológicas adecuadas. Este paso se caracteriza por la transición del tejido de granulación (poco organizado) a la formación de la cicatriz. En este entorno, cuando la herida está cerrada o prácticamente cerrada y se han superado las infecciones bacterianas, las células de la inmunidad adaptativa son las más abundantes, sobre todo los linfocitos T, que participan en el proceso de remodelación y su finalización. De este modo, los linfocitos T reguladores (Treg) disminuyen la magnitud de la respuesta inmune, habilitando la finalización de esta. La activación de los Treg requiere la estimulación de su receptor de linfocito T (*T cell receptor; TCR*). Una vez activados su función reguladora inhibidora la puede mediar por contacto directo con receptores de linfocitos (ej. *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; CTLA-4*), o secretando citoquinas (IL-10, TGF β). La IL10 puede anular la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2 directamente reduciendo la producción de IL2, TNF α e IL5, y de forma indirecta disminuyendo la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad y las moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígenos. En esta fase, la actividad de remodelación de los miofibroblastos, iniciada en la fase de proliferación, continúa y se acentúa. Se sintetiza (se incrementa la síntesis de Col I en detrimento del Col III) y degrada colágeno y otros componentes de la MEC, contrayéndose la nueva MEC. La degradación del colágeno y otras proteínas la realizan las MMPs, que son secretadas por fibroblastos de forma principal, además de neutrófilos, macrófagos y células endoteliales. La evolución del proceso conduce a la formación de la cicatriz, que en algún caso puede llegar a presentar cambio continuo hasta 2 años después del trauma. Si el proceso ha sido orquestado de forma correcta, cesa de forma progresiva con la disminución de la actividad MMP mediante sus inhibidores específicos o TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinase*), reducción del número de macrófagos y fibroblastos/miofibroblastos, detención del crecimiento de los capilares en formación, y reducción del riego sanguíneo y del metabolismo. El resultado final es una cicatriz avascular, con fibroblastos inactivos en una MEC densa y estructurada de

colágeno. Para que esto sea posible se produce un cambio general del patrón de citoquinas pro-inflamatorias, hacia uno anti-inflamatorio (IL-10, IL-1, sTNFr), ayudado por mecanismos de *feedback* negativo de insensibilización hacia las citoquinas pro-inflamatorias (pérdida efectiva delante del estímulo o disminución de receptores) (210; 211; 217-216; 223-226).

1.5.2.2 Regeneración del músculo esquelético adulto

El músculo esquelético adulto es un tejido estable con un pequeño reciclaje de los núcleos de las fibras multinucleadas. Las pequeñas lesiones que ocurren durante la actividad contráctil solo suponen una reposición de núcleos de 1-2% cada semana. Sin embargo, el músculo esquelético tiene la capacidad de responder de forma eficiente a agresiones más severas. Delante de un trauma importante (i.e ejercicio excesivo o trauma quirúrgico) reacciona en dos fases: una primera de **degeneración** y una posterior de **regeneración**. La fase de degeneración se inicia con la necrosis de las miofibras, debido en gran medida a la rotura del sarcolema que provoca un aumento de la permeabilidad. Esto conlleva a un incremento de los niveles séricos de proteínas propias del músculo como la creatina quinasa, LDH, troponina, y MyHC, señalando el trauma. Esta permeabilidad al mismo tiempo provoca un influjo de Ca^{2+} activando proteasas calcio-dependientes, como las calpainas, que amplifican el efecto inicial mediante la autólisis focal o generalizada. Todo el proceso necrótico genera señales que activan y reclutan células del sistema inmune (residentes o circulantes) y miogénicas. Las primeras células inflamatorias a infiltrarse son los neutrófilos (en 1-6 h), y más tarde los macrófagos (en 24-48h), siendo entonces los más abundantes. Cabe destacar, que esta infiltración solo es posible si existe una buena irrigación del tejido, si no se pospondrá hasta la formación de nuevos vasos en la zona afectada. Los macrófagos participan en el proceso de fagocitación de los restos celulares, pudiendo mediar la lisis de las fibras musculares de forma NO dependiente. Conjuntamente con los fibroblastos, los macrófagos generan señales quimiotáctiles complementarias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) para atraer a células inflamatorias circulantes. Estas citoquinas a su vez incrementan la actividad de la NAPH oxidasa de los macrófagos que genera una explosión de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que están implicadas en procesos de *proliferación/apoptosis (muerte celular programada)*, activación de factores de transcripción (como NF κ B), y la activación de las células miogénicas. De esta forma las células inflamatorias no solo gestionan la fase de degeneración, si que no activan el proceso de regeneración posterior (58) (227) (228).

Seguidamente a la fase de degeneración encontramos la fase de regeneración (aproximadamente 7 días después). Las CS quiescentes que residen debajo de la lámina basal, que expresan *Pax7*, son activadas por el daño muscular, migran hacia la zona afectada, proliferan, y se fusionan entre sí (o con las células musculares dañadas), reemplazando el músculo degenerado. Una vez se ha dado la fusión completa de las células miogénicas, las nuevas fibras musculares incrementan su tamaño y los mionúcleos se mueven hacia la periferia de estas. La síntesis de proteínas en las nuevas fibras musculares es muy elevada, y una característica importante es que expresan formas embrionarias de la MHC, recordando el proceso de embriogénesis. Durante el proceso de regeneración se sigue el mismo patrón de expresión de *Pax7* y de los *MRFs* que ocurre durante la embriogénesis. Por el contrario el *myocyte nuclear factor (MFN)* se expresa selectivamente en las CS

para coordinar la proliferación y diferenciación después del daño muscular. Su actuación no parece necesaria durante la embriogénesis, pero sí en la reparación muscular. Al igual que existe una estricta regulación de factores de transcripción, la MEC dañada, hormonas (NO), factores de crecimiento (HGF, FGF, IGF, IGFII, mioestatina, TGF β , TNF α , PDGF), y linfoquinas (IL6, LIF) regulan de forma precisa todos los pasos desde la activación de las células satélites hasta su fusión. Estas moléculas son secretadas por células inflamatorias, endoteliales, como también por el propio músculo (58) (227) (228).

Por último se da la formación de la cicatriz fibrótica puede dar a lugar al fenómeno de fibrosis, inhabilitando la correcta curación y el correcto funcionamiento del músculo. La formación de la cicatriz fibrótica se caracteriza por un incremento en la proliferación de fibroblastos y la MEC al cabo 2 semanas del trauma, que se acelera a la 4ª semana. La acción remodeladora del fibroblasto, altamente regulada, será clave en este proceso. El resultado final de la reparación del músculo dependerá del equilibrio entre el proceso de regeneración y de fibrosis, que se ve influenciado por el desarrollo del proceso inflamatorio. La combinación de los diferentes citoquinas, y el tipo de interacción entre el componente inflamatorio y las CS (y también con las fibras musculares) determinan el resultado final. El propio fibroblasto también actúa como fuente de factores de crecimiento posibilitando también una posible fibrosis, secretando proinflamatorias (entre otras IL6 y IL-1) a la vez que reclutan neutrófilos mediante la secreción de IL8. También el proceso inflamatorio se puede perpetuar mediante la liberación de PGE2 en respuesta al estrés celular y la tensión (58) (227) (228).

1.5.2.3 Biología de la MEC en la hernia incisional

Estudios iniciales en la década de los años 70 de *Wagh, Read y col.* (229) (230) (231) evidenciaron que los pacientes con hernia inguinal directa presentaban la fascia del músculo recto anterior más delgada resultado de un contenido inferior de colágeno (aunque más soluble) y elastina, así como también un menor contenido relativo de hidroxiprolina. De igual forma, posteriormente se observó que el ratio colágeno tipo I/ colágeno tipo III era inferior en los pacientes con hernia inguinal, indicador de la menor resistencia a la tensión (232). Estos primeros estudios evidenciaron que las primeras hipótesis en torno a las posibles causas de la génesis de las hernias abdominales se centraban en la fascia, que *a priori* por sus características de tejido conectivo denso, daría el soporte estructural y funcional a la pared abdominal. Desde estas primeras anotaciones sobre las características de la MEC de los pacientes con hernia inguinal, tenemos que ir hasta el año 2000 con *Klinge y col.* (233), y a la década siguiente, para poder encontrar estudios de la MEC en la hernia incisional abdominal. Respecto a la reparación del músculo de la pared abdominal y del TCI, se conoce poco, a pesar que el músculo es el que realiza la mayor fuerza en la pared abdominal (234; 26).

Colágeno y estudios morfológicos de la ME

El colágeno ha sido uno de los principales focos de estudio en los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la hernia incisional. Está sintetizado básicamente por los fibroblastos residentes, y de forma auxiliar por otras células residentes del tejido conectivo. A pesar del conocimiento de las rutas de biosíntesis,

los estudios del colágeno en pacientes con hernia incisional han incidido mayoritariamente en la composición del tejido, y la estructura o empaquetamiento de las fibras/haces de colágeno, más que en el análisis de las rutas biosintéticas (por ejemplo la hidroxilación, que es menor en fumadores). La relación entre el colágeno I/III ha sido utilizada para establecer el grado de madurez o la fase en que se encuentra la reparación del tejido. Una relación reducida indica un tejido en proceso de reparación. Por el contrario, una relación elevada indica un tejido ya reparado. Los estudios realizados en piel y fascia de pacientes con hernias incisionales y primarias muestran una relación de la expresión de colágenos tipo I / III significativamente inferior a la de controles, debido al incremento de la expresión génica del tipo III. Según el estudio, los resultados se confirman de forma complementaria a nivel proteico con ensayos por western blot e inmunohistoquímica. En uno de estos estudios esta relación no fue inferior cuando la muestra seleccionada provenía de la fascia transversal. De igual forma, muestras de la aponeurosis de la línea media mostraron un leve incremento del tipo I, sin variar el tipo III (235). Respecto a estudios morfológicos/ histológicos sobre la MEC de la fascia, son casi inexistentes. Un estudio sobre la distribución de fibrilina-1 en pacientes con hernia incisional, en muestras de fascia, describe una tendencia a una distribución aberrante y disminuida, al mismo tiempo que un tejido conectivo menos organizado (menos fibras paralelas de colágeno) y compacto (236). Otro estudio histológico de la fascia del músculo recto en pacientes obesos mórbidos, describe que presentaba menos densidad de fibras de colágeno, estructura desorganizada, y menos contenido en elastina. Sin ser un estudio donde participaban pacientes con hernia incisional, este pretendía elucidar los mecanismos moleculares y celulares a través de los que la obesidad actúa como un factor de riesgo en la hernia incisional (237).

MMPs

Las MMPs son secretadas por células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos, y por células mesenquimales como los fibroblastos. Su expresión se encuentra regulada a nivel transcripcional, traduccional, del tráfico intracelular y de la secreción. Las citoquinas, hormonas, las interacciones de la MEC con la célula mediante mecanismos de mecanotransducción, y las interacciones célula-célula, forman parte de estos mecanismos de regulación (238; 239; 240). Se pueden clasificar dependiendo del sustrato principal de la MEC sobre el que actúan, de manera que tenemos: colagenasas intersticiales (Col I, II, III), gelatinasas (Col IV, fibronectina) y stromelisin/matrilisin (proteoglicanos, laminina, fibronectina y colágeno no fibrilar).

A pesar del conocimiento de las MMPs en la hernia inguinal, son pocos los estudios realizados en la investigación de la hernia incisional. Incluso algunos de ellos son contradictorios entre sí. De esta forma, se ha descrito un incremento en la actividad y la expresión de MMP2 en cultivos primarios de fibroblastos provenientes de la cicatriz quirúrgica de pacientes con hernia incisional recurrente, aunque otro aseveraba que no existían diferencias. Curiosamente, cultivos de fibroblastos de piel de pacientes con hernias incisionales recurrentes mostraron un descenso en la actividad y expresión génica de MMP2 inferior cuando se incubaban con mallas de polipropileno, respecto a los pacientes controles. En el caso de que las mallas fuesen de poliglactina el descenso era menor. Se han encontrado incrementados los niveles de MMP2 en pacientes con hernia incisional recurrente en muestras de fascia seleccionadas no próximas al sitio de incisión. Este estudio

nos da la idea de que no solo la zona de la cicatriz/herida estaría afectada por la desregulación de las MMPs sino que se extendería a otras zonas de la pared abdominal. En cuanto a la MMP1, los cuatro únicos estudios de piel de pacientes con hernia incisional recurrente (y primaria) son contradictorios, no dejando claro su papel (238; 235). De forma notable, en nuestro laboratorio se ha demostrado una desregulación del balance MMPs/TIMPs, incrementándose de forma neta la actividad MMPs en la fascia de pacientes con hernia incisional iniciada por una laparotomía media, conjuntamente con una desregulación de citoquinas (TNF α , IL6). Además, esta desregulación se dio alejada de la zona de cicatrización, revelando que la patología abarcaba a gran parte de la pared abdominal y el papel del proceso inflamatorio (28).

1.5.3 Mecanotransducción

De forma clásica los mecanismos por los que el entorno influía en las células se ceñía a las propiedades químicas y estructurales de la MEC. Sin embargo, las células se ven afectadas por las propiedades mecánicas de esta. Así, las células son capaces de “sentir” y modular a su vez la mecánica de la MEC para establecer la homeóstasis mecánica del tejido, permitiendo su integridad y funcionalidad. Las oscilaciones de las tensiones/cargas generadas en la fascia durante el cierre de la laparotomía, y durante todo el proceso de reparación tisular, son percibidas por los fibroblastos inmersos en la MEC mediante receptores, que son transmitidas por diversas estructuras intracelulares. Los receptores principales que interactúan con las proteínas de la MEC (ej. laminina, fibronectina, colágeno, PGs) son las integrinas, receptores transmembranales, sin actividad enzimática que ponen en contacto las estructuras del medio extracelular y el intracelular. Estas integrinas reclutan diversas proteínas asociadas a ellas (ej. vinculina, talina), que hace que se conecten con el citoesqueleto incluyendo los filamentos de actina, miosina II (no-muscular), microtúbulos y proteínas asociadas, transmitiendo las tensiones percibidas por la rigidez del sustrato o las cargas mecánicas de la MEC (241) (Figura 20).

Las integrinas son la principal vía de captación y regulación de la mecánica de la MEC. Se unen a las proteínas de la MEC formando adhesiones focales (AF). En las AF, heterodímeros integrinas (sin actividad enzimática) reclutan de forma directa (ej. vinculina, talina) o indirecta (ej. paxilina, FAK) proteínas que permiten la activación de vías de señalización de proliferación (mitosis y ciclo celular), supervivencia (NF κ B), de remodelación de la MEC (expresión de MMPs/TIMPs, colágeno y otras proteínas de la MEC) y promoción de la migración (recambio de las AF). Una de las proteínas que participa de forma más activa en la generación de estas vías de señalización es la FAK que actúa a través de la cascada *PI3K-AKT*, *PI3K-AKT/mTOR*, *SCR/JNK* regulando diversas repuestas celulares. Además, la capacidad de realizar mecanotransducción se apoya en los *Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs)* y *Rho GTPase-activating proteins (GAPs)* que regulan la actividad de las Rho-GTPasas. Las Rho-GTPasas regulan la actividad de la Rho-quinasa (ROCK) que se encarga de fosforilar la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina II, permitiendo la contracción de los microfilamentos de actina y miosina II (acto-miosina), creando tensión, que a su vez induce la formación de más AF y la polimerización de microfilamentos de acto-miosina más aparentes o

también llamados fibras de estrés. Esto permite el reclutamiento de multitud de proteínas señalizadoras y adaptadoras, que promueven la maduración de la AF en aumento de su complejidad, de la adherencia al sustrato y la tensión, transmitiendo la rigidez del sustrato o tensiones creadas en la MEC. En la conexión entre las integrinas y los microfilamentos de actina participan las proteínas talina, vinculina, *integrin-linked protein kinase* (ILK), PINH, parvina, filamina y la α -actinina, pero además se necesita la polimerización, previa de la actina para poderse ejercer la mecanotransducción. En este paso están implicadas el grupo de proteínas de las *forminas*, que tienen lugares de unión a las Rho-GTPasas, en la que se encuentran *Dia 1* y *Dia 2* (*Diaphanous family of formins*), pudiendo ser otro punto de mecano-sensibilidad ya que su actividad es dependiente de la tensión. Del mismo modo la proteína *Zyxin*, característica de las adhesiones maduras, también está implicada en la polimerización de la actina dependiente de tensión. La rigidez afecta de forma diferente a cada tipo de modelo celular. Aun así, de forma general, el aumento de rigidez incrementa la supervivencia celular y la proliferación. Por el contrario, la falta de rigidez del sustrato, conlleva la apoptosis por falta de adherencia o *Anoikis*, que limita las señales de supervivencia facilitadas por las vías de señalización generadas en las AF. Además, la mecano-transducción influye incluso en la diferenciación celular (241) (242) (243). Estudios recientes ponen de manifiesto que la rigidez del sustrato modula la actividad transcripcional, a través de la des-condensación de la cromatina regulando la acetilación de histonas, y la propia actividad transcritora. Además, en los mismos estudios, el aumento de adherencia al sustrato por las AF y las señales generadas por FAK, permitía la supervivencia de las células, y el progreso de la mitosis gracias a activación de Rac 1 (Rho-GTPasas) que intervenía en la formación del anillo contráctil y en la segregación cromosómica (244) (245).

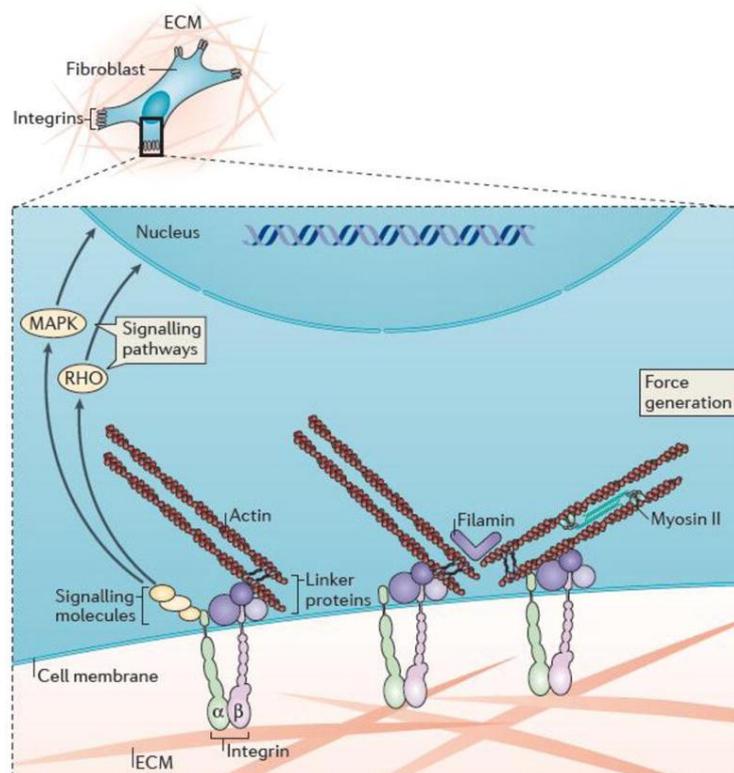


Figura 20. Representación esquemática de la homeostasis de tejidos conectivos blandos. Esquema de un fibroblasto inmerso en la MEC en donde se puede observar la mecanotransducción a través de las integrinas y las moléculas que se asocian a ellas (FAK-Src), induciendo la activación de las vías de señalización -ROCK y MAPK-, y las generación de fuerza mediante la formación (en donde participan la talina, vinculina, filamina, α -actinina y el complejo ILK, PINCH y parvina) y contracción de los filamentos de acto-miosina. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA (Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis (Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Dec; 15(12):802-12).

Independientemente de las vías de señalización activadas por la formación de las AF, nuevas investigaciones demuestran que la célula es sensible a los cambios de presión, carga y tensión, gracias a mecanismos de mecanotransducción directa hacia el núcleo, que afectan la actividad transcripcional evitando la mediación del citoplasma. El papel central lo efectuarían las laminas. La lamina es un filamento intermedio nuclear (tipo IV), que forma el citoesqueleto del núcleo o *lamina nuclear*, justo debajo de la membrana interna nuclear. Las laminas interactúan con diversas proteínas de la membrana nuclear como la emerina, el receptor de la lamina B, y la familia de las proteínas SUN y nesprina, así como también de diversos activadores transcripcionales. De forma notable, las laminas interaccionan directamente con la cromatina ayudando a anclar regiones específicas de la cromatina (*lamina associated domains, LADs*) en la periferia nuclear. De hecho, la desaparición de las laminas afecta a la organización de la cromatina, incluyendo la pérdida de heterocromatina periférica (cromatina compacta). Las laminas dan soporte estructural al núcleo y lo conectan físicamente con el citoesqueleto, y por extensión con la MEC, permitiendo integrar las señales mecánicas ejercidas en la célula hacia el interior del núcleo. De forma específica, las laminas forman parte del *complejo linker of nucleoskeleton and cytoskeleton* (LINC) que permite la transmisión de la fuerza a través de la doble membrana celular. El complejo LINC está formado por dos familias de proteína: *SUN domain proteins* en la membrana interna del núcleo; y la *KASH domain proteins* en la membrana externa del núcleo. Las *SUN domain proteins* interaccionan con lamina nuclear, porinas nucleares y otras proteínas de interiores del núcleo. Las *KASH domain proteins* se unen a los tres mayores componentes del citoesqueleto: a los microfilamentos de actina, a través del dominio de unión de la actina de las isoformas gigantes de la nesprina -1 y -2; a los filamentos intermedios (ej. vimentina), mediante la interacción con la nesprina-3 y a su vez con la proteína de unión al citoesqueleto plectina, y a los microtúbulos, vía *kinesina y dineina motor proteins*, uniéndose a la nesprina -1, -2, -4 y KASH5 (246) (Figura 21).

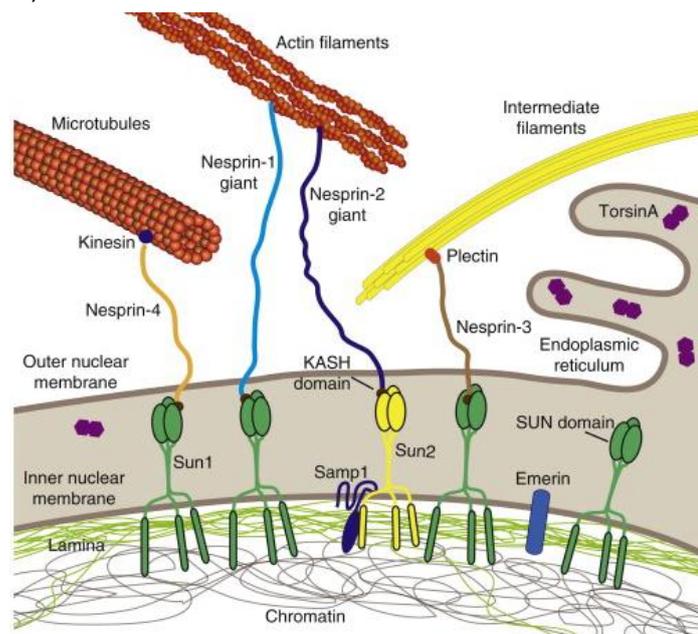


Figura 21. Esquema general del complejo LINC y sus interacciones con el citoesqueleto y el interior nuclear. La mecanotransducción o mecano-sensibilidad se transmite de forma directa desde la MEC hacia el núcleo, a través del citoesqueleto. La íntima relación entre la lamina, con proteínas nucleares y la propia cromatina, posibilita la regulación transcripcional, a partir de estímulos mecánicos externos. Jaalouk DE, Lammerding J (Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jan; 10(1):63-73)

En algunos estudios se ha podido observar que las fuerzas, cargas o rigidez del sustrato a que son sometidas las células pueden modificar la estructura de la cromatina e inducir cambios conformacionales o de actividad en las proteínas nucleares, como es el caso de las laminas (246) (247).

A pesar de estos avances queda por describir de qué forma particular un determinado despliegue de laminas puede alterar la interacción con ciertas proteínas (ej. reguladores transcripcionales), para poder iniciar cambios en la regulación post-transcripcional. Independiente de los mecanismos que operen, el acoplamiento entre el núcleo y la matriz extracelular es necesario para la migración celular en los procesos de reparación tisular, inflamación y desarrollo (246). Los sistemas de mecanotransducción actúan de forma conjunta, percibiendo las características mecánicas de la MEC, modificando la actividad celular, y modificando a su vez la MEC. Además, esta mecanotransducción permite a la célula adaptarse a la tensión externa, modificando la suya, manteniendo la homeóstasis de la célula y por extensión la del tejido. De este modo, alteraciones (mutaciones, desregulación de otros tipos de señal) en los mecanismos celulares de mecano-sensibilidad podrían perturbar la capacidad de la célula de percibir cambios, y a su vez, provocar una desregulación de la respuesta celular, capaz de generar patología. Así, la incapacidad de contrarrestar las fuerzas externas de la MEC puede ser consecuencia de una posible fragilidad celular, lo cual comporta el fracaso de la homeóstasis de la célula y el tejido (248).

Nuestra hipótesis de trabajo es que el tratamiento quirúrgico realizado en la pared abdominal establece un nuevo patrón de tensiones en el tejido, que los fibroblastos fasciales y del TCI tenderán a contrarrestar cambiando la propia interna, además de estimular otras respuestas. En otros tejidos conectivos como los tendones y ligamentos se ha descrito que es necesario un cierto nivel de tensión para que se activen las funciones reparadoras de los fibroblastos (249; 250; 251). Esto sugiere que la existencia de estímulos mecánicos no adecuados (por exceso o carencia) podrían alterar la función del fibroblasto vía mecanotransducción, conduciendo al fracaso de la reparación. En este punto se cruzan la biología molecular y celular con la técnica quirúrgica, ya que la realización de una reparación quirúrgica con tensión o libre de tensión podría modular la respuesta del fibroblasto de forma diferente.

Se ha descrito en cultivos de fibroblastos de rata procedentes de la línea alba que cuando no crecen bajo estímulo de un estrés mecánico disminuyen su capacidad proliferativa y de orientación entre sí. Además, se reduce su capacidad de contraer matrices de colágeno en cultivo, conjuntamente con cambios morfológicos. Uno de los puntos más interesantes en este estudio es que también se observa que el fenotipo de los fibroblastos revierte al ser sometidos de nuevo a estrés mecánico (252). El mismo grupo ha observado en un modelo mecánico de hernia incisional en rata, que los cultivos de fibroblastos primarios de fascia de biopsias de heridas agudas se comportan de forma diferente a los fibroblastos dérmicos de la misma área. Los fibroblastos de fascia tienen índices de proliferación más elevados y son más eficientes en contraer matrices de colágeno en cultivo. Esto denota, según los autores, que los dos tipos de fibroblastos presentan un fenotipo de acción diferente frente a una herida aguda (69). En el mismo modelo se ha puesto en evidencia que el fallo en

la reparación de la fascia compromete la reparación de la pared abdominal. Además, sorprendentemente la resección de los bordes de fascia de la herida no incrementa significativamente la aparición de hernias, indicando que posiblemente toda la pared abdominal se ve afectada por la patología (253). En nuestro laboratorio, Guillen et al. (en el trabajo de una tesis doctoral) describieron en un modelo *in vitro* de cultivo de fibroblastos en mallas de polipropileno, diferencias en el fenotipo entre fibroblastos provenientes de pacientes con hernia incisional y los que no lo eran (control). Los fibroblastos de hernia presentaban una capacidad de adherencia menor a la malla, y en los 10 primeros días de cultivo, un mayor porcentaje de células en apoptosis y proliferantes, diferencias en la morfología celular, la conformación del citoesqueleto y las adhesiones focales. Al cabo de 30 días de cultivo el grupo control cambiaba el fenotipo pasando a ser similar a los fibroblastos de hernia. Otro dato a reseñar es que al final del experimento (30 días) el índice apoptótico era superior, y el de proliferación inferior, a los de la superficie de referencia que era el poliestireno de la placa de cultivo. Este ensayo pone de manifiesto que las señales transmitidas mediante mecanotransducción pueden transformar visiblemente el fenotipo del fibroblasto residente en un tejido. Igualmente, sugiere que la interacción prótesis-fibroblasto debe ser la adecuada para inducir un fenotipo de fibroblasto que sea capaz de reparar el trauma.

1.5.4 Alteraciones en la expresión génica

De forma habitual los estudios relacionados con la hernia incisional se han centrado en aspectos concretos tanto a nivel de expresión proteica como génica (MMPs, colágeno, citoquinas-factores de crecimiento). Solo dos estudios dentro del campo de la genómica han intentado abordar la patología de forma global, ayudándose por el modelaje de sistemas biológicos (*Modelling biological systems*) y la biología computacional (*computational biology*). La capacidad de estos estudios ofrece la posibilidad de interpretar de forma global la expresión génica características del tejido y de los fibroblastos de los pacientes de hernia incisional.

En nuestro grupo, *Jordi Guillem et al.* (resultados en proceso de publicación) mostraron, mediante el perfilado de expresión génica con microarrays de cDNA, diferencias en la expresión génica de fibroblastos de la pared abdominal de pacientes con hernia incisional (no recidivados) y los de pacientes no afectados a los que se les había practicado una cirugía abdominal electiva. De forma general se pudo observar alteraciones tejido-específicas, en las que las rutas alteradas en la aponeurosis estaban relacionadas con el ciclo celular y reparación del ADN (posiblemente por la pérdida de contacto con la MEC), mientras que en los fibroblastos de músculo guardaban relación con la respuesta inmunitaria y mecanismos apoptóticos, sugiriendo procesos inflamatorios permanentes. Entre los genes diferencialmente expresados destacó el *agrecano*, infra-expresado en la hernia a nivel de mRNA y proteína, tanto en los fibroblastos aponeuróticos como los del TCI muscular. El *agrecano* es un proteoglicano (unido al ácido hialurónico) que permite soportar esfuerzos en la MEC, al mismo tiempo que da flexibilidad, organiza las fibras de colágeno, y la lubrica, limitando su erosión. Una disminución en su expresión podría poner en peligro la estabilidad del tejido (254). Por otra parte, el nivel de expresión de la proteína *chitinase 3-like 1 (CHI3L1)* se encontró incrementado en los fibroblastos del TCI en pacientes con hernia. Esta proteína está implicada en la respuesta inflamatoria, y parece que desempeña un papel significativo en la remodelación tisular y la capacidad de respuesta de las células a cambios en el micro-entorno. Se ha observado que estimula la proliferación de las células del tejido conectivo, modula la expresión de citoquinas y MMPs en fibroblastos inflamatorios, y el reclutamiento de macrófagos y células endoteliales. Además, participa en la respuesta inflamatoria mediada por Th2 (255). Su sobreexpresión indicaría un estado alterado del tejido muy posiblemente relacionado con procesos inflamatorios. Respecto a la adhesión al sustrato se observó disminución significativa en la expresión de la *reelina* en los fibroblastos de hernia del TCI. La *reelina* es una serin-proteasa de la MEC con funciones vinculadas a la regulación de la migración y la adhesión celular (256). De este modo, la expresión génica-proteica característica de los fibroblastos de hernia sugiere que muy posiblemente existan mecanismos dentro del tejido que afecten al fenotipo de los fibroblastos y la MEC, alterando sus capacidades.

El segundo estudio genómico mediante *microarray*, comparó muestras de piel y fascia de pacientes que habían sufrido al menos una hernia recurrente con pacientes que habían sido sometidos simplemente a una colicestomía, ambos mediante cirugía laparoscópica. El patrón de expresión génica mostraba que existían 167 genes diferencialmente expresados entre los 2 grupos (7 en fascia) y 8 de ellos relacionados directamente con la síntesis de colágeno y (257).

2 Hipótesis

La hernia incisional es un trastorno degenerativo post-laparotomía que aun comporta una elevada carga socio-sanitaria al nivel mundial. Sin tratar, puede causar incompetencia funcional y otras comorbilidades (graves). El trastorno es el resultado insidioso de diversos estímulos irritantes y lesiones al tejido conectivo miofascial que preceden a la pérdida de estructura y función biomecánica que sobreviene. Los defectos subyacentes son multifactoriales e incluyen factores quirúrgicos (dependientes de la técnica empleada y del cirujano que la realiza), y factores dependientes del propio paciente. En comparación con el conocimiento de las características clínicas y técnicas de su manejo, las vías moleculares y bioquímicas, y los procesos funcionales implicados están aún muy poco caracterizados.

Los tratamientos actuales se basan exclusivamente en la reparación y en el cierre quirúrgico del defecto acompañados de un refuerzo adicional con biomateriales diversos según el contexto. A pesar de que estas intervenciones son efectivas en una gran mayoría de pacientes, estos tratamientos están orientados exclusivamente al alivio sintomático y al retorno de la funcionalidad compleja de la pared del abdomen pero no atacan los procesos diana subyacentes (probablemente causantes de la enfermedad), por lo que el número de recidivas o de trastornos asociados al tratamiento persiste.

La nueva medicina de precisión se sustenta en correlacionar índices clínico-patológicos conocidos con nuevos perfiles moleculares para establecer nuevas estrategias de intervención clínica que tengan el potencial de mejorar la cura personalizada de pacientes. El éxito dependerá de la capacidad para establecer marcos que regulen, compilen e interpreten el flujo ingente de información biológica que se va generando con rapidez. Para asegurar que esta perspectiva se convierte en una realidad, deben introducirse cambios al nivel de todas las partes interesadas, para que se beneficien las áreas con mayor prioridad socio-económica, y aumente la eficacia clínica y económica. Corresponde a la comunidad biomédica el deber de desarrollar y contribuir a una nueva taxonomía de las enfermedades que incorpore la información biológica y molecular emergente teniendo en cuenta, si es posible, subgrupos específicos de pacientes (la distinción entre fenocopias –manifestaciones similares con causas distintas- es importante hacerla, ya que puede implicar evoluciones diferentes o respuestas específicas al tratamiento según la enfermedad-base).

Evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio otorgan un papel sustancial a la perturbación de la homeostasis del microentorno tisular abdominal (a favor de una desregulación de tipo inflamatorio y degradativo) que, plausiblemente, podría provocar alteraciones permanentes en los fibroblastos del tejido conectivo y en última instancia afectar a procesos celulares discretos, críticos para la reparación de los tejidos. Se desconoce aún si los cambios preceden o son consecuencia de la HI y si son generalizables a todos los subgrupos de pacientes pero, de confirmarse, en su conjunto los cambios obtenidos hasta ahora parecen suficientemente robustos como para avanzar hacia una nueva hipótesis de enfermedad. Dado que, hoy por hoy, la cirugía sólo puede corregir el defecto pero no los mecanismos subyacentes, un mayor conocimiento de las rutas moleculares implicadas no sólo es necesario sino que puede permitir el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas que modifiquen el proceso, especialmente en sus etapas más precoces. Basándonos en estas observaciones nos planteamos las siguientes hipótesis:

- La disfunción (biomecánica) de la pared abdominal observada en pacientes con hernia incisional puede ser la consecuencia de alteraciones al nivel de la estructura y función de los dos principales tejidos conectivos que la constituyen, es decir: la fascia y el músculo esquelético el cuál por cierto hasta ahora apenas ha sido explorado en la HI. Estas alteraciones podrían ser el resultado de agentes efectores que alteran dichos tejidos, y a la vez el intento de los mismos para hacer frente a estos agentes. Los cambios podrían ser específicos para cada tejido y se caracterizarían por la presencia continuada de una desregulación inflamatoria y degradativa, probablemente de baja intensidad, con pérdidas estructurales de tipo cuali- y cuantitativo.
- Los fibroblastos condicionados por este microentorno tisular podrían presentar alteraciones fenotípicas (morfológicas y funcionales) que los harían capaces de iniciar o perpetuar las alteraciones del estroma conectivo observadas en la hernia incisional. La identificación de procesos diferenciales en los fibroblastos de pacientes con hernia incisional podría ser relevante para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.
- Es bien conocido de que además de las propiedades químicas, las propiedades mecánicas de los tejidos influyen en el fenotipo y en la actividad de los fibroblastos residentes mediante mecanismos conocidos como mecanotransducción (la mecanotransducción es el proceso de transducción de señales celulares en respuesta a los estímulos mecánicos). Es probable pues que las alteraciones en la estructura y función previstas al nivel de los tejidos con hernia incisional comporten también alteraciones en la mecanotransducción. Por este motivo, el cultivo de fibroblastos primarios de pacientes con hernia incisional en presencia de sustratos con rigideces controladas debería revelar perfiles de comportamiento específicos y diferenciales respecto a los derivados de un grupo de pacientes control, que podrían ser útiles para la caracterización y la mejora del tratamiento global de la enfermedad.

Finalmente, solo remarcar que la etiología de las enfermedades multifactoriales es difícil de ordenar ya que son debidas a una combinación de factores que individualmente solo contribuyen en una pequeña parte al desarrollo de la enfermedad. En estos casos, los estudios descriptivos de tipo fundamentalmente observacional como el que aquí presentamos pueden ser útiles para generar nuevas hipótesis de enfermedad, que en un futuro puedan ser contrastadas experimentalmente y así poder aportar, progresivamente, una mayor comprensión del trastorno a un nivel mecanicista.

3 Objetivos

Como OBJETIVO GENERAL buscamos una comprensión más amplia de los fenómenos fundamentales de la biología de la MEC abdominal que permita identificar (nuevas) rutas relevantes subyacentes a la hernia incisional (y tal vez a otros defectos del tejido conectivo en general) útiles para el desarrollo de nuevas aproximaciones más perfeccionadas dirigidas a la prevención y al tratamiento. Es decir, una visión más holística de la enfermedad y que integre modelos tradicionales basados en la fisiopatología con los mecanismos moleculares emergentes, teniendo presentes los límites que conllevan las aproximaciones reduccionistas y también la complejidad de la tarea médica.

En particular, y para poder contrastar las hipótesis planteadas, hemos definido los siguientes OBJETIVOS:

OBJETIVO 1: Caracterizar muestras de tejido derivadas de biopsias peroperatorias de fascia abdominal de pacientes con hernia incisional y compararlas con muestras de biopsias peroperatorias de pacientes de un grupo control.

Objetivos específicos 1:

- Caracterización del tejido mediante técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y por reacción de RT-PCR.
- Valoración de la activación de caspasa-3, escisión del citoesqueleto, y fosforilación de vimentina, mediante técnicas de inmunotransferencia de membranas e inmunoprecipitación.
- Establecimiento y cultivo de fibroblastos primarios a partir de explantes derivados de las biopsias de fascia.
- Caracterización morfológica, ultraestructural y funcional de dichos fibroblastos primarios.
- Valoración de marcadores de autofagia y de la respuesta a estímulos pro-apoptóticos en dichos fibroblastos primarios.

OBJETIVO 2: Caracterizar muestras de tejido derivadas de biopsias peroperatorias de músculo esquelético abdominal de pacientes con hernia incisional y compararlas con muestras de biopsias peroperatorias de pacientes de un grupo control.

Objetivos específicos 2:

- Caracterización del tejido mediante técnicas histológicas, inmunohistoquímicas, por reacción de RT-PCR y de inmunotransferencia de membranas.
- Tipificación de fibras musculares mediante la combinación de técnicas histológicas, enzima-histoquímicas, y por separación electroforética (SDS-PAGE) de las diferentes isoformas de las cadenas pesadas de miosina (MyHC).
- Valoración de la activación de caspasa-3, escisión del citoesqueleto y fosforilación de vimentina, mediante técnicas de inmunotransferencia de membranas e inmunoprecipitación.

- Establecimiento y cultivo de fibroblastos primarios a partir de explantes derivados de las biopsias de músculo esquelético.
- Caracterización morfológica y funcional de dichos fibroblastos primarios en condiciones de no-confluencia y de confluencia del cultivo.
- Valoración de la respuesta a estímulos pro-apoptóticos en dichos fibroblastos primarios en condiciones de no-confluencia del cultivo.

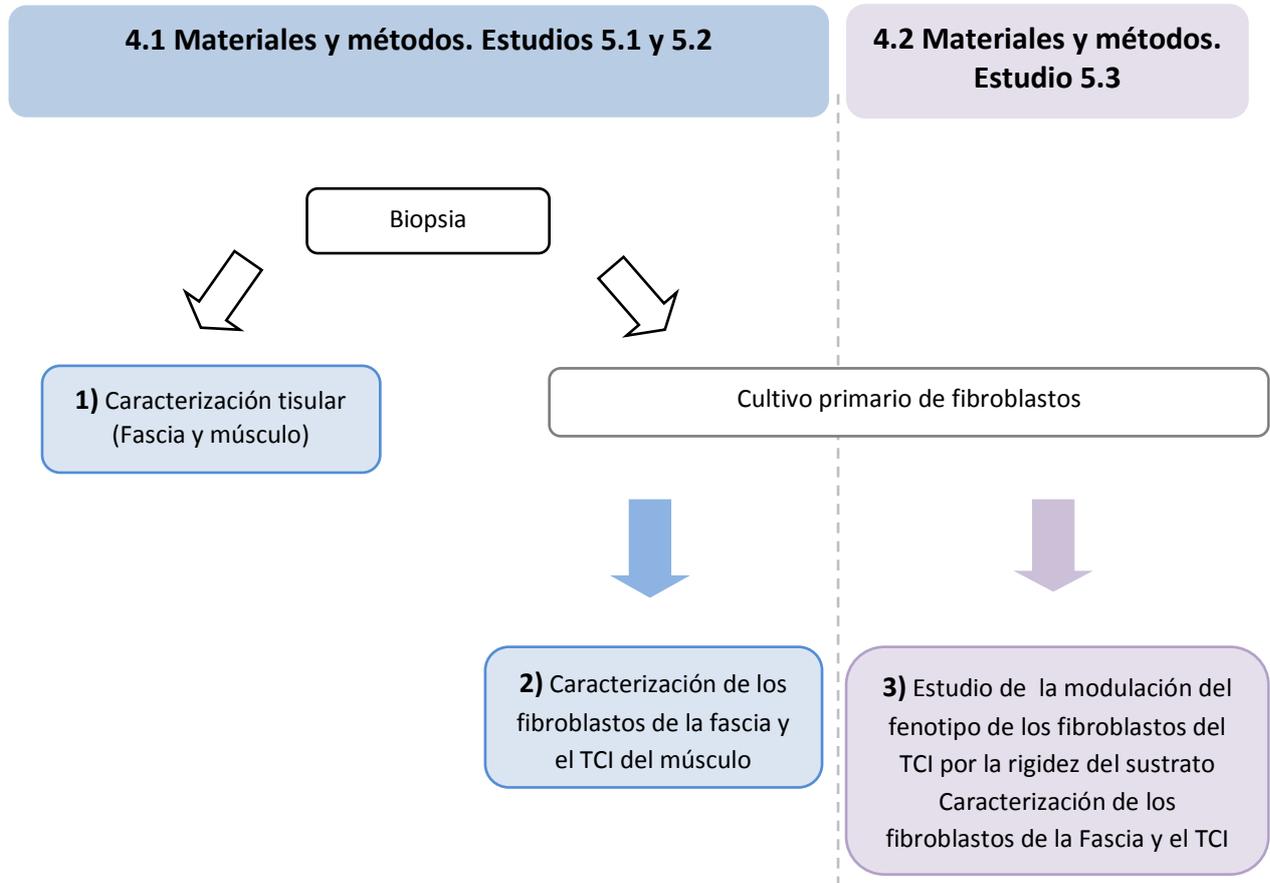
OBJETIVO 3: Analizar la respuesta morfológica y funcional de los fibroblastos primarios obtenidos a partir de explantes derivados de las biopsias de músculo esquelético de pacientes con hernia incisional y control, en respuesta a sustratos comerciales de polidimetilsiloxano (PDMS) con propiedades viscoelásticas y valores controlados de rigidez, con la intención de poder comprender mejor la interrelación existente entre el entorno físico de estas células y la señalización intracelular.

Objetivos específicos 3:

- Cultivo de fibroblastos primarios a partir de explantes derivados de las biopsias de músculo esquelético en presencia de sustratos comerciales de polidimetilsiloxano (PDMS) con propiedades viscoelásticas y valores definidos de 2, 5, 10, 30 y 100kPa de módulo de Young, recubiertos con fibronectina, comparándolos con las respuestas encontradas tras el cultivo de los mismos en superficies control (placas de cultivo convencionales y superficies de vidrio, en presencia o ausencia de fibronectina).
- Análisis morfológico e inmunocitoquímico para la valoración del citoesqueleto de actina y de vimentina, y estudio de las adhesiones focales.
- Análisis de los índices de proliferación y muerte celular, mediante técnicas de inmunocitoquímica.
- Análisis de la actividad gelatinas (MMP-2 y MMP-9) en medios condicionados por fibroblastos primarios cultivados en presencia de los sustratos de PDMS con valores controlados de rigidez y superficies control.

4 Materiales y métodos

A partir de los objetivos indicados, el diseño experimental se definió en tres 3 bloques: **1)** la caracterización tisular de la fascia y músculo esquelético de la pared abdominal; **2)** la caracterización *in vitro* de los fibroblastos de la fascia y el TCI del músculo esquelético obtenidos a partir de las biopsias; y **3)** el estudio de la modulación del fenotipo de fibroblastos del TCI del músculo esquelético mediante la rigidez del sustrato. El esquema inferior sintetiza y sitúa los 3 bloques del diseño experimental en torno a los materiales y métodos que se describen a continuación en esta sección.



4.1 Materiales y métodos. Estudios 5.1 y 5.2

4.1.1 Toma de biopsias

Las muestras de fascia y del músculo de la pared abdominal (*rectus abdominis*) estudiadas fueron obtenidas a partir de un banco propio de tejidos. En este se almacenan biopsias y fibroblastos primarios de tejidos de la pared abdominal de individuos afectados por hernia incisional (**HI**; *IH en las figuras y tablas*) y no afectados por HI (**no-HI, control o de referencia**; *non-IH en las figuras y tablas*), al mismo tiempo que los datos clínicos asociados. Las biopsias se tomaron durante la operación por un cirujano especializado en torno a la línea media abdominal. Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes afectados por HI, previamente sometidos a una laparotomía media, sujetos a una primera reparación sin uso de malla. En estos pacientes, la toma de la biopsia se realizó al menos 8 cm de distancia del borde del defecto, evitando deliberadamente áreas visibles de necrosis o tejido de granulación. En el estudio de las muestras de fascia, las intervenciones quirúrgicas que desembocaron en la formación de la IH primaria incluyen la resección del colon o tumor rectal (n = 17), la colecistectomía (n = 1), la apendicectomía (n = 1), la cesárea (n = 1) y el traumatismo abdominal (n = 1). En el caso del estudio de las muestras de músculo, se incluyen la resección del colon o tumor rectal (n = 16), la colecistectomía (n = 3), la apendicectomía (n = 2), la cesárea (n = 1) y el traumatismo abdominal (n = 1). Respecto a las muestras de los pacientes de referencia, se obtuvieron de donantes voluntarios sometidos a cirugía abdominal electiva que no habían recibido previamente una laparotomía media. En ambos grupos de estudio, los pacientes con heridas previas infectadas, diabetes, o enfermedad inflamatoria o conectiva sistémica no se incluyeron en el estudio. El análisis estadístico indicó que no existían diferencias significativas en edad, sexo y comorbilidades asociadas entre los dos grupos a estudio (Tabla 4). El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el comité de ética institucional y el consentimiento informado de los participantes se obtuvo por escrito

Con el objetivo de realizar diferentes tipos de análisis o ensayos, la muestra inicial de biopsia (tanto fascia como músculo) fue dividida en 4 fragmentos para: 1) el estudio histológico e inmunohistoquímico (IHQ); 2) la obtención de cultivos primarios de fibroblastos para su caracterización; el estudio de la expresión proteica en tejido; 3) y el estudio de la expresión génica en tejido. No todos los pacientes evaluados histológicamente y por IHQ, fueron evaluados en los otros estudios por motivos de disponibilidad de muestra o logística. De esta forma, se seleccionaron, tanto muestras de tejido, como cultivos de fibroblastos obtenidos, representativas/os. Así, el número de muestras que se utiliza en cada análisis está en el apartado de resultados. La forma inicial en que se trató cada uno de los fragmentos de muestra, se describe a continuación en cada tipo de análisis.

Tabla 4. Características de los pacientes

Estudio de la fascia			
	No-HI (n=20)	HI (n=21)	P valor*
Edad \pm EEM	65 \pm 3 (55–86)	63 \pm 3 (50–89)	0.61
Hombres	13	16	0.51
Fumadores	5	3	0.45
Enolismo	2	3	1.00
Obesidad (IMC >29)	5	11	0.11
Hiperlipidemia	1	2	0.49
Hiperuricemia	1	0	1.00

Estudio del músculo abdominal			
	No-HI (n=20)	HI (n=20)	P valor*
Edad \pm EEM	62 \pm 2 (42-78)	63 \pm 3 (40-80)	0.76
Hombres	14	14	1.00
Fumadores	3	2	1.00
Enolismo	1	2	1.00
Obesidad (IMC >29)	4	10	0.10
Hiperlipidemia	2	3	1.00
Hiperuricemia	0	0	1.00

* Prueba t de Student o prueba exacta de Fisher

4.1.2 Histología e IHQ

4.1.2.1 Fascia

El fragmento de la biopsia destinado al análisis histológico e IHQ se fijó inmediatamente en una solución de formaldehído al 10% neutralizado y se incluyó en parafina. Los métodos histológicos e inmunohistoquímicos se realizaron siguiendo la práctica rutinaria clínica en el Servicio de Anatomía Patológica del HUVH:

- *Histología*: Se cortaron secciones consecutivas (4 μm de grosor) de los bloques de muestra parafinadas, y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E) para visualizar la estructura y morfología del tejido, y con tricrómico de Masson y Alcian blue (pH 2,5) para estudiar el colágeno y glicosaminoglicanos/proteoglicanos presentes en la muestra. Se realizó un análisis semi-cuantitativo de la intensidad de la tinción de Alcian blue, considerando (1) como poco intenso y (3) como muy intenso. La presencia de neutrófilos (polimorfonucleares) se analizó utilizando la tinción de PAS (*periodic acid Schiff*) que tiñe los gránulos de glucógeno celulares (258).

- *Inmunohistoquímica*: En el caso del análisis IHQ, las secciones incluidas en parafina se desparafinaron, se rehidrataron con xileno y una serie graduada de alcoholes, y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena de las secciones con H_2O_2 al 2% durante 30 min. La recuperación (*retrivial*) del antígeno se realizó incubando las secciones con un tampón de citrato de sodio (0,1 M; pH 6,0) en una olla de presión eléctrica, y finalmente se bloquearon con una solución de suero. Los anticuerpos primarios utilizados en este análisis fueron los siguientes: anti-vimentina (1: 100, ab-2 clon V9; Dako), anti- α -actina de músculo liso (anti α -SMA; 1: 100, clon 1^a4; Dako), anti-Ki-67 (1:100, clon MIB-1 100; Dako), anti-antígeno nuclear de proliferación celular (anti-PCNA; 1: 100, clon PC-10; Dako), anti-CD3 (1:25; Novocastra Laboratories), anti-CD20 (1: 100; Dako), anti-CD45 (1:100; Dako), anti-CD68 (1:80; Dako), y anti-CD138 (1:50; Dako). Los controles consistieron en la omisión del anticuerpo primario. La muerte celular se cuantificó mediante el ensayo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dNTP-biotin nick end labeling*) que detecta la fragmentación del DNA. Se realizó mediante una modificación de un kit comercial de detección de apoptosis *in situ* (Roche), en el que la célula es clasificada como apoptótica si el área nuclear se marca de forma positiva.

- *Análisis*. Las secciones de las muestras fueron evaluadas por un patólogo experimentado en tejidos blandos del Servicio de Anatomía Patológica del HUVH. Se examinaron un mínimo de tres secciones por paciente (10 campos de alta resolución, elegidos al azar, no contiguos, y no superpuestos; $n = 30$). Los índices de proliferación (evaluados por el antígeno Ki-67 y el PCNA) y el de muerte celular o apoptosis (evaluados por TUNEL) se basan en el porcentaje de células marcadas (259; 260). Además, en el caso del TUNEL se analizó como la *circularidad* (esfericidad) de las células o *Cell radial spreading* ($4\pi * \text{área celular} / \text{perímetro}^2$) podía estar asociada a la apoptosis celular con el software libre *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Este parámetro toma valores desde 1 (círculo perfecto) a 0 (célula fusiforme).

4.1.2.2 Músculo

La preparación de la muestra para el análisis histológico e IHQ siguió los mismos pasos que en el caso de la fascia, a excepción de las tinciones de la NADH y ATPasa en que las muestras se congelaron en isopentano (enfriado previamente a -160°C en nitrógeno líquido,) y se cortaron secciones seriadas de $10\ \mu\text{m}$ de grosor en el criostato. Como con la fascia, los métodos histológicos e inmunohistoquímicos se realizaron siguiendo la práctica rutinaria clínica en el Servicio de Anatomía Patológica del HUVH.

- *Histología*: Incluyó técnicas histológicas de rutina como las tinciones H&E, tricrómico de Masson y Alcian blue (pH 2,5); y técnicas de histoquímica enzimática para evaluar los posibles patrones patológicos de las fibras musculares (I, IIa y IIx). Estas últimas incluyeron la detección de actividad ATPasa miofibrilar y la de NADH, técnicas de elección para evaluar el tamaño, la distribución y el número y tipos de fibras musculares. Para la tinción ATPasa, las muestras se preincubaron a pH 4.3 para identificar fibras de tipo I; a pH 9.6 para identificar las de tipo II; y a una doble pre-incubación a pH 9.6 seguida de otra a pH 4.3 que permite identificar las de tipo-II (teñidas) y -IIx (levemente teñidas). La actividad oxidativa de la cadena respiratoria mitocondrial se analizó mediante la tinción NADH (o NADH diaforasa), que es capaz de distinguir fibras de tipo I y fibras de tipo II.

- *Inmunohistoquímica*: La IHQ se realizó con los siguientes anticuerpos primarios: anti-desmina (1:200; Ab-1 Clone D33, Neomarkers), anti-vimentina (1:100; ab-2 clone V9, Dako), anti- α -actina de músculo liso (anti- α -SMA) (1:100; clone 1A4, Dako), anti-antígeno nuclear de proliferación celular (anti-PCNA) (1:100; clone PC-10, Dako), *anti-B cell lymphoma 2 apoptosis regulator* (anti-Bcl-2; 1:100; Dako), anti-CD3 (1:25; Novocastra Labs.), CD20 (1:100; Dako), CD45 (1:100; Dako), CD68 (1:80; Dako) and CD138 (1:50; Dako). Los controles consistieron en la omisión del anticuerpo primario. La muerte celular se cuantificó mediante el marcaje TUNEL de la misma forma que en la fascia, al igual que la síntesis de DNA (y reparación) con el PCNA. Los índices del marcaje de TUNEL y PCNA se determinaron por el porcentaje de núcleos positivos de miocitos (los núcleos al límite del tejido no fueron contados), y en caso del TCI, por los núcleos positivos en el área perimisial y en la endomisial. Además se analizó un marcador con funciones anti-apoptóticas como el Bcl-2. El índice del Bcl-2 se determinó por el porcentaje de miocitos positivos marcados en el citoplasma (261).

- *Análisis*: Puesto que no existen referencias para la interpretación de las alteraciones histológicas del músculo esquelético de la pared abdominal en el contexto de una hernia, se utilizaron algunos de los procedimientos utilizados en el diagnóstico de miopatías o distrofias musculares (258) (52), como los que identifican posibles orígenes patológicos (inflamatorio, miogénico, neurogénico) a partir de biopsias de músculo esquelético. Así, a partir de las tinciones histológicas y de las IHQ, se inspeccionaron las biopsias para su valoración semi-cuantitativa y se evaluaron las siguientes características: a) el infiltrado inflamatorio, fibrosis, reposición por el tejido adiposo, *splitting* o partición de fibras, anillos en las fibras o *rings fibers*, y núcleos centrales, con H&E; b) los desórdenes oxidativos con la tinción NADHase (que pueden dar lugar a estructuras de la miofibrillas tipo *targets*, *moth-eaten*, *fibres and cores*); y c) la distribución de las fibras

(agrupamiento), atrofia e hipertrofia, con la tinción ATPasa. Se definió un **índice de severidad (IS)** para cada característica evaluada entre 0 y 3: 0) por la ausencia; 1) por la presencia de gravedad leve y dispersa (*foci*); 2) por la presencia generalizada leve; y 3) por anomalías severas similares a aquellas encontradas en patologías miogénicas, inflamatorias o neurológicas (52; 53). La sección de área de las fibras o *cross-sectional area* (CSA) se realizó en las tinciones H&E mediante el software libre de análisis de imagen ImageJ. Se examinaron un mínimo de 3 secciones (10 campos de alta resolución, elegidos al azar, no contiguos, ni superpuestos; $n = 30$) por paciente.

4.1.3 Ensayos con cultivos de fibroblastos

4.1.3.1 Obtención de los fibroblastos primarios y cultivo celular

El fragmento de la biopsia (fascia o músculo) se depositó en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal inactivado (FBS; *heat-inactivated fetal bovine serum*), 20 mM HEPES, y 100 U/mL penicilina/estreptomicina (Invitrogen/Gibco, Carlsbad, CA, USA), que denominamos medio completo (DMEM-FBS 20%). Los cultivos primarios se establecieron siguiendo un protocolo de obtención a partir de explantes de biopsias (262). Las biopsias fueron limpiadas con etanol (Sigma) y DMEM, y a continuación troceadas y digeridas enzimáticamente con tripsina (0.625% tripsina, 0.02% EDTA; Sigma/Fluka) en tampón fosfato-salino (PBS; 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 156 mM NaCl pH 7.2) sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (20 h, 4°C, agitación suave). De la primera digestión se obtuvo el tejido digerido precipitado y un sobrenadante. Este sobrenadante se centrifugó ($150 \times g$, 10'), y el precipitado obtenido (las células liberadas del tejido) se resuspendió en DMEM-FBS 20 % y se cultivó en frascos de 25 cm² (37°C, 5% CO₂). El tejido precipitado de la primera digestión volvió a re-digerirse con tripsina (1 h, 37°C) y a cultivarse de la misma de la misma forma, para incrementar la eficiencia en el proceso de aislamiento de fibroblastos. Por último el tejido resultante de los dos procesos de digestión también fue cultivado de la misma forma. Cuando los cultivos llegaron a una confluencia del 50%, el FBS del medio se redujo al 10%. La amplificación de los cultivos se realizó antes de llegar a confluencia (siempre en placa de poliestireno), y renovándose el medio de cultivo cada dos días. Una vez amplificado el cultivo, se prepararon stocks congelados de células. Las células se recogieron del cultivo y se criopreservaron en una solución de DMSO al 10 %, bajando la temperatura de forma gradual mediante el sistema *Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers* (NALGENE Labware, Rochester, NY), para finalmente preservarse en nitrógeno líquido (-195,8°C). La confirmación de que las células aisladas eran fibroblastos, se realizó mediante la inmunocitoquímica de vimentina y de CD90 (*Thy-1 membrane glycoprotein*) (ver apartado inmunocitoquímica), y para los análisis se utilizaron fibroblastos entre el 3^{er} y el 6^o pasaje. Todos los reactivos fueron obtenidos de Invitrogen/Gibco excepto en los casos indicados.

4.1.3.2 Ensayo de senescencia

Para la evaluación de la senescencia celular sembramos las células en placas de poliestireno de 6 pocillos (2×10^4 células/pocillo) durante 24 horas. Utilizamos el "Senescence Cells Histochemical Staining Kit" (Sigma-

Aldrich) para valorar la actividad β -galactosidasa a pH 6.0. La actividad de la β -galactosidasa deriva del aumento de su contenido lisosomal en células senescentes, lo cual posibilita su detección a pH sub-óptimo 6.0 (pH 4.0 es el óptimo). Bajo estas condiciones la actividad β -galactosidasa no es detectable en células quiescentes o proliferativas.

El procedimiento siguió las instrucciones del fabricante. Tras aspirar el medio de cultivo y lavar con PBS, las células se incubaron en una solución de fijación durante 6-7 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron en una solución compuesta por el sustrato X-gal, incubando a 37 °C sin CO₂ (ya que la técnica es sensible a los cambios de pH). Tras aspirar la solución de tinción y añadir PBS, evaluamos al microscopio el marcaje (células teñidas en azul) y calculamos el porcentaje de células senescentes.

4.1.3.3 Ultra-estructura celular. Microscopia electrónica.

Las células (1×10^6) se fijaron en una solución de 0.5% glutaraldehído, cacodilato sódico 0.1 M, CaCl₂ 8 mM, y 0,2% ácido tánico durante 1 h. A continuación, se sustituyó esta solución por otra compuesta de 2.5% glutaraldehído, 4% paraformaldehído, cacodilato sódico 0.1 M, y CaCl₂ 8 M, durante 2 h a 4°C de temperatura. Posteriormente, las células se fijaron con tetróxido de osmio (OsO₄), deshidratadas por una serie graduada de etanol, y a continuación, incluidas en resina epoxi. Se realizó la tinción de secciones ultrafinas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM1010 (TEM) (JEOL, Ltd., Tokio, Japón) en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona (Campus Casanova).

4.1.3.4 Inmunocitoquímica (ICQ)

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio en el estudio 4.1, y en cubreobjetos de vidrio y en placa de poliestireno (solo en el caso de las adhesiones focales) en el 4.2 (1×10^4 células/pocillo). Las células sembradas se incubaron en DMEM-10% FBS durante 36 h para permitir una buena adaptación y adherencia al sustrato. Para la ICQ, las células se lavaron con PBS y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 30', tras lo cual se llevó a cabo un bloqueo de la autofluorescencia del fijador (*quench*) incubándolas en glicina 20 nM durante 15 minutos. A continuación, tras aspirar la solución anterior, las células se permeabilizaron añadiendo 0,05% Triton X-100 durante 5 min y se efectuaron diferentes ICQ incubando las células, durante 1 hora y a temperatura ambiente, con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en 5% BSA-PBS: monoclonal de ratón anti-vimentina (dilución 1:40, ab-2 clon V9; Dako), monoclonal de ratón anti-CD90 (1:25; Serotec), o monoclonal de ratón anti- α SMA (1:40, CBL171; Chemicon/ Millipore). Después de la incubación con el anticuerpo primario las células se lavaron con PBS y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo Alexa-Fluor 488 (1: 100 en 0.05% Triton X-100 en PBS; Invitrogen) durante 1 hora en oscuridad. Al finalizar la incubación, se realizaron lavados con PBS, se trataron las células con RNAasa (0,5 mg/ml; Applied Biosystems / Ambion, Austin, Texas) durante

15 minutos a 37°C y se tiñeron los núcleos con yoduro de propidio (10 mg/ml; Molecular Probes). Finalmente, las preparaciones se montaron con Mowiol 4-88 (Calbiochem, VWR International Ltd).

Los filamentos de actina y contactos focales se visualizaron con el kit comercial FAK100 (Chemicon/Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células sembradas en las condiciones ya definidas se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 en PBS y se bloquearon en solución de bloqueo. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-vinculina (1:75, MAB3574), seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa-Fluor 488 (1/400) junto a faloidina conjugada con TRITC (1/500). Después de realizar lavados con PBS, se tiñeron las células con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; marcaje nuclear) y se realizó el montaje.

Por último, en los fibroblastos obtenidos de biopsias musculares, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios adicionales: policlonal de conejo anti-FAK (1:75, RB-477-PO; Neomarkers), policlonal de conejo anti-paxilina (1:75, AB3794; Chemicon/Millipore) y monoclonal anti-tensina (1:75, MAB1649; Chemicon/Millipore), este último para localizar *adhesiones fibrilares*. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Anti-IgG de ratón conjugado con Alexa-Fluor 488, anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 568 y anti-IgG de conejo conjugado a Alexa-Fluor 568 (todos 1:100; Invitrogen). El procedimiento de las ICQ (bloqueo, incubaciones de anticuerpo primario y secundario) fue tal como se especifica en párrafos anteriores.

Las células se analizaron por microscopía confocal láser o microscopio de fluorescencia (Leica TCS-NT-UV; Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) en la UAT-VHIR (Unitat d'Alta Tecnologia del VHIR). Como control de la especificidad del marcaje se tomaron las preparaciones sin anticuerpo primario. Los filamentos de actina y contactos focales fueron analizados con el software libre de análisis de imagen *ImageJ*.

4.1.3.5 Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular se determinó de varias formas:

- *Cálculo del tiempo de duplicación celular*: Se calculó de la siguiente manera: $[(n.^{\circ} \text{ de células recolectadas}) - (n.^{\circ} \text{ de células sub-cultivadas})] / \ln 2$.
- *Ensayo de incorporación de timidina tritiada*: Se sembraron 1×10^4 células / pocillo y se dejaron 36 horas en DMEM-FBS 10%, para permitir la adhesión adecuada al sustrato. A continuación se incubaron en DMEM-FBS 2% durante 24 horas para sincronizar el ciclo celular de las células, y se trataron con 0,5 Ci /ml de [H^3]-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) durante 18 horas. Después de la incubación, se lavaron las células con PBS y se recuperaron por tripsinización. Se precipitó el DNA con ácido tricloroacético frío y se llevó a sequedad durante 20 h dejado al aire en un flujo laminar. Por último, el DNA precipitado se disolvió en *NCS tissue solubilizer* (Amersham Pharmacia Biotech), para ser cuantificado en un contador β de centelleo.

- *Ensayos de incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)*: Se realizaron dos tipos de ensayo. Uno consistió en el ELISA colorimétrico de Calbiochem. En este caso se sembraron 5×10^3 células/pocillo, y se siguieron las indicaciones del fabricante para su realización. El segundo se trató de una ICQ para observar la incorporación del BrdU a las células. En el análisis se sembraron 1×10^4 células/pocillo en cubreobjetos de vidrio y se incubaron con una solución de BrdU $10 \mu\text{M}$ en DMEM-FBS 10% durante 12 h (en este caso no se sincronizaron las células). A continuación las células se lavaron con PBS, se fijaron en 4% paraformaldehído durante 30 minutos, se bloqueó la autofluorescencia del fijador con NH_4Cl 50 mM 20 minutos, se permeabilizaron con 1% Triton X-100 15 minutos, se trataron con 50 μl de DNAasa (1U/l, 90 minutos, 37°C) para hacer accesible el BrdU al anticuerpo primario, y se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se incubaron las células con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-BrdU (1: 100 en 1% BSA-PBS; Calbiochem) y se finalizó la ICQ como se describe en el apartado de la inmunocitoquímica (4.1.3.4).

4.1.3.6 Ensayos de migración celular

Se realizaron dos tipos de ensayo:

- *Ensayo de cicatrización in vitro (scratch test)*: Las células (1×10^5 /pocillo) se sembraron en pocillos recubiertos de fibronectina (10 mg/ml; Boehringer Ingelheim GmbH) con marcas en la parte inferior-exterior para ser utilizadas como puntos de referencia durante la adquisición de la imagen (263). Las células se incubaron con DMEM-FBS al 10% durante 36 horas, y para reducir al mínimo la proliferación se cambió el medio a 2% de FBS durante 12 horas. Para realizar el ensayo se hizo un aclarado en forma de banda (una “herida lineal” en la superficie del cultivo celular, con la ayuda de una punta blanca estéril) lo más regular posible y que atravesaba todo el pocillo de forma diametral. A continuación se lavó el cultivo con DMEM (3 veces), y se incubó con DMEM-FBS 2%, 24 horas. Las placas fueron examinadas periódicamente y fotografiadas (Nikon Eclipse TS100, Tokio, Japón) y las imágenes obtenidas se analizaron con el software libre *ImageJ*.
- *Ensayos de transmigración en transwells* (264): Los insertos de la cámara superior del *Transwell Costar* (inserto de $8.0 \mu\text{m}$ de poro; Corning) se recubrieron con colágeno tipo I (30 mg/ml; Calbiochem) o fibronectina (30 mg/ml; Boehringer Ingelheim). En estos insertos se sembraron las células (5×10^3) con DMEM-FBS 2% en la cámara superior, y se incubaron durante 12 horas para observar su migración hacia la parte inferior del inserto/cámara. La cámara inferior contenía DMEM-FBS 10% como agente quimiotáctico para dirigir la migración hacia ella. Después de la incubación, se rasparon las células no migradas (parte superior del inserto) y se realizó una tinción cristal violeta (265) en las células migradas a la parte inferior. Para realizar la tinción se fijaron las células en una solución de 80% metanol (v/v) de 30 minutos, se tiñeron con cristal violeta (0.5% w/v en 20% metanol (v/v), 5 minutos), se eliminó el exceso de tinción con lavados de PBS (4x), y se recuperó la tinción retenida por las células incubándolas con citrato de sodio (0.1 N (w/v)/

50% etanol (v/v), 10 minutos). El cristal violeta recuperado se pasó a una placa de 96 pocillos y se analizó por espectrofotometría (OD 570 a 590 nm).

4.1.3.7 Ensayo de adhesión al sustrato

Se llevó a cabo mediante un ensayo de centrifugación inversa. Las células ($1,5 \times 10^3$ / pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos, y se incubaron posteriormente en DMEM –FBS 2% durante 12 horas. Después del tiempo de incubación, la placa se centrifugó inversamente a 900×g durante 10 minutos, y las células que restaban adheridas todavía a la placa se valoraron mediante la tinción cristal violeta (266) (267).

4.1.3.8 Inducción de la apoptosis

Las células (2×10^4 /pocillo) se sembraron en cubreobjetos de vidrio y se dejaron adherir durante 12 horas en DMEM-FBS 10%. El medio se cambió a DMEM-FBS 2% y se mantuvo durante 12 horas más (nivel basal de apoptosis de las células del 2-3%, observado en estudios preliminares). A continuación las células se trataron con estaurosporina 0,1 μ M (16 h) (268) o con TNF α y cicloheximida (269) (TNF α / CHX, de 0,25:50 ng/mL; 72 h; Sigma). Las células fueron inspeccionadas morfológicamente, y la necrosis/apoptosis se evaluó mediante ICQ con el kit *Vybrant Apoptosis Assay kit n°2* (ThermoFisher Scientific; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V13245>) en el cultivo, mediante microscopía confocal láser. En el análisis, las células apoptóticas tempranas (inicio de la apoptosis) quedaban marcadas de color verde (debida a la unión de los fosfatidilserina de membrana a la anexina conjugada con el fluorocromo, que son translocados durante la apoptosis desde la parte citoplasmática de la membrana a la parte extracelular de esta), las células apoptóticas tardías con citoplasma rojo intenso (ioduro de propidio que difunde en membranas permeables), y las células necróticas con un nucleó de color rojo intenso. Las células cultivadas en DMEM-FBS 10% se utilizaron como controles negativos de apoptosis/necrosis.

Para examinar la fragmentación del citoesqueleto durante la apoptosis, 5×10^4 de células se sembraron en placas de cultivo de poliestireno de 60 mm y se trataron como se ha descrito anteriormente. Al final de la inducción apoptótica las células adheridas y las flotantes se combinaron, se lisaron con el kit de extracción subcelular *ProteoExtract subcellular proteome extracción kit* (Calbiochem; https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/ProteoExtract-Subcellular-Proteome-Extraction-Kit,EMD_BIO-539790) siguiendo las indicaciones del fabricante, y se analizaron mediante inmunoblotting (ver sección inmunoblotting).

4.1.4 Inmunoblotting

Para el análisis por transferencia Western o inmunoblot, las células o los tejidos crio-preservados (congelados después de su extracción con nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C) se homogeneizaron con tampón RIPA [Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0,25% deoxicolato de sodio, 0,1% dodecil sulfato sódico (SDS), EDTA1 mM, más inhibidores de proteasas; *Protease Inhibitor Cocktail Set III*,

Calbiochem]. A continuación se centrifugó el homogenizado ($12.000 \times g$, 30 minutos, $4^\circ C$) para recuperar la fracción soluble proteica que se analizó con posterioridad. La concentración proteica de la fracción soluble se determinó mediante el ensayo del ácido bicinónico (*BCA protein assay*; Pierce, Thermo). Cantidades iguales de muestra (para cada análisis en particular) se resolvieron por electroforesis en el sistema Laemmli SDS-PAGE en condiciones reductoras (120 V) (270), para transferirse más tarde a membranas de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF) (60 V, $4^\circ C$, 20 h). Una vez realizada la transferencia, esta se verificó mediante la tinción rojo *Ponceau* (271). Antes de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se bloquearon con tampón TBS-T [0,9% NaCl, Tris-HCl 0,02 M (pH 7,5), 0,05% Tween-20, 5%-10% de leche desnatada, 1 hora a temperatura ambiente]. A continuación las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal de ratón anti-vimentina (1: 700, ab-2 clon V9; Neomarkers / Lab Vision, Thermo Fisher Scientific Inc), monoclonal de ratón anti-poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (1:125; BD Biosciences), monoclonal de ratón anti-pan-actina (1: 500; Neomarkers / Lab Vision Corp.), policlonal de conejo anti- α -fodrina (1: 700, 2122 Asp1185; Cell Signaling), policlonal de conejo anti-caspasa-3 (1: 700; Cell Signaling), monoclonal de ratón anti- β -tubulina (1:3000, 5H1; BD Biosciences), policlonal de conejo *anti-microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) (1:1000, PM036; MBL Medical & Biological Laboratories Co); monoclonal de ratón anti-flotillin-2 (1: 5000; BD Biosciences), policlonal de conejo anti-MyoD (1:200; C-20: Santa Cruz Biotechnology) y policlonal de conejo anti-miogenina (1:200, M-225; Santa Cruz Biotechnology). La detección del anticuerpo primario se realizó con anticuerpos secundarios apropiados conjugados con la peroxidasa de rábano (*horse radish peroxidase*, HRP) en tampón TBS-T, usando el kit de quimioluminiscencia mejorada (ECL™ kit, Amersham Pharmacia Biotech). Las bandas se cuantificaron con un analizador de imagen digital (Quantity One Quantitation Software; Bio-Rad), en una película de rayos X no saturada. En determinados casos se utilizó el kit de extracción de proteínas *ProteoExtract subcellular proteome extraction kit* (Calbiochem) para obtener fracciones enriquecidas de proteínas citosólicas, de membrana/orgánulos, nucleares, y del citoesqueleto (272).

4.1.5 Inmunoprecipitación

En el caso de la inmunoprecipitación, se homogeneizaron muestras de tejido crio-preservadas (~ 500 mg) o células ($\sim 1,5 \times 10^6$) con el tampón de extracción [Tris HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, $Na_4P_2O_7$ 2,5 mM, β -glicerolfosfato 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, y *Protease Inhibitor Cocktail Set III*; Sigma)], y se centrifugaron a $12.000 \times g$, 15 minutos a $4^\circ C$, para obtener las proteínas solubles en el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo BCA (Pierce). Para realizar la inmunoprecipitación se adicionó un anticuerpo policlonal de conejo para precipitar proteínas fosforiladas [phospho-(Ser/Thr) Phe polyclonal antibody; Cell Signaling; 1:100], a $750 \mu g$ de proteína de sobrenadante de tejido o a $500 \mu g$ de proteína sobrenadante de células, incubándose en agitación (20 h, $4^\circ C$). A continuación, se adicionaron microesferas (*beads*) de proteína A-agarosa (1:20; v/v) (Roche Applied Science) diluidas en PBS (1:1; v/v), y la mezcla muestra-*beads* se incubó en agitación (5 horas, $4^\circ C$) para aglutinar las proteínas fosforiladas unidas al anticuerpo. Las *beads* y la proteínas fosforiladas aglutinadas se precipitaron por centrifugación ($12.000 \times g$, 1 minuto) y se lavaron ($12.000 \times g$, 30 segundos $\times 3$). Se

adicionaron 25 μ L de tampón de muestra SDS 3x [Tris-HCl 187,5 mM (pH 6,8 a 25 °C), 6% SDS (w/v), 30% glicerol, DTT 150 mM, 0,03 % w/v bromofenol] al precipitado y se desnaturalizó a 100 °C (10 minutos'). Las alícuotas resultantes del proceso de inmunoprecipitación fueron analizadas mediante SDS-PAGE y el inmunoblot anti-vimentina, tal como se ha descrito en el apartado anterior.

4.1.6 Electroforesis de las isoformas de las cadenas pesadas de la miosina

La valoración semi-cuantitativa de la expresión de las diferentes cadenas pesadas de la miosina en las muestras de tejido muscular se realizó por medio de una separación electroforética en condiciones especiales, que permite la detección de concentraciones relativas de las diferentes isoformas en fibras mixtas (273).

El músculo biopsiado congelado (50-80 mg) a -80°C se homogenizó en frío en 9 volúmenes de tampón de extracción (sacarosa 250 mM, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, Tris-base 20 mM, pH 6.81) mediante un homogeneizador *rotor-estator* (*Polytron homogenizer, IKA T25 Digital Ultra Turrax; IKA-Werke*). Los lisados resultantes fueron de nuevo homogeneizados manualmente en un tubo esmerilado, y el lisado resultante fue usado para el lavado de las miofibrillas (273). A continuación, este homogeneizado se centrifugó a 10.000xg durante 10 minutos a 4°C y el precipitado fue resuspendido de nuevo en un tampón de lavado (KCl 175 mM, EDTA 2 mM, 0.5% Triton X-100, Tris-HCl 20 mM, pH 6.8) y centrifugado otra vez. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue descartado de nuevo, y el precipitado fue resuspendido en un volumen adecuado (según la masa de tejido inicial) de tampón de resuspensión final (KCl 150 mM, Tris base 20 mM, pH 7.0). La concentración final de proteína fue determinada mediante el ensayo *BCA*.

Las isoformas de la cadena pesada fueron separadas según lo descrito anteriormente en la bibliografía (274; 275) mediante una SDS-PAGE modificada. El gel separador (*resolving gel*) contenía un 30% glicerol, 8% acrilamida, Tris-HCl 200 mM (pH 8.80), glicina 100 mM, y 0.4% SDS, mientras que el concentrador (*stacking gel*) contenía un 30% glicerol, 4% acrilamida, Tris-HCl 70 mM, pH 6.80, EDTA 4 mM, y 0.4% SDS. Para la polimerización de ambos tipos de geles se adiciono TEMED y persulfato de amonio en concentraciones finales de 0.05 % y 0.1 %, respectivamente. La electroforesis de las muestras se realizó mediante un sistema de dos tampones de electroforesis, uno superior (0.12% β -mercaptoetanol, Tris-base 300mM, glicina 450mM, y 0.3% SDS; y otro inferior (Tris -base 50 mM, glicina 75 mM, y 0.05% SDS). Dos μ g de las miofibrillas lavadas de cada muestra fueron diluidos en 2x tampón Laemmli (5 % β -mercaptoetanol), desnaturalizados a 96°C durante 5 minutos, cargados en el gel, y resueltos mediante electroforesis (140 V, 18 h, 4-8 °C). Por último, los geles se tiñeron con tinción de plata (276) y las imágenes capturadas por escáner a una resolución de 300 dpi (ImageScanner, controlado por el software LabScan 6.00; GE Healthcare).

4.1.7 Análisis de la expresión de los proteoglicanos

4.1.7.1 Extracción de RNA y RT-PCR

El análisis de la expresión génica se analizó de forma semi-cuantitativa mediante *RT-PCR* (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) (277). Para su realización se extrajo RNA total del tejido criopreservado (congelados después de su extracción con nitrógeno líquido y mantenido a -80°C después de su extracción) mediante el método de un solo paso con TRIzol® (278) (extracción fenol-cloroformo) (Invitrogen, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante (279). La calidad y cantidad del RNA se evaluó con el *2100 Bioanalyzer* (Agilent, Madrid, España). El RNA se transcribió de forma reversa con la transcriptasa inversa *Superscript II* (Invitrogen) y cebadores (*primers*) aleatorios para conseguir el DNA complementario (cDNA). Las reacciones de PCR se realizaron a partir del cDNA producido, con cebadores (*primers*) específicos (Tabla 5) y *1U de Taq ADN polimerasa* (Invitrogen). Los productos de PCR se resolvieron y detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1-2% que contenían bromuro de etidio, y las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría (*Quantity One Quantitation Software™*; Bio-Rad, Barcelona, España). Los resultados se expresaron como la relación entre la intensidades del gen de interés y el RPL19 (gen de referencia) con la finalidad de normalizar las intensidades y minimizar los errores de exactitud (ej. carga del gel) dentro de cada gel y entre geles diferentes (280). Se establecieron controles negativos omitiendo en el proceso la transcripción inversa.

PCR primer sequences (exon) and conditions							
Gen	Official symbol	NCBI Reference Sequence	Primer sequence forward 5'→3'	Primer sequence reverse 5'→3'	tm (C°)	cycles	Product size (pb)
L19	RPL19	NM_000981	CAA TGC CAA CTC CCG TCA GC	CTT GGT CTC TTC CTC CTT GG	57.7	29	486
Decorin	DCN	NM_001920	ATG CCC AAA ACT CTT CAG GA	ATT CCG TAA GGG AAG GAG GA	59.0	29	234
Biglycan	BGN	NM_001711	GGA CTC TGT CAC ACC CAC CT	AGC TCG GAG ATG TCG TTG TT	59.0	33	159
Syndecan 1	SDC1	NM_001006946	CTT CAC ACT CCC CAC ACA GA	GAA ACC TCG GGG GAG AAT A	57.0	35	135
Syndecan 2	SDC2	NM_002998	TGA CTA CGC TTC TGC GTC TG	TGG GTC CAT TTT CCT TTC TG	57.0	32	222
Syndecan 3	SDC3	NM_001006946	GAG CCT GAC ATC CCT GAG AG	CCC ACA GCT ACC ACC TCA TT	57.0	33	211
Syndecan 4	SDC4	NM_002999	CCA CCG AAC CCA AGA AAC TA	TGG GGG CTT TCT TGT AGA TG	57.0	30	278
Versican 0	VCAN	NM_004385	CCA GCA AGC ACA AAA TTT CA	TTT CAG CCA TTA GAT CAT GCA C	58.0	33	174
Versican 1	VCAN	NM_001164097	TGA GAA CCA GAC AGG CTT CC	TTT CAG CCA TTA GAT CAT GCA C	58.0	37	166
Versican 2	VCAN	NM_001164098	CAC CCA CTG TGG AAG ACA AA	TCA CAC TGG TCT CCG CTG TA	59.0	33	234
Versican 3	VCAN	NM_001126336	TGA GAA CCA GAC AGG CTT CC	TCA CAC TGG TCT CCG CTG TA	59.0	36	167

Tabla 5. Primers utilizados en las reacciones de PCRs y las condiciones.

4.1.7.2 Análisis de la expresión del versicano mediante inmunoblot

Se homogenizaron fragmentos de tejido congelado (50-80 mg) en 10 volúmenes de tampón de extracción (urea 7 M, Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM y 0.5% Triton X-100, pH 7.4) con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail 1/100*, Sigma P8340) mediante un homogeneizador *rotor-estator* (*Polytron homogenizer, IKA T25 Digital Ultra Turrax; IKA-Werke*), y posterior incubación con agitación suave durante 1 hora, siendo todo el proceso realizado a una temperatura de 4°C . A continuación, el sobrenadante

fue recogido por centrifugación a 12.000xg, 30 minutos y a 4 °C, y la concentración de proteína fue determinada mediante el ensayo *BCA* (Pierce, Thermo). Para la observación de la isoformas de los versicanos libres de condroitín-sulfatos y heparan-sulfatos, los lisados se trataron con condroitinasa ABC que actúa sobre los enlaces que unen los condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, dermatan-sulfato y en menor medida sobre el ácido hialurónico (281). De este modo, alícuotas del sobrenadante de los homogenizados se llevaron a una concentración final de 2mg/mL con el tampón CH (Tris-HCl 40 mM, acetato de sodio 40 mM, EDTA 5 mM pH 8.0), y fueron tratadas con condroitinasa libre de proteinasas (Sigma; C3667) durante 8 h a 37°C (281). Para el inmunoblot, se cargaron cantidades iguales de proteína y se separaron mediante electroforesis (Laemmli) SDS-PAGE en condiciones reductoras (5% stacking gel; 8 % resolving gel). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 16 horas (271), se bloqueó la membrana durante 1 h en TBS-T y posteriormente se incubó durante 2 horas a 4° con el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-versicano (Abcam; ab177480 [EPR12277], diluido 1:1000 en TBS-T), que reconoce un dominio lectina en el extremo C-terminal presente en las 4 variantes del versicano (V0-V3) (282). Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa HRP (Sigma; A0545, dilución 1:2000 en TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección fue visualizada usando el sistema *Novex enhanced chemiluminescence detection system* (Thermo Fischer Scientific), y el análisis de las bandas obtenidas se elaboró con el software libre *ImageJ*. Una vez realizado el inmunoblot para las isoformas del versicano, se eliminó de las membranas (*stripping*) los anticuerpos unidos y de nuevos fueron incubadas con el anticuerpo primario anti β -tubulina como control de carga.

4.1.8 Análisis estadístico y representación gráfica

Los datos fueron cuantificados como la media \pm error estándar de la media (ESM). Las diferencias entre las medias de los grupos se analizaron mediante la prueba *t de Student* para datos no apareados o de forma no paramétrica con la prueba *U de Mann-Whitney* ($n < 6$). El *contraste F* se aplicó para identificar diferencias entre varianzas. Las variables categóricas se analizaron mediante *la prueba exacta de Fischer*. Mediante regresión lineal simple se evaluó la relación entre los índices TUNEL-PCNA y TUNEL-Bcl-2 (coeficiente de correlación de Pearson). El valor de significación estadística se situó en un valor de $P < 0,05$. Estos análisis se elaboraron con el paquete estadístico *Graphpad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc.).

En el análisis multivariante de la expresión de las diferentes genes de los proteoglicanos, se utilizó el análisis de componentes principales (*PCA: principal component analysis*) para poder realizar un análisis preliminar de la **capacidad predictiva** de la expresión diferencial de estas genes respecto a la patología de la hernia incisional. Es decir, ver como el conjunto de genes tenía el poder de distribuir de forma separada a los dos grupos de pacientes en estudio (283). El PCA es probablemente la más antigua y mejor conocida de las técnicas multivariantes. Fue presentada por Pearson (1901) (284), y desarrollada de forma independiente por Hotelling (1933) (285). Se trata de una técnica no-paramétrica de relativa simplicidad y robustez, resultado de la investigación en el álgebra lineal. La base del PCA es reducir la dimensionalidad de un grupo de datos en el que

existe un gran número de variables interrelacionadas, intentando retener al máximo posible la variación presente en él. Esta reducción se consigue transformando las variables en otro nuevo grupo de variables, **los componentes principales**, los cuales no están correlacionados, y que son ordenados de modo que el primero (primer componente; PC1) retenga la mayoría de la variación presente en la muestra en todas las variables originales (es decir, que explique el mayor % de las diferencias). El cálculo de los componentes principales se reduce a la solución de un problema de *eigen valor-eigen vector* por una matriz simétrica semi-definida positiva. El resultado final del PCA, de forma simple, es que se divide la matriz de datos inicial que representan las variables (proteoglicanos) y sus observaciones (pacientes) en dos nuevas matrices: una de factores de carga (*loadings, weight*) y otra de *scores* (o también llamados *components o factors*). La matriz de *scores*, resume las observaciones (pacientes), separa la señal de los datos del ruido de fondo y permite observar patrones, tendencias y agrupaciones o *clusters (de pacientes)*. La matriz de *loadings* (proteoglicanos), resume las variables y explica la posición en la gráfica de *scores (scores plot)*. Esto permite observar de forma sencilla correlaciones entre observaciones y variables. Por lo tanto, se pueden generar dos tipos de gráficas: una de los *loadings* (proteoglicanos) y otra de *scores* (pacientes). En nuestro caso, principalmente nos interesaba observar posibles agrupaciones de pacientes, por lo tanto utilizaríamos la gráfica de *scores*. Para mejorar esta visión de cómo se agrupan los pacientes entorno a las isoformas de los proteoglicanos, utilizamos el gráfico *biplot* que muestra la información de las variables (proteoglicanos) y las observaciones (pacientes) en una gráfica común, que tiene como ejes los dos primeros componentes principales (los que explican la mayoría de la diferencias). La proyección de los pacientes en las flechas que se generan en los gráficos da un valor original (escalado) de aquella variable, y su longitud indica la variancia de la variable. Además el ángulo entre las variables nos permite, de forma aproximada, ver la correlación entre ellas. Para realizar el análisis del PCA se utilizó el paquete *pcaMethods (Bioconductor)* (286) del lenguaje R (*R language and environment for statistical computing and graphics*; <https://www.r-project.org>).

4.2 Materiales y métodos. Estudio 5.3

4.2.1 Cultivo de fibroblastos del TCI de músculo esquelético en sustratos con rigideces reguladas

La rigidez (*stiffness*) del sustrato donde crecen las células modula su fenotipo en términos de morfología, adhesión, ciclo celular-diferenciación y supervivencia, todas ellas relacionadas entre sí. La variación del sustrato es percibida por la célula mediante señales de mecanotransducción que determinan respuestas específicas. Además la presencia de ligandos bioactivos en el sustrato (ej. fibronectina, colágeno), modulan adicionalmente la señal de la mecanotransducción (287).

Los sustratos blandos o *soft substrates* (con rigideces entre la estructura óseas y la del cerebro), en contraposición a los duros como las placas de cultivo de plástico (ej. poliestireno), permiten biomimetizar en cultivo las rigideces de los tejidos y órganos donde se encuentran las células *in vivo*, recreando sus características viscoelásticas. Esto hace posible recrear posibles situaciones patológicas modificando tanto la rigidez, como los diferentes ligandos inmersos en ellas. De esta forma, la respuesta de la expresión génica y proteica también se pueda aproximar a la del micro-entorno tisular *in vivo*. El material del sustrato influye directamente en la adhesión celular ya sea por la unión específica a él por la célula o por las propiedades hidrofóbicas del material. De igual forma la topografía, la rugosidad (textura de la capa superficial del sustrato), y se trata de un cultivo bidimensional o tridimensional, también modulan de forma diferencial el fenotipo celular. Los sustratos blandos, remarcablemente, permiten también el análisis cuantitativo de la deformación del sustrato realizada por la célula (288).

La forma de ajustar la rigidez de un sustrato blando se realiza mediante uniones entrelazadas o *cross-linking* del polímero que conforma el sustrato. Diferentes métodos de *cross-linking* son utilizados (ej. químico, fotónico), además de la combinación de diferentes sustratos o moléculas para optimizar los requerimientos de las células en cultivo. Diversos tipos de sustratos blandos se utilizan actualmente ofreciendo un rango de rigideces característico y propiedades biológicas, biodegradables o no. Entre ellos se encuentran los geles de colágeno, las matrices de ácido hialurónico (con la ayuda del polietilenglicol (PEG)-dicrilato para el *cross-linking*), hidrogeles (redes tridimensionales de polímeros solubles en agua) de PEG, hidrogeles de poli(acrilamida) (PAA) (necesariamente funcionalizados debido a su origen no biológico), y el elastómero de polidimetilsiloxano o dimeticona (PDMS). Este último tiene unas excelentes propiedades ópticas debido a ser incoloro y transparente, lo que facilita los estudios celulares en cultivo. La rigidez ofrecida por el PDMS es superior a los geles de colágeno y los geles de PAA. Además, la maleabilidad del PDMS le permite generar sustratos bidimensionales, con topografía diversa, o incluso tridimensionales que mimetizan también la estructura de tejidos y órganos (288; 289).

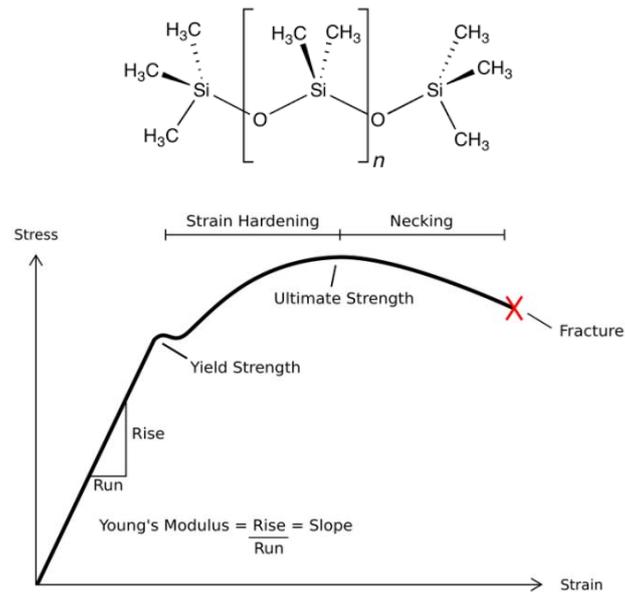


Figura 22 . Monómero de una cadena lineal de polidimetilsiloxano y ejemplo de curva teórica de stress-strain de un material. En esta se puede observar que el primer tramo de la curva cumple la ley de Hook, en donde el material tiene un comportamiento elástico ideal (donde se calcula el módulo de Young. A partir de este punto el comportamiento se vuelve más complejo. Yield strength: intensidad de estrés a partir del cual el material se deforma plásticamente; ultimate strength: el máximo estrés el cual puede soportar un material mientras está siendo estresado (alargamiento) antes de romperse; Necking: situación en donde los esfuerzos al ser tensionado un material se producen en una región pequeña de este (ej. estiramiento de un polímero mediante tensión que hace disminuir la sección de área); Strain hardening: endurecimiento de un material por deformación plástica; por re-estructuración molecular interna.

La rigidez de un material representa la capacidad de este de resistir la deformación. Esta rigidez se describe de forma habitual por la pendiente de la región lineal de la curva de estrés-esfuerzo (a la deformación), también llamada *el Young's modulus* cuando se realiza bajo tensión (Figura 22). En esta curva describe como un sustrato se deforma (ej. esfuerzo a la deformación: longitud final-longitud inicial) al aplicar una determinado estrés (ej. tensión: kPa). Para describir la pendiente en otras regiones de la curva estrés-esfuerzo, a menudo se define o calcula un módulo tangencia que está asociado a un valor de estrés determinado. En el caso de los tejidos biológicos, su estructura no es totalmente elástica no cumpliendo la ley de Hook, si no que se comportan de forma *viscoelástica*. Así los tejidos tienen un comportamiento viscoso (tiempo dependiente) capaz de resistir en el tiempo un estrés aplicado inicialmente, para posteriormente tener uno elástico. Los materiales viscoelásticos poseen las características de estrés-relajación, de deslizamiento (*creep*), de la sensibilidad al ratio de esfuerzo, e histéresis. El fenómeno estrés-relajación ocurre en un tejido cuando es estirado, mantenido a una longitud fija, y con el paso del tiempo el estrés interior del tejido disminuye (relajación). El deslizamiento (*creep*) ocurre cuando se aplica un estrés constante en el tiempo, y el tejido se alarga a medida que avanza este. La sensibilidad a la ratio de esfuerzo, es la sensibilidad del coeficiente de la deformación de un material respecto al tiempo. Por último, la histéresis representa la pérdida de energía debida a la fricción interna (290).

En nuestro caso se utilizó el PDMS como sustrato blando para poder realizar los ensayos en donde modificar el comportamiento de los fibroblastos modulando la rigidez del sustrato. Como se comentó anteriormente, la longitud y enlaces entre las diferentes cadenas lineales de PDMS alteran las propiedades reológicas del polímero, permitiendo diferentes rigideces, biomimetizando la superficie donde crecen los fibroblastos en cultivo.

De forma concreta, en el ensayo se utilizaron sustratos bidimensionales no-degradables de PDMS incorporados a cubreobjetos de 20x20 mm o placas de cultivo 35 mm (*Excellness Biotech*) con diferentes propiedades viscoelásticas, de forma que el *modulus* elástico de Young era de: 2, 5, 10, 30 y 100 kPa. Además, los sustratos de PDMS fueron funcionalizados con fibronectina humana ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; Sigma) (siguiendo las indicaciones de fabricante *Excellness Biotech*), y se usaron cubreobjetos (vidrio-sílice) cubiertos o no de fibronectina como sustrato de referencia o control (1 GPa teórico de rigidez).

En estos ensayos se utilizó una línea celular representativa de no-FHIs y otra de FHIs procedentes ambas del TCI de músculo (entre los pasajes 4 y 8), sembrándose a una densidad celular de $500 \text{ células}/\text{cm}^2$ en cubreobjetos de 20x20 mm y $10^3 \text{ células}/\text{cm}^2$ en placa de cultivo de 35 mm, si no se indica otra forma (ver obtención de los fibroblastos del TCI en el apartado 4.1.3.1).

4.2.2 Inmunocitoquímica de los fibroblastos (ICQ)

Los fibroblastos se sembraron en los cubreobjetos de vidrio cubiertos con sustratos de PDMS de rigideces reguladas durante 48 h. La ICQ para vimentina se realizó siguiendo los mismos pasos del apartado 4.1.3.4. Los filamentos de actina y contactos focales se visualizaron con el kit comercial FAK100 (Chemicon/Millipore) y se analizaron de la misma forma descrita en el apartado 4.1.3.4.

4.2.3 Ensayo de proliferación celular

El estudio de la proliferación fue realizado mediante el marcaje con EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). Con su incorporación al DNA se cuantifica de forma directa la síntesis de DNA general, y la síntesis de DNA en la fase S del ciclo celular. Previamente se utilizó la metodología con BrdU, pero con el objetivo de mejorar el análisis de la proliferación mediante nucleótidos marcados/modificados se cambió a la metodología con EdU. Esta metodología es más sencilla y reproducible que la utilizada con el BrdU, ya que el EdU se incorpora al DNA y mediante una sencilla reacción es marcado con un fluorocromo estable como el *Alexa Fluor*[®], evitando los pasos de permeabilización y la necesidad de un anticuerpo primario y secundario. Concretamente se utilizó el kit *Click-iT Plus EdU AlexaFluor 488 Imaging Kit* (C10637, Molecular Probes / ThermoFisher Scientific; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10637>) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células se cultivaron sobre los sustratos durante 36 horas y se incubaron con la solución de EdU (20mM) durante 12 horas (pulso de marcaje). A continuación se fijaron con 4% formaldehído, se lavaron con 3% BSA en PBS (w/v), y se permeabilizaron con 0.5% Triton en PBS (v/v). Seguidamente se efectuó la detección de la

incorporación de EdU incubando las preparaciones con el cocktail de reacción (*Click-IT Plus reaction cocktail*), que contenía AlexaFluor 488 *picolil azida*, y los núcleos se marcaron con Hoechst 33258 (10 µg/ml). La detección de EdU incorporado se analizó mediante microscopio de fluorescencia (Leica TCS-NT-UV; Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) en la UAT-VHIR. Se analizó un mínimo de 300 células por cubreobjeto (4 en total, que representaban 4 réplicas biológicas) para la cuantificación. El número de células EdU-positivas se expresó como su porcentaje respecto al total de las células en el cultivo.

4.2.4 Ensayo de apoptosis

Los fibroblastos se cultivaron sobre los sustratos a diferentes rigideces durante 48 horas y a continuación fueron teñidos con el kit de detección de apoptosis *Promokine apoptotic/necrotic/healthy cells detection kit* (CA707-30018, *PromoCell*; <http://www.promokine.info/products/apoptosis/apoptotic-necrotic-cell-detection-kits/>) siguiendo las instrucciones del fabricante. El mecanismo de detección es el mismo que el que se describió en el punto 4.1.3.8 (291): 1) Las moléculas de fosfatidilserina de la membrana citoplasmática son translocadas hacia la parte extracelular durante la apoptosis y son reconocidos por una anexina conjugada a un fluorocromo (verde); 2) y un fluorocromo (rojo) permeable a la membrana dañada citoplasmática y nuclear indica las células apoptóticas tardías/ necróticas. En este caso, este fluorocromo de detección de células necróticas es el homodímero de etidio III (*EthD-III*). El *EthD-III* es una sonda de ácido nucleícos cargada positivamente, siendo las células vivas o apoptóticas no permeables a él. En cambio, sí tiñe las células necróticas con un rojo intenso. Esto hace que sea una mejor alternativa al yoduro de propidio por su alta afinidad al DNA, por su mejor intensidad de emisión, y por la impermeabilidad específica descrita. De esta forma, las células sanas se marcan de color azul (Hoechst 33342), las apoptóticas de verde (con el conjugado de anexina-fluorocromo), las apoptóticas tardías con un color verde y rojo tenue, y las necróticas con un rojo intenso nuclear (*EthD-III*). Se analizó un mínimo de 300 células por cubreobjeto (4 en total, que representan 4 réplicas biológicas). El número de células sanas/apoptóticas/necróticas se expresó como su porcentaje respecto al total de células en el cultivo.

4.2.5 Análisis de la actividad MMPs de los cultivos

La evaluación de la actividad MMPs de los medios de crecimiento condicionados de los cultivos (medio de cultivo con el que crecen las células y que acumula las moléculas secretadas) se realizó mediante zimografía. La zimografía es una técnica electroforética que permite observar la actividad enzimática (proteolítica en nuestro caso) de una muestra al ser resuelta en una electroforesis, y determinar a qué peso molecular está relacionado. En el caso de las MMPs, el gel es co-polimerizado con el sustrato (ej. gelatina), se realiza una electroforesis y el gel se incubó en unas condiciones adecuadas para que actué la actividad MMPs. En el último paso se tiñe el gel (ej. Azul de Coomassie) y se observan las áreas sin tinción a unos determinados pesos moleculares, debido a la acción de las MMPs que han eliminado el sustrato (28).

Para obtener los medios condicionados, los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo de 35 mm en los sustratos a estudiar. Después de 24 h, se cambió el medio por uno fresco que se mantuvo durante 48 horas

para medir los cambios en la actividad MMP2 y -9 en los medios condicionados. Como referencia se utilizaron medios condicionados de células cultivadas en placas de poliestireno, con y sin fibronectina. Las zimografías se realizaron de la siguiente forma: cantidades iguales de proteínas diluidas en tampón Laemmli no-desnaturalizante fueron separadas en geles SDS-PAGE co-polimerizados con gelatina (7.5%, 1.5 mg/ml). Después de una serie de lavados con soluciones que incluyeron 2.5% Triton X-100, los geles se incubaron a 37°C durante 22 horas en un tampón sustrato que habilita la actividad proteolítica y posteriormente se tiñeron en una solución de 0.2% Coomassie blue (w/v) en 40% isopropanol (v/v) (194). La actividad proteolítica fue cuantificada por densitometría después de escanear los geles (*Quantity One Quantitation Software™*). Cuatro replicas biológicas se realizaron por grupo.

4.2.6 Análisis estadístico y representación gráfica

Los datos fueron cuantificados como la media \pm error estándar de la media (ESM). Las variables categóricas se analizaron con la prueba *exacta de Fischer* para realizar comparaciones entre grupos para una misma categoría. Para identificar los efectos de los factores de grupo (no-HI vs. HI) y sustrato, se usó el análisis de ANOVA de dos factores, seguida por un post-hoc test Tukey de comparaciones múltiple (las diferencias significativas de los post-hoc test *Tukey* se indican en las figuras). Cuando el análisis de ANOVA de dos factores determinó que existía una fuerte influencia de unos de los factores, se aplicó un ANOVA de ese factor por motivos explicativos. En el caso del análisis morfológico (adhesiones focales y citoesqueleto de actina) se realizó una réplica biológica y se consideró cada cultivo celular de cada grupo como una población única (cada célula es un individuo de la población), analizándose entre 20-37 células por condición (292). En el resto de análisis se realizaron 4 réplicas biológicas de una misma línea celular, por grupo. Las diferencias entre las medias de los grupos se analizaron mediante la prueba *t de Student* no aparejada, o de forma no paramétrica con la prueba *U de Mann-Whitney* ($n < 6$). Las diferencias se consideraron significativas con una $P < 0.05$. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software libre estadístico R (*R language and environment for statistical computing and graphics*; <https://www.r-project.org>).

En el análisis de la arquitectura de los microfilamentos de actina, se utilizó el diagrama de radar o spider para ofrecer una visión global e integradora de las diferentes características de los fibroblastos según el sustrato donde crecían. El diagrama de radar o spider es una representación de datos multivariantes bidimensional, en donde todos los ejes de todas las variables cuantitativas parten de un punto central común. Permite observar como las diferentes variables definen un polígono, según la magnitud de estas, caracterizando a una población a estudio de otra (293).

5 Resultados

Hay una necesidad urgente de encontrar nuevos marcadores (celulares y moleculares) que permitan avanzar en el abordaje de la HI más allá de un acercamiento técnico-quirúrgico. Su hallazgo facilitaría la estratificación de pacientes, especialmente en los estadios más precoces (preventivos), y contribuiría a mejorar los biomateriales actuales. Con esta intención, y partiendo del estado del arte en relación al conocimiento de la enfermedad, nos hemos concentrado primero en estudiar la fascia y, después, el músculo esquelético (especialmente el tejido conectivo intramuscular) de pacientes con HI, contrastando los resultados obtenidos con aquellos derivados de un grupo de pacientes control (comparable en edad, sexo y comorbilidades). Hemos utilizado muestras de tejido y fibroblastos derivados de cultivos primarios. Finalmente, y en continuidad con el estudio en músculo esquelético, hemos cultivado los fibroblastos primarios en presencia de sustratos con rigideces reguladas. La presentación de resultados sigue este criterio evolutivo experimental.

5.1 Caracterización de la fascia (tejido y fibroblastos primarios) de pacientes afectos de hernia incisional

Los resultados obtenidos en un primer estudio focalizado en la fascia de la pared abdominal de pacientes, revelaron nuevos agentes celulares y moleculares novedosos, y a nuestro parecer con interés potencial para la fisiopatología de la HI, mereciendo el crédito de la revista *The American Journal of Pathology*, órgano oficial de la *American Society for Investigative Pathology* (www.asip.org) que escogió el artículo para su portada del mes de junio del año 2011 [Díaz R et al., DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.02.044] (294).

5.1.1 Cambios degenerativos en la fascia de los pacientes afectos de HI

En una primera fase, se realizó un estudio histológico para detectar posibles alteraciones específicas en pacientes con HI. La principal conclusión fue que las secciones de fascia de pacientes afectos de HI mostraban una MEC desorganizada y menos compacta, con una reducción de la densidad de fibroblastos respecto a las muestras del grupo control no-HI (HI: 207 ± 7 células/campo; no- HI: 372 ± 12 células/campo; $P < 0.001$), respecto a la fascia de los pacientes no afectados por hernia incisional (no-HI; control o de referencia) (Figura 23). Además, a menudo los fibroblastos de HI mostraban una forma redondeada o alargada, sin contacto aparente con la MEC circundante. La tinción de azul alcian fue más intensa en los pacientes con HI (análisis semi-cuantitativo expresado en porcentajes: no-HI: +60%; ++40%; IH: +10%, ++30%, +++60%; (Figura 23, E y F). El marcaje de α -SMA quedó circunscrito a las paredes vasculares, y no se observaron miofibroblastos (Figura 23, K y L). Tampoco se observó la presencia de componente inflamatorio, en las tinciones de PAS (Figura 23, G y H), y por inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos siguientes: CD3, CD20, CD45, CD68 y CD138 (datos no mostrados).

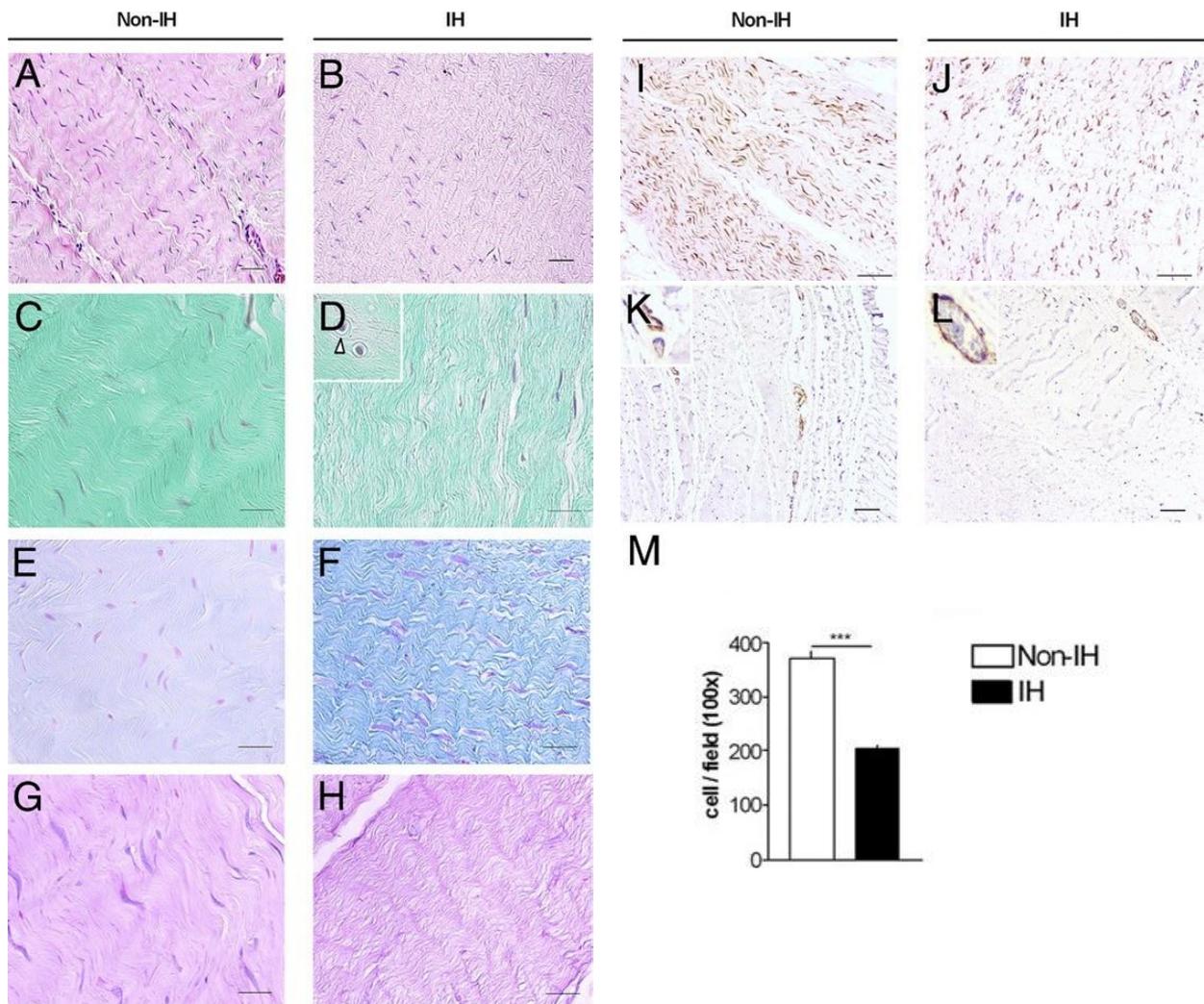


Figura 23. Características histológicas de la fascia. Secciones representativas de muestras de pacientes con hernia incisional (IH) y pacientes control (no-IH), teñidas con H&E (A y B), Tricrómico de Masson (C y D), Azul alcian (E y F), PAS (G y H), y anti-vimentina (I y J). En la fascia de HI, los fibroblastos tienden a ser redondeados (triángulo), y algunos a estar aislados, aparentemente sin contacto con la MEC circundante (D, inserción); K y L: tinción inmunohistoquímica para α -SMA. Magnificación: H&E, vimentina, and α -SMA, 100x, barra de escala = 100 μ m; Tricrómico de Masson y Azul alcian, 400x, barra de escala = 50 μ m. M: Fibroblastos/campo cuantificados en la tinción H&E (media \pm ESM) de pacientes control no-HI (n=20) pacientes con HI (n=21). ***P < 0.001, prueba t de Student.

Con el fin de evaluar el equilibrio entre muerte y proliferación celular, se realizaron diversas tinciones inmunohistoquímicas (Figura 24). Los resultados mostraron que los índices de TUNEL y de PCNA eran más elevados en la HI (Figura 24, A-B, C-D, y G). Sin embargo, las tasas de marcaje por Ki-67 (una proteína nuclear necesaria para la proliferación celular), fueron bajas en ambos grupos, sin llegar a apreciarse diferencias significativas entre ellos (< 1 %; Figura 24, E y F). Los fibroblastos TUNEL-positivos mostraron núcleos marcados con gran intensidad, observándose la presencia de pequeñas partículas con apariencia de cuerpos apoptóticos (Figura 24, inserción magnificada en B). Sólo muy ocasionalmente se pudo detectar un marcaje difuso, en el núcleo y el citoplasma, de color marrón, compatible con la presencia de células necróticas. Los índices de PCNA y de TUNEL correlacionaron de manera positiva ($r=0.818$; $P=0.007$). Dado que en estas muestras los

fibroblastos fueron el componente celular mayoritario identificado, en el análisis se asumió que la mayor parte del marcaje positivo de PCNA y TUNEL correspondía a fibroblastos (Figura 24, I y J). Finalmente, observamos una relación entre circularidad y apoptosis (Figura 24, D), de manera que las células más redondeadas presentaban significativamente más apoptosis que las que tendían a ser fusiformes (Figura 24).

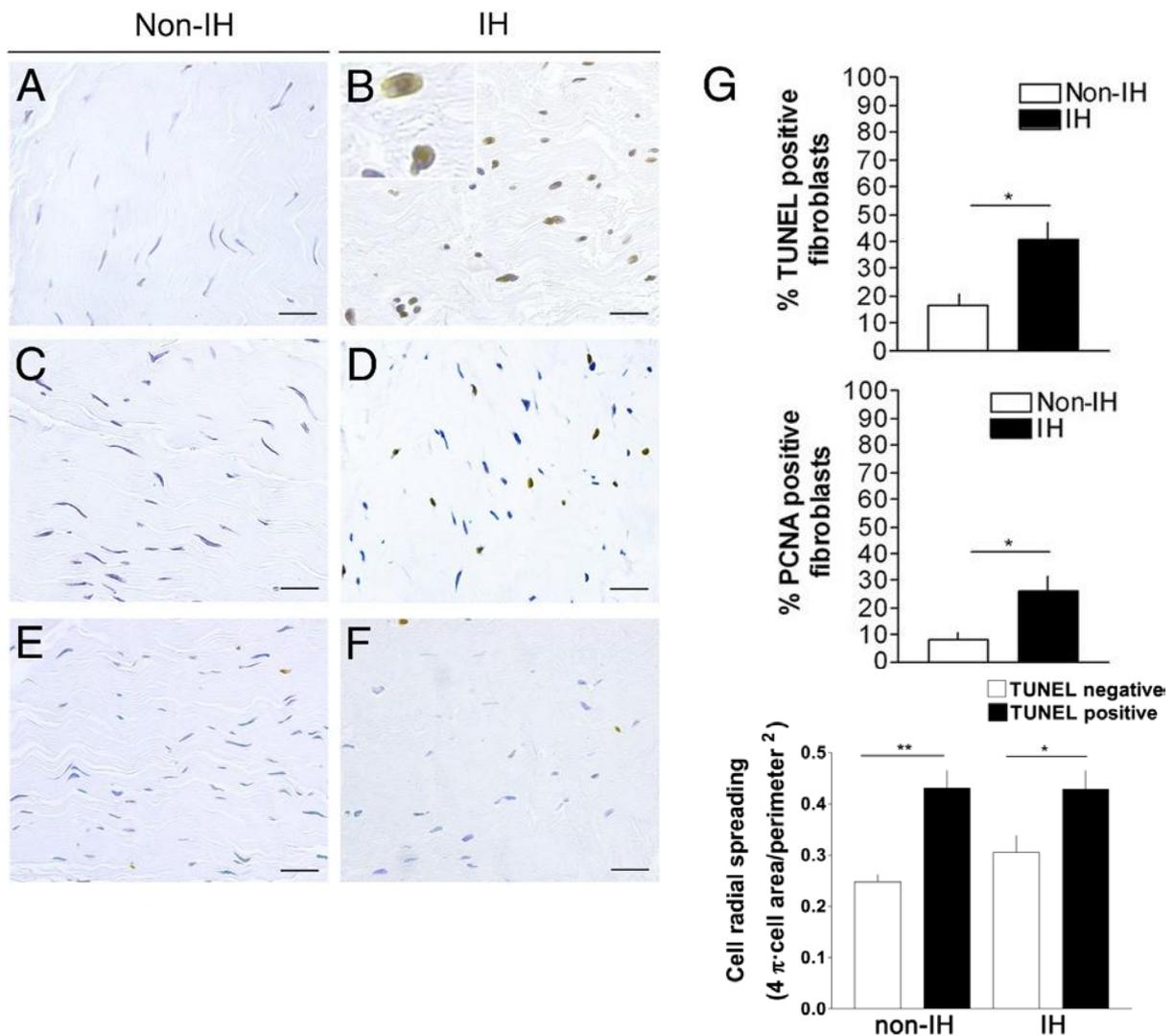


Figura 24. Marcadores de apoptosis y proliferación celular en la fascia. Secciones representativas de muestras de pacientes con hernia incisional (IH) y pacientes control (no-IH), según las tinciones inmunohistoquímicas de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dNTP-biotin nick end labeling) (A y B), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (C y D), y Ki-67 (E y F) (magnificación, 200x; barra de escala: 50 μm). G: Análisis cuantitativo del número de núcleos de fibroblastos TUNEL-positivos y PCNA-positivos, y relación entre el marcaje TUNEL-positivo y la circularidad celular (cell radial spreading) medida como $[4\pi \cdot \text{área celular} / \text{perímetro}^2]$, siendo 1.0 un círculo perfecto y 0 una forma fusiforme. Los resultados se expresan como (media \pm ESM de pacientes control no-IH ($n=20$) y pacientes con HI ($n=21$)). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, prueba t de Student.

5.1.2 Activación de la caspasa-3 y fragmentación del citoesqueleto en la fascia de los pacientes con HI

Estos resultados sugerían que probablemente la presencia mecanismos de muerte celular por apoptosis podían estar involucrados en la HI. Como paso siguiente, nos propusimos examinar la presencia de caspasa-3 y de otros componentes relacionados con el citoesqueleto por inmunotransferencia sobre membranas (207). Suscita interés el hecho de que los homogeneizados de HI mostraron una expresión incrementada de procaspasa 3 (32 kDa) y de sus principales fragmentos activos con actividad proteolítica (p20, p17), coincidiendo con un incremento en la fragmentación de vimentina (principal filamento intermedio de células mesenquimales, como los fibroblastos), α -fodrina, y PARP (Figura 25, A y B). Tanto, la vimentina nativa (57 kDa) como la fragmentada (principalmente las bandas de 53 kDa y <48-50 kDa) se encontraron aumentadas en HI, así como también la α -fodrina intacta (240 kDa) y fragmentada (150 kDa, 120 kDa), y la PARP (116 kDa) (Figura 25, B). En cambio, no se observó fragmentación ni de β -tubulina ni de actina (Figura 25, A). El incremento de la relación fracción soluble de la vimentina versus fracción citoesquelética (Figura 25, C) (después de utilizar procedimientos de fraccionamiento subcelular de proteínas), y de los niveles de vimentina fosforilada en la HI (especialmente una banda de ~48 kDa, no detectable en las muestra control no-HI; (Figura 25, D) probablemente refleja un desmantelamiento general del citoesqueleto de vimentina (295). En conjunto, estos resultados sugieren que el proceso de fragmentación es específico y compatible con mecanismos apoptóticos de muerte celular (222) (223).

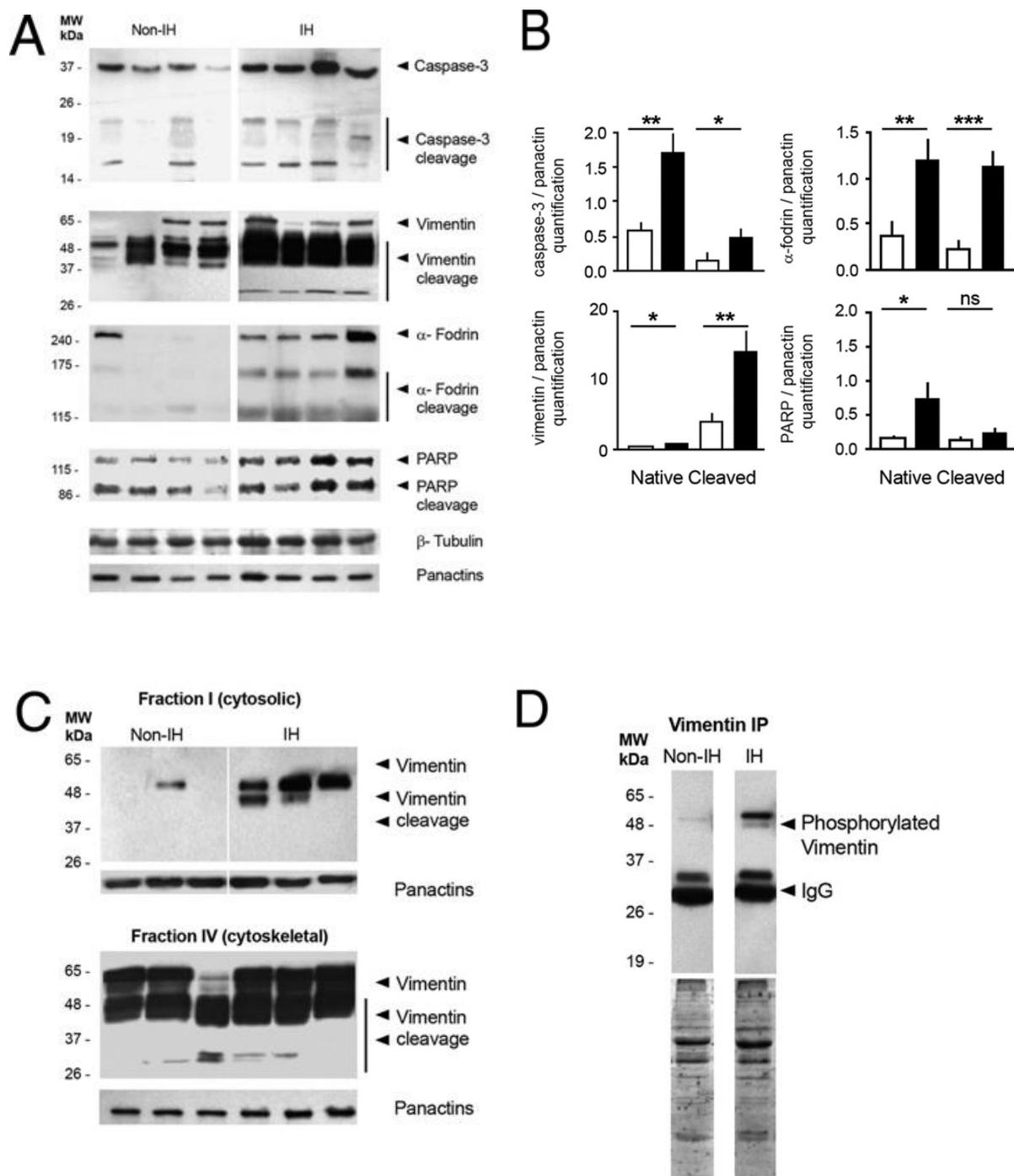


Figura 25. Fragmentación proteolítica de la caspasa-3 y de sustratos del citoesqueleto en tejido de fascia. A: Análisis representativos de inmunotransferencia de membranas de fascia de pacientes control no-IH y pacientes con IH. La panactina se utilizó como control de carga para la normalización de resultados. B: Análisis densitométricos de la expresión proteica (media \pm ESM) en sus formas nativa y fragmentada, en pacientes control no-IH ($n=8$) y pacientes con IH ($n=8$) (ns, no significativo; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; prueba t de Student). C: Inmunotransferencia de membranas representativas del análisis de subfracciones enriquecidas para el componente citosólico y citoesquelético de fascia de pacientes control no-IH y pacientes con IH. D: Inmunotransferencia de membranas representativas de fracción soluble, tras inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal anti-fosfo-Ser/Thr. MW, peso molecular.

5.1.3 La fascia de los pacientes con HI muestra una expresión génica de proteoglicanos alterada

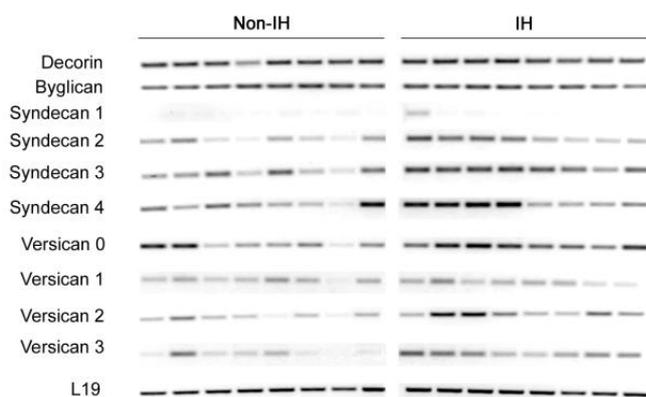
Los proteoglicanos (PGs) están conformados por una proteína “núcleo” (que puede variar en tamaño de 10-400 kDa), a las que se unen covalentemente cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) de diferentes grados de sulfatación, cuya composición da lugar a la clasificación de los diferentes PGs (i.e., PGs condroitin-sulfato, PGs heparan sulfatos, dermatan sulfatos, etc.). Pueden localizarse tanto en la MEC como en la membrana plasmática o en vesículas intracelulares. Las cadenas de GAGs que se encuentran en el espacio intercelular pueden retener grandes cantidades de agua y resistir a presiones externas, siendo por tanto responsables de soportar la estructura del tejido al nivel mecánico y permitir la funcionalidad tisular (296). Por todo ello, se les ha implicado en multitud de procesos biológicos específicos (i.e., adhesión, proliferación, migración, y apoptosis), y también en diferentes patologías inflamatorias, degenerativas y neoplásicas (297).

Partiendo de las diferencias observadas en la tinción con azul alcian entre pacientes con HI y pacientes control, como siguiente paso quisimos analizar la expresión génica de algunos PGs representativos de diferentes familias, tanto celulares como extracelulares, con la intención de avanzar en la eventual obtención de biomarcadores para la HI.

En concreto, analizamos la expresión por RT-PCR de dos proteoglicanos pequeños, decorina y biglicano, caracterizados por una proteína núcleo pequeña, 35-44kDa, que contiene repeticiones ricas en leucina; diferentes isoformas de versicano, un hialectano de membrana basal con capacidad de unirse al ácido hialurónico, ampliamente expandidos en la MEC de una gran variedad de órganos y tejidos; y sindecanos, glicoproteínas transmembranarias que contienen un corto dominio citoplásmico, un dominio transmembranarias de extensión única, y un dominio extracelular con cadenas de heparina-sulfato y condroitina-sulfato.

El análisis por reacción de RT-PCR demostró la expresión diferencial de diferentes isoformas de sindecanos y versicanos estando, en general y tal y como puede observarse en la Figura 25, sobre-expresadas en HI en relación al grupo control, no-HI. En concreto, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las isoformas de sindecano-3 y sindecano-4, y también para las isoformas de versicano-0, -2 y -3 (Figura 26).

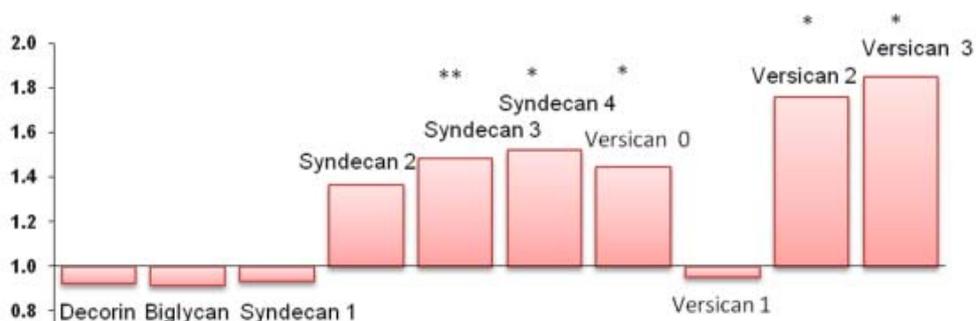
Finalmente, aplicando un análisis de componentes principales (PCA) –el PCA es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos; intuitivamente permite hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia- vemos como es posible agrupar a los dos grupos de pacientes estudiados en función de los resultados obtenidos según por RT-PCR, especialmente a expensas de los valores de sindecanos y versicanos (Figura 26). A su vez, el diagrama de dispersión *biplot* (Figura 27), como forma de representación gráfica de datos multivariantes, muestra que el agrupamiento aparente entre el grupo de pacientes con HI es superior al observado para los pacientes control sin HI (indicada por la distancia entre ellos en el gráfico), sugiriendo que la patología los agrupa.



	L19-normalized expression (mean ± SEM)		Overall Ratio IH/non-IH	Student's t-test p-value (n=8)	
	IH	Non-IH			
Decorin	1.10 ± 0.03	1.19 ± 0.08	0.92	0.294	
Biglycan	0.72 ± 0.06	0.79 ± 0.05	0.91	0.373	
Syndecan 1	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.93	0.644	
Syndecan 2	0.55 ± 0.02	0.40 ± 0.08	1.36	0.102	
Syndecan 3	0.74 ± 0.04	0.50 ± 0.06	1.48	0.003	**
Syndecan 4	0.69 ± 0.09	0.46 ± 0.06	1.52	0.048	*
Versican 0	0.63 ± 0.04	0.43 ± 0.08	1.44	0.049	*
Versican 1	0.46 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.95	0.773	
Versican 2	0.61 ± 0.09	0.34 ± 0.06	1.73	0.034	*
Versican 3	0.48 ± 0.06	0.26 ± 0.08	1.85	0.047	*

Figura 26. Análisis de la expresión de diferentes proteoglicanos por reacción de RT-PCR en muestras derivadas la fascia de pacientes control no-IH (n = 8) y pacientes con IH (n = 8). Panel superior: Productos de la reacción de RT-PCR resueltos por electroforesis en geles de agarosa 1-2%. Panel central: Análisis estadístico de la expresión de los genes, normalizados con el gen de referencia ribosomal L19. Panel inferior: Representación gráfica de los ratios de expresión IH/no-IH.; *P < 0.05, **P < 0.01, prueba t de Student.

ratio IH/non-IH gene expression



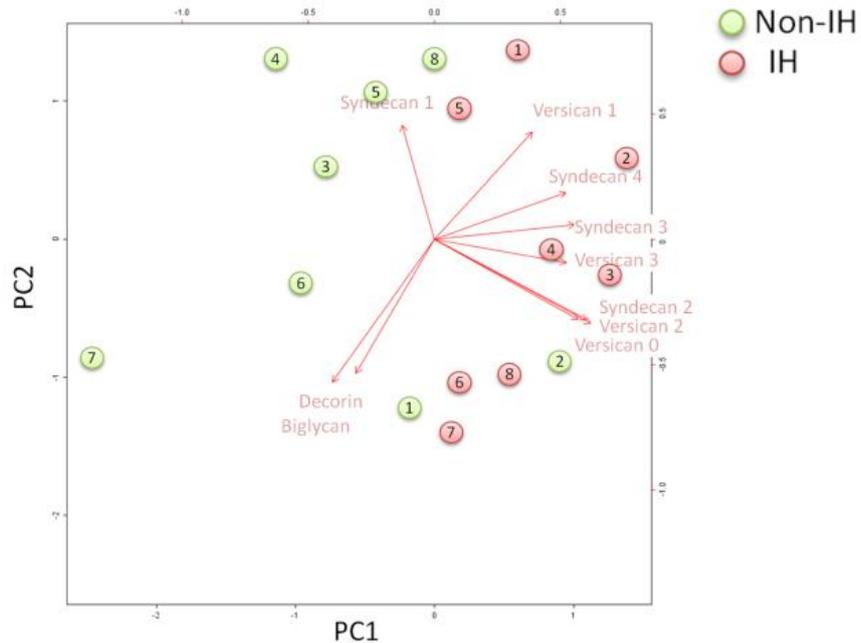


Figura 27. Representación biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la expresión de los proteoglicanos obtenida por reacción de RT-PCR, normalizadas con L19. En el gráfico biplot se representan simultáneamente las diferentes variables (proteoglicanos) y los resultados de las observaciones obtenidas (pacientes), teniendo como ejes los dos primeros componentes principales. Así, se puede observar como los dos grupos de estudio se distribuyen de forma separada (a excepción del paciente 2, del grupo control no-IH). El primer componente parcial (PC1) explica el 40% de la variabilidad encontrada y el segundo (PC2) el 20%. La proyección de los pacientes en las flechas da un valor original (escalado) de aquella variable, y su longitud indica la variancia de la variable. La observación o proyección de los pacientes respecto a un eje de los componentes principales (PCA) permite observar cuales de las variables han influido en su posición dentro del gráfico (i.e., que variables los distinguen de los demás). Por ejemplo en el paciente 3 del grupo de IH, si solo nos fijamos en el eje del PC1, parece verse influido por la expresión de versicano 3 y sindecano 3, pero no tanto por el sindecano 1 ya que la proyección sobre el eje es nula. Además el ángulo entre las variables nos permite, de manera aproximativa ver la correlación entre ellas (i.e., los versicanos 0 y 2 presentan un correlación alta)

5.1.4 Los fibroblastos de los pacientes con HI muestran un fenotipo patológico diferencial

Es bien conocido que los fibroblastos residentes en la MEC son el principal contribuidor al mantenimiento de la estructura y función de la fascia. Llegados a este punto, y con la finalidad de obtener una visión más profunda de la interrelación entre células locales y MEC en el contexto de la HI, en una siguiente etapa quisimos analizar el comportamiento *in vitro* de fibroblastos primarios derivados de biopsias peroperatorias de tejido fascial de pacientes con HI y pacientes control sin HI.

Queremos destacar, que ya en el proceso de obtención de fibroblastos a partir del explante se pudieron observar diferencias significativas entre ambos grupos, de manera que la eficiencia de proceso fue superior en la HI. Los estudios preliminares de puesta a punto de la técnica en nuestro laboratorio (datos no mostrados), demostraron ya la necesidad de tratar la muestra con tripsina con el fin de para ayudar a “desestructurar” el tejido (se trata de un tejido conectivo muy denso, conformado básicamente por colágeno) y facilitar la salida de células inmersas en la fascia pacientes control no-HI, ya que de otro modo, su eficacia era nula (sin embargo, en las biopsias procedentes de pacientes con HI la eficacia era de un 60% de biopsias procesadas, lo cual probablemente está relacionado con la dismorfología y disfunción observadas en los estudios histológicos y bioquímicos con tejido completo que acabamos de describir en los apartados anteriores).

Para demostrar que las células obtenidas eran fibroblastos, se utilizaron tinciones inmunocitoquímicas para vimentina y CD90 (Figura 28). También se comprobó la tasa de senescencia en muestras representativas de los diferentes pases estudiados mediante tinción con el marcador β -galactosidasa, encontrando unos niveles muy bajos tanto en la población con HI (**FHI**; IHFs en las figuras y tablas), como en los fibroblastos control (**no-FHI**; no-HIFs en las figuras y tablas) (<1%). Destacó una transformación fenotípica de los fibroblastos de fascia en la HI, que se mantenía durante todos los pases de los cultivos estudiados (pases 3-6; Tabla 6, Figura 28). Morfológicamente, los fibroblastos control no-FHIs mostraron una superficie celular extensa, no polarizada, con forma estrellada con largas proyecciones y con una red abundante y bien organizada de fibras de actina organizada en *fibras de estrés* (filamentos extensos longitudinales) y *geodomas* (haces organizados en estructuras poligonales), y una densa red de vimentina esparcida por todo el citoplasma. Por el contrario los fibroblastos de los pacientes con HI, mostraron una morfología de tipo uso bipolar, con una superficie celular menor, así como menos microfilamentos de actina y una red de vimentina encogida (menos estructurada y difusa).

En relación a las adherencias focales (AF, o *focal adhesions*) se observaron también diferencias. Las AFs son tipos específicos de conjuntos macromoleculares grandes a través de los cuales se transmiten tanto la fuerza mecánica como señales reguladoras. Más precisamente, se pueden considerar como macromoléculas subcelulares que median los efectos reguladores de adhesión de la matriz extracelular en el comportamiento celular. Son estructuras alargadas de algunos μm de longitud, y anclan los microfilamentos de actina a través de una placa o grupo de proteínas (ej. vinculina, FAK, paxilina), pudiendo activar mecanismos de contracción

relacionados con la migración, o la supervivencia (298). En nuestro caso, en los fibroblastos control no-FHIs las AF, identificadas por el marcaje inmunocitoquímica de vinculina, resultaron ser prominentes, estando ampliamente distribuidas por toda la célula (con una relación área de AF total/área celular (%) superior a los FHIs, como también lo era el área de cada AF individual). En cambio los FHIs mostraron AFs de menor tamaño, Observándose AF nacientes y complejos focales que se situaban principalmente en el frente de avance celular. Es probable que estas AFs correspondan a formas previas en el proceso de maduración de las AF, estando más relacionadas con fenómenos de migración, mientras que las AF maduras se asocian a tensiones elevadas, estáticas, e isométricas respecto al sustrato. La expresión de α -SMA, un marcador distintivo de los miofibroblastos, fue también superior en los no-FHIs (Tabla 6, Figura 29).

Tabla 6. Caracterización de los fibroblastos de fascia

	No-HI (n=20)	HI (n=21)	P valor
Eficiencia del cultivo celular			
Éxito %	40	70	*
Tiempo de aparición de los fibroblastos en el explante	34.3 \pm 27.0	18.2 \pm 2.0	**
Rendimiento (x 10 ⁶ células/biopsia)	1.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.4	*
Análisis morfológico (n=5)			
Área celular (μ m ²)	8463 \pm 960	1008 \pm 211	*
Células polarizadas (%)	7,5 \pm 0,9	75,2 \pm 2,1	*
Estructura de los microfilamentos de actina (n=5) (%)			
Células con geodomas y fibras de estrés	86.7 \pm 0.9	53.8 \pm 0.85	*
Células con fibras de estrés	24.41 \pm 1.08	4.60 \pm 0.66	*
Células positivas para α -SMA	17.05 \pm 2.52	3.56 \pm 1.04	*
Adhesiones focales (AF) (n=5)			
Área (μ m ²)	3,1 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	*
% área de AF /área célula	6,3 \pm 0,6	2,6 \pm 0,2	*

*P < 0.05, **P < 0.0, prueba t de Student.

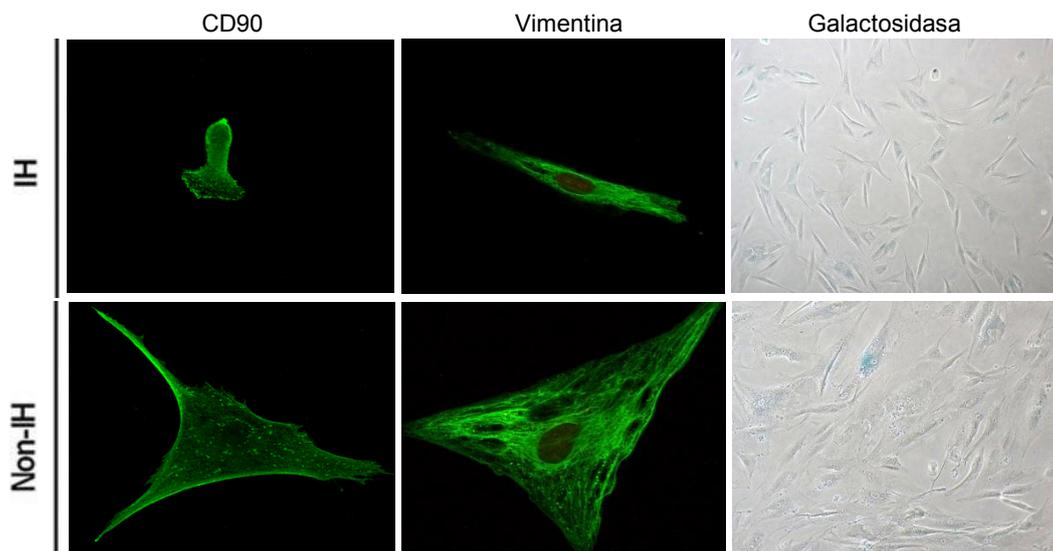


Figura 28. Caracterización preliminar para confirmar las células del cultivo como fibroblastos. Inmunocitoquímica para CD90 y vimentina. Tinción de β -galactosidasa para la evaluación de la senescencia. Magnificación: 400x (CD90 y vimentina) y 100x (β -galactosidasa).

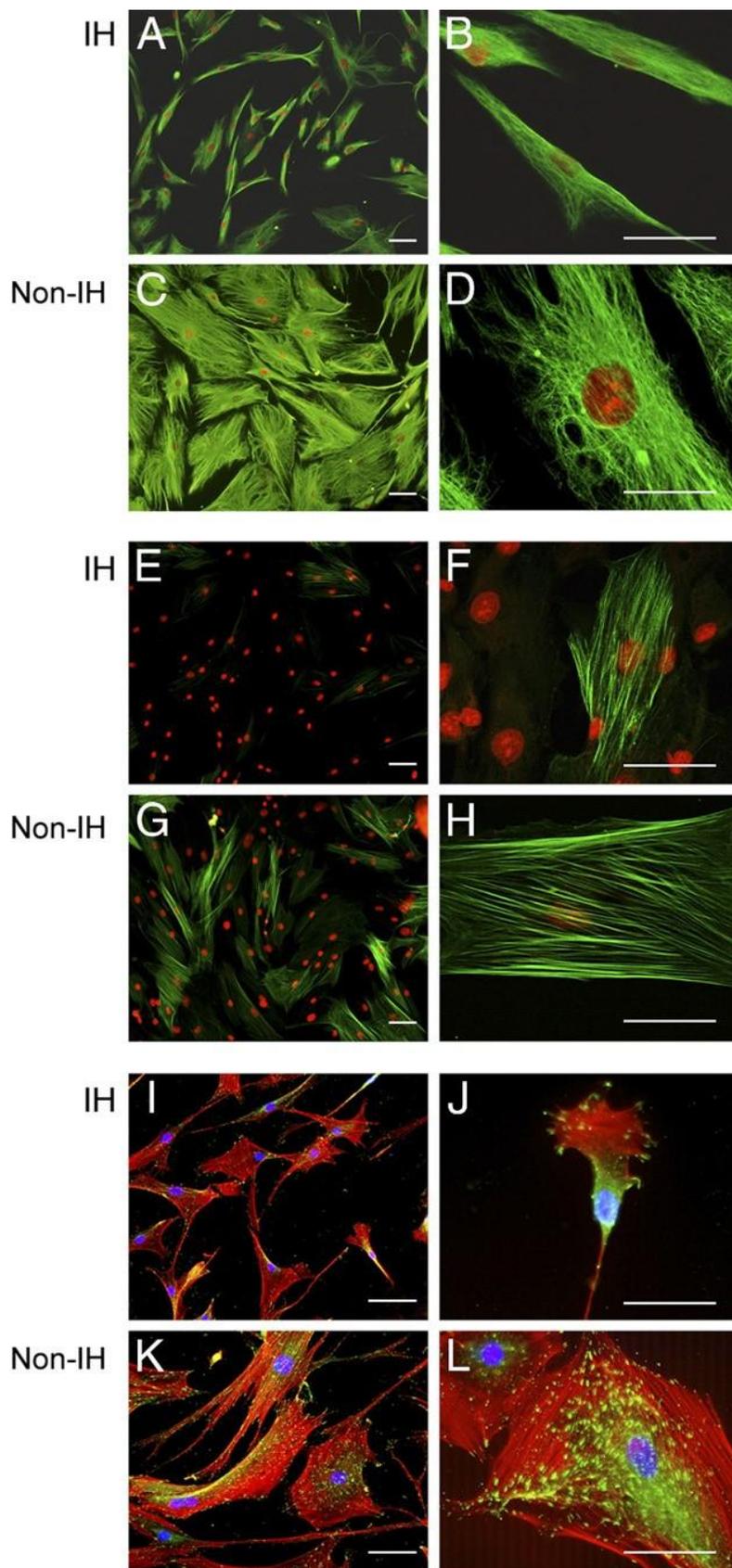


Figura 29 Caracterización de los fibroblastos de fascia. Imágenes obtenidas tras la tinción por inmunocitoquímicas de muestras representativas de fibroblastos primarios derivados de tejido fascial de pacientes control (no-IH) y pacientes con HI (IH): vimentina (verde A–D), α -SMA (verde E–H) y vinculina/faloidina (verde/rojo, I–L). Magnificación: 100x (A, C, E y G), 200x (I y K), 400x (B, D, F, H, J y L); barra de escala = 50 μ m.

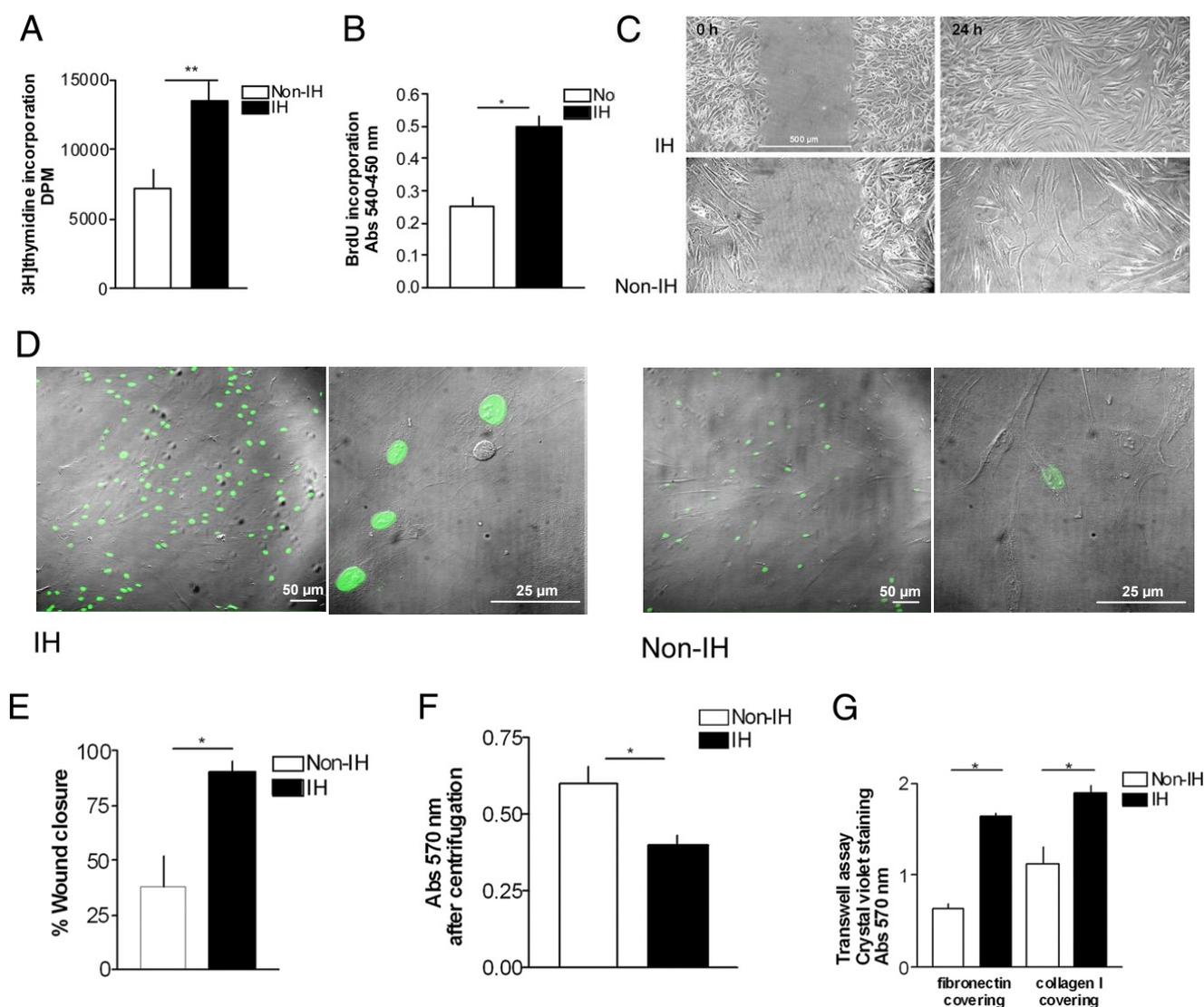


Figura 30. Análisis del comportamiento de los fibroblastos primarios. Ensayos de proliferación: (A) Incorporación de [^3H]-timidina y (B) BrdU al ADN, en no-FHIs ($n=5$) y FHIs ($n=5$). Ensayos de migración y adherencia: (C y E) Imágenes representativas a 0 h y a 24 h después del inicio del aclarado (wounding) de la zona central, en no-FHIs y FHIs, y comparación del porcentaje del área ocupada por los dos grupos. D: inmunocitoquímica in situ de BrdU. Magnificación: 100x, 600x. F: Cuantificación del ensayo de adhesión al sustrato por centrifugación invertida en no-FHIs ($n=5$) y FHIs ($n=5$). G: Migración de los fibroblastos a través del inserto de los transwells recubiertos con fibronectina y colágeno de tipo I en no-FHIs ($n=5$) y FHIs ($n=5$). Abs., absorbancia; DPM, desintegraciones por minuto; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, prueba U de Mann-Whitney.

Además, los FHIs mostraron una tasa de migración más elevada. Así en los ensayos de wound healing los FHIs ocuparon más rápidamente la zona central clareada (Figura 30, C y E), y en los ensayos de transwell migraron también más rápido (tanto en los recubiertos con fibronectina como en los recubiertos con colágeno de tipo I) (Figura 30, G). Finalmente, los FHIs se caracterizaron por tener una menor adhesión al sustrato en el ensayo de centrifugación reversa (Figura 30, F).

5.1.5 El marcador de autofagia LC3 incrementa su expresión en los pacientes con HI

En una siguiente etapa, quisimos analizar la ultraestructura celular de los fibroblastos. Sorprendentemente, las observaciones del microscopio electrónico revelaron una acumulación de vacuolas y de estructuras del tipo autofagosoma que no habían sido descritas con anterioridad. Estas estructuras, que contienen porciones de citoplasma, están envueltas por estructuras lamelares de múltiples capas, y contienen también perfiles característicos e hinchamientos mitocondriales en los FHIs. En contrapartida, en los fibroblastos control no-FHIs estas estructuras lamelares multicapa se observaban solo ocasionalmente, y el resto de hallazgos descritos en los FHIs estaban ausentes (Figura 31, A) (299). Finalmente, y de forma muy notoria, destacar que los FHIs resultaban ser más frágiles y propensos a la rotura (la simple preparación para el microscopio electrónico de transmisión causaba ya la rotura espontánea y repentina de la membrana celular, apuntando a una posible mayor fragilidad del citoesqueleto (Figura 31, B).

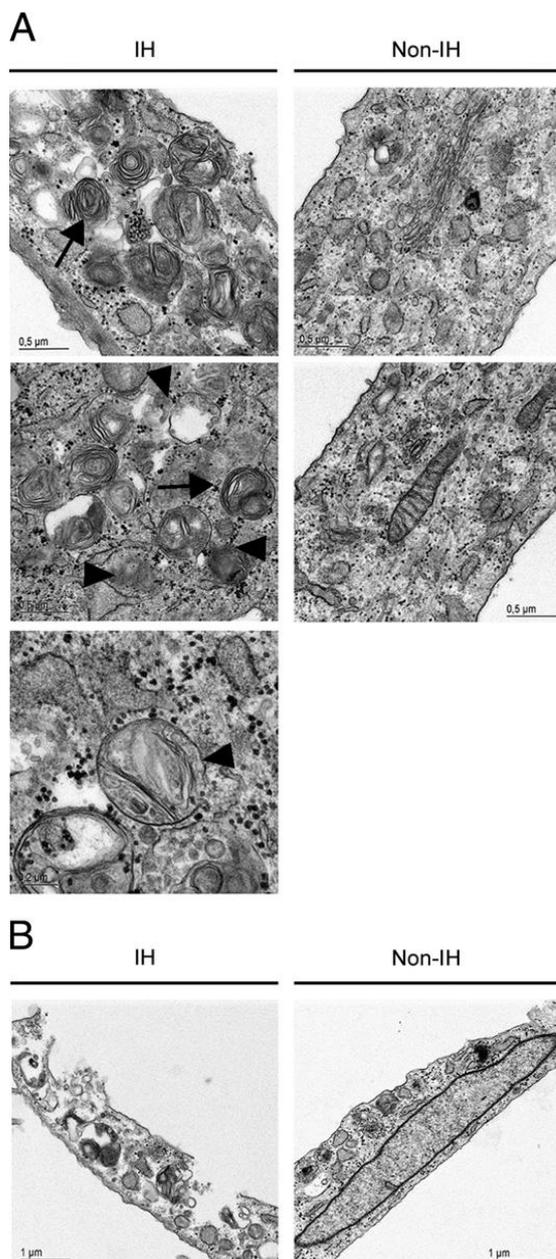


Figura 31. Apariencia ultraestructural: A: Imágenes representativas de fibroblastos primarios de fascia. Destaca de forma clara la presencia de vacuolas autofágicas, estructuras compatibles con autofagosomas, estructuras lamelares multicapa, perfiles "fingerprint" (flechas) e hinchazón mitocondrial (triángulo). B: Evidenciando de la fragilidad celular de los FHI a la simple preparación para el microscopio electrónico de transmisión.

Estos resultados derivados del análisis por microscopio electrónico motivaron, conjuntamente con la observación de una posible activación de las vías apoptóticas que ya habíamos observado al nivel del tejido completo en la fascia de los pacientes con HI, motivaron como paso siguiente el análisis la actividad autofágica tanto en fibroblastos primarios como en muestras de tejido.

Para ello se utilizó una proteína que ha sido propuesta como marcadora de autofagia, la *ubiquitin-like LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3B)*. En las células de mamífero encontramos dos formas de LC3: la LC3-I y la LC3-II. La LC3-I (18 kDa) es una proteína principalmente citosólica, mientras que la LC3-II (16 kDa) se encuentra en las membranas de los autofagosomas como resultado de un proceso de maduración proteolítica. Durante la autofagia, los autofagosomas engullen los componentes citoplasmáticos. En este proceso la LC3-I se conjuga con fosfatidiletanolaminas (el proceso lipidización se consigue con dos reacciones consecutivas *ubiquitylation-like* catalizada por las enzimas E1-like *Atg7* y E2-like *Atg3*) para formar un conjugado LC3-fosfatidiletanolamina o LC3-II, siendo entonces reclutado por las membranas de los autofagosomas y permitiendo su elongación. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para formar autolisosomas, y los componentes intra-autofagosomales son degradados por hidrolasas lisosomales (igual que la LC3-II en el lumen del autolisosoma). Además la LC3-II pasa de nuevo a LC3-I, deslipidizándose por acción la cisteína-proteasa *Atg4*. De este modo, el recambio (*turnover*) del marcador autofagosomal LC3-II se considera útil para monitorizar la autofagia y otros procesos relacionados (i.e., muerte celular por autofagia).

En la práctica, el estudio de este proceso se puede realizar mediante la medida del flujo real del proceso (ej. con el uso de inhibidores de proteasas, en la fase de equilibrio dinámico), o bien puede hacerse midiendo la presencia de LC3 dentro de la fase de equilibrio estacionario (*steady-state*). En este caso se obtiene una visión del balance neto en cada paso, sin poder observar el flujo real, por ejemplo, de la producción-degradación de LC3 (300; 301). En nuestro caso, y con el fin de optimizar las muestras ya recogidas (y ya fraccionadas subcelularmente), se escogió evaluar la presencia de LC3 mediante la aproximación en fase de equilibrio estacionario, mediante inmunotransferencia. Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-LC3 recombinante (toda la secuencia) que reconocía simultáneamente LC3-I y LC3-II, y nos permitía calcular la relación en la expresión de LC3-II/LC3-I. Esta relación, puede considerarse como un reflejo de la variación/diferencia de la actividad autofagocitaria. Así pues, tanto para el cultivo primario como para las muestras de tejido, se extrajo la fracción proteica de dos formas distintas: 1) extracción total de proteínas solubles, consistente en una centrifugación después de la homogeneización de la muestra y recuperación del sobrenadante para el análisis; 2) extracción con fraccionamiento/enriquecimiento subcellular de proteínas (mediante la utilización del kit comercial, ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction), el cual permite observar la expresión de LC3 en cada compartimiento celular.

En las inmunotransferencias sobre membranas de la extracción total de las proteínas solubles, los FHIs en cultivo mostraban unos niveles incrementados de LC3-I respecto a los no-FHIs, pero no de LC3-II (de este modo, la relación LC3-II/LC3-I era significativamente más elevada en los fibroblastos control no-FHIs ($P=0.037$; $n=4$ en

ambos grupos, Figura 32). Mediante la observación en fase de equilibrio estacionario, si LC3-I incrementa o si no existen cambios en LC3-II, no implica que la formación de autofagosomas sea inferior (puede ser incluso que exista un bloqueo en el sistema que haga almacenarse LC3-I, i.e., por reciclaje de LC3-II, aumento de la vida media del autolisosoma). Observando los resultados anteriores, en que los FHIs presentaban más partículas autofagocíticas, podría ser el resultado de un alto flujo de degradación en el autolisosoma de LC3II y/o alto reciclaje. Por el contrario, las biopsias de fascia de HI ofrecían un incremento en el ratio LC3-II/C3-I basado en el incremento de LC2-II, indicando la posible formación de autofagosomas *in vivo* ($P=0.045$; $n=8$ en ambos grupos; Figura 33). En las inmunotransferencias de membrana de la extracción de proteínas con fraccionamiento subcelular en fibroblastos, LC3 se encontró en la fracción citoplasmática (LC3-I) y en la enriquecida en membranas (LC3-II) (Figura 32). Sorprendentemente los niveles de LC3-I fueron aparentemente inferiores en los fibroblastos control, no-FHIs ($P=0.006$, $n=4$ en ambos grupos), pero no se observaron diferencias en los de LC3-II (al igual que en la extracción total). La divergencia con LC3-I en los dos tipos de extracción podría ser debida a que parte de LC3-I se encontrase asociada a los microtúbulos (primera función conocida de LC3) y que se extrajese parcialmente en la fracción citoesquelética.

En el caso de las fracciones citosólicas derivadas de las biopsias no se observaban bandas o estas eran débiles (Figura 33), a excepción de una banda de 65-70 kDa que se observaba claramente en las muestras de HI. De forma notable, en la fracción enriquecida en membranas y orgánulos se observó una banda de ~70 kDa la cual era más abundante en los FHIs ($P= 0.007$, $n=8$ en ambos grupos), probablemente correspondiente a LC3-II asociado a la membrana o a la conjugación con Atg7 en el proceso de lipidización.

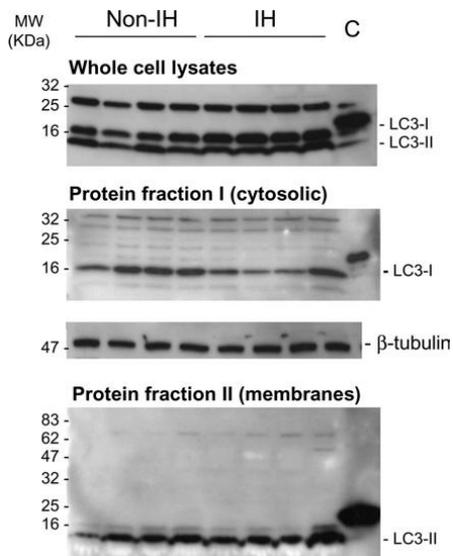


Figura 32. Inmunotransferencias de membranas representativas para LC3 en fibroblastos primarios de fascia de pacientes control no-HI y pacientes con HI. Inmunotransferencia de membranas para LC3-I y LC3-II en homogeneizados celulares totales (1×10^6 células; tampón de extracción RIPA), y de fracciones citosólicas (fracción I) y enriquecidas en membrana y orgánulos (fracción II), (ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-poliacrilamida de gradiente 4-20%. Las fracciones enriquecidas en citosol y membranas y orgánulos se concentraron 10 veces (filtros Amicon Ultra 0.5-mL, Millipore, Billerica, MA). Se usaron controles positivos de LC3 (MBL International Corp.) y como control de carga se utilizó la β -tubulina en la fracción citosólica.

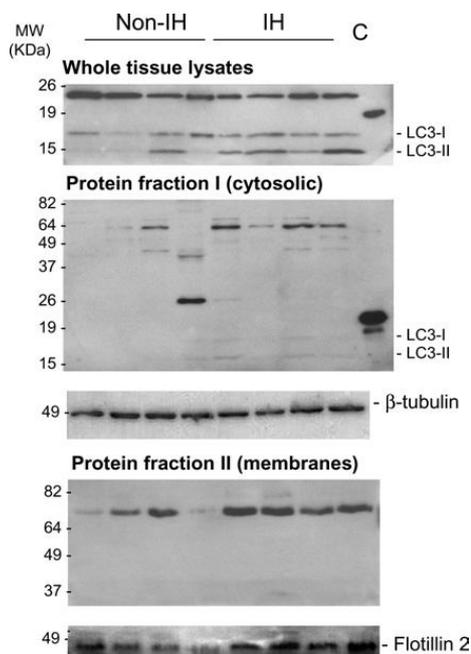


Figura 33. Inmunotransferencias de membranas representativas para muestras de tejido de fascia de pacientes control no-Hs y pacientes HIs. Inmunotransferencia de membranas para LC3-I y LC3-II en homogeneizados totales (tampón de extracción RIPA), y de fracciones citosólicas (fracción I) y enriquecidas en membrana y orgánulos (fracción II), (ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-poliacrilamida al 12.5%. Las fracciones enriquecidas en citosol y membranas y orgánulos se concentraron 7 veces (filtros Amicon Ultra 0.5-mL, Millipore, Billerica, MA), y fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 11% y 8%, respectivamente. Se usaron controles positivos para LC3 (MBL International Corp.), y como controles de carga se utilizaron la β -tubulina en la fracción citosólica, y la flotilina-2 como marcador de la fracción de membrana.

5.1.6 Los fibroblastos de HI muestran mayor sensibilidad a estímulos apoptóticos

Finalmente, y para completar el estudio, tras observar alteraciones en la adherencia al sustrato (302), y unos valores de autofagia alterados (303), quisimos examinar si los FHIs eran más susceptibles a la acción de estímulos pro-apoptóticos que los fibroblastos derivados de pacientes control (no-FHIs). Para ello, utilizamos un tratamiento con inductores específicos de apoptosis, como la estaurosporina y la mezcla TNF α /CHX. La estaurosporina es un potente inhibidor de la proteína quinasa C, permeable a la célula, y que a altas concentraciones induce apoptosis celular. Por el contrario el TNF α es una citoquina inflamatoria multifuncional, perteneciendo a la súper-familia del TNF.

Experimentos preliminares en nuestro laboratorio demostraron que tanto la estaurosporina como el TNF α /CHX eran inductores competentes adecuados para provocar apoptosis en las células estudiadas. Sin embargo, el TNF α /CHX parecía más adecuado para monitorizar esta función ya que provocaba una transición más gradual y por lo tanto, a nuestro parecer, facilitaba la caracterización molecular del proceso (la estaurosporina inducía una rápida transición desde la apoptosis a la necrosis). Por este motivo, y también debido a la limitación del número de muestras (cultivos primarios), los experimentos de inducción se llevaron a cabo exclusivamente con TNF α /CHX a las concentraciones optimizadas según dichos ensayos preliminares.

Como puede observarse en la (Figura 34, B y C), tras el tratamiento con TNF α /CHX, los cultivos de FHIs mostraban vesículas redondas fácilmente despegables en comparación con los del grupo control no-FHIs, aparentando una menor adhesión al sustrato (más refringentes en el microscopio de contraste), y en algunas células se observaban lobulaciones del núcleo, típica de núcleos apoptóticos (304; 305). La apariencia más apoptótica del cultivo de los FHIs se confirmó con el ensayo de detección de apoptosis Vybrant Apoptosis Assay kit II, que utiliza como marcador la anexina V, siendo el número de fibroblastos apoptóticos tempranos y tardíos (y necróticos) mayor en los FHIs.

Finalmente, para observar la activación de las vías de proteólisis apoptóticas se realizaron inmunotransferencias de membranas de lisados celulares (utilizando también el kit *ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction*, para el subfraccionamiento celular), en muestras derivadas del mismo experimento de inducción de apoptosis que acabamos de describir. En las inmunotransferencias de FHIs se observó la activación de la caspasa-3, que participa en el inicio de las vías apoptóticas, y también la firma característica de la fragmentación de sus sustratos: proteínas del citoesqueleto como la α -fodrina, vimentina, y el PARP (Figura 35). Por el contrario, las pan-actinas no aparecieron fragmentadas indicando, una vez más, la especificidad del proceso. Nos parece de interés remarcar que el patrón de los fragmentos observados durante la inducción de apoptosis *in vitro* se asemejaba a lo observado en los tejidos de la fascia que acabamos de describir anteriormente, lo que sugiere que este proceso se podría producir *in vivo*, y así contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

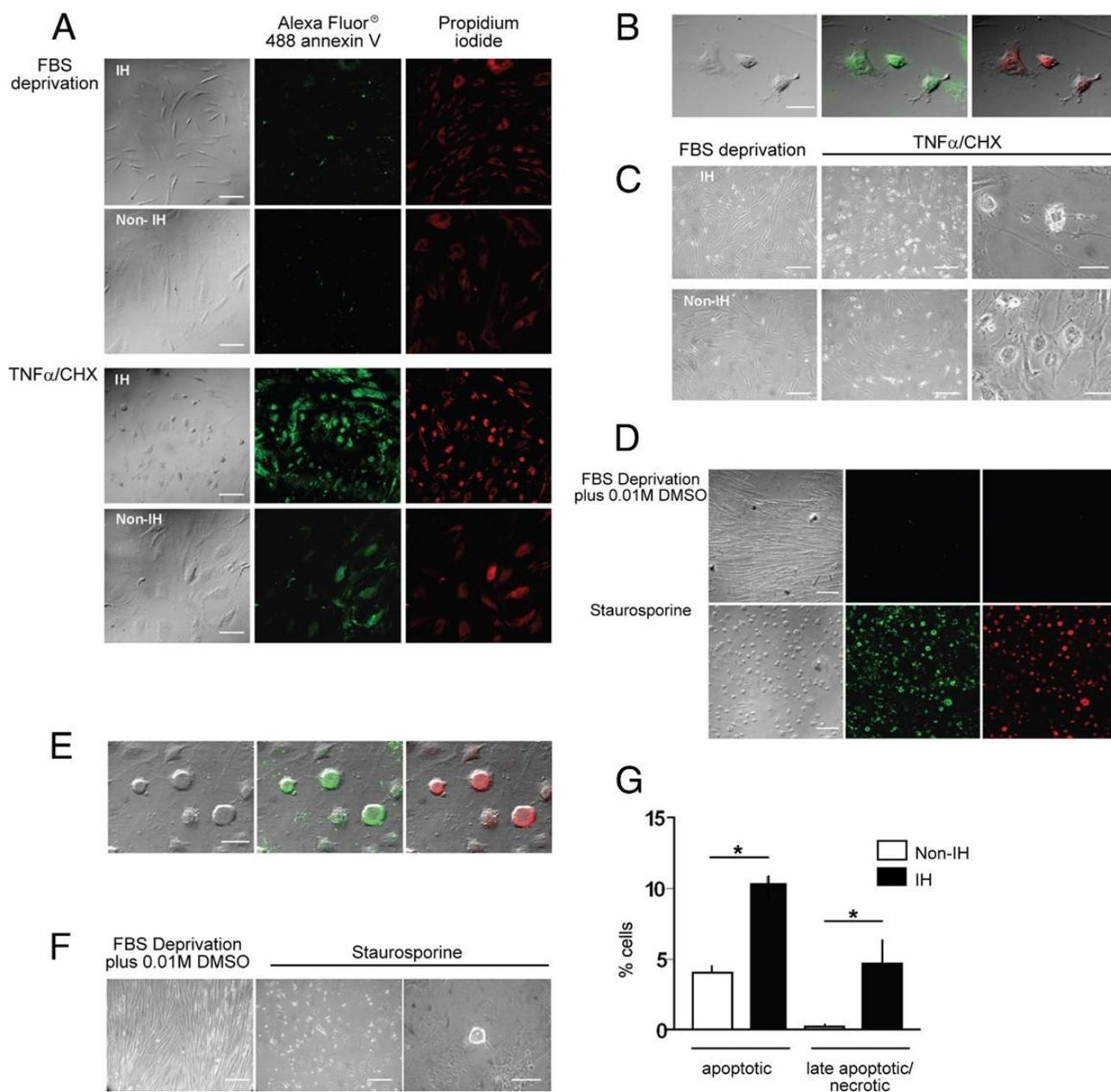


Figura 34. Susceptibilidad de los fibroblastos a estímulos pro-apoptóticos. Respuesta apoptótica de los FHIs ($n = 5$) y FHLs ($n = 5$), analizada mediante el Vybrant Apoptosis Assay kit II (detalles en la sección de material y métodos), y observación por microscopía confocal. Se aprecian células de color verde apoptóticas (tempranas o tardías), células apoptóticas tardías con citoplasma rojo intenso, y células necróticas con núcleo de color rojo intenso. A-C y G: Tratamiento de TNF- α /CHX (72 h): (A) Imágenes de campo claro (izquierda) e inmunofluorescencia (100x); (B) Imágenes solapadas de campo claro y marcaje con Vybrant Apoptosis Assay kit II (600x); (C) Imágenes de contraste de fases (izquierda y centro, 100x; derecha, 600x); (G) Porcentaje de células apoptóticas (* $P < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney). (D-F): Tratamiento de estaurosporina (16 h): (D) imágenes de campo claro e inmunofluorescencia (100x); (E) imágenes combinadas (600x); (F) imágenes de contraste de fases (izquierda y centro, 100x; derecha, 600x). Barra de escala: 100 μ m (100x); 50 μ m (600x).

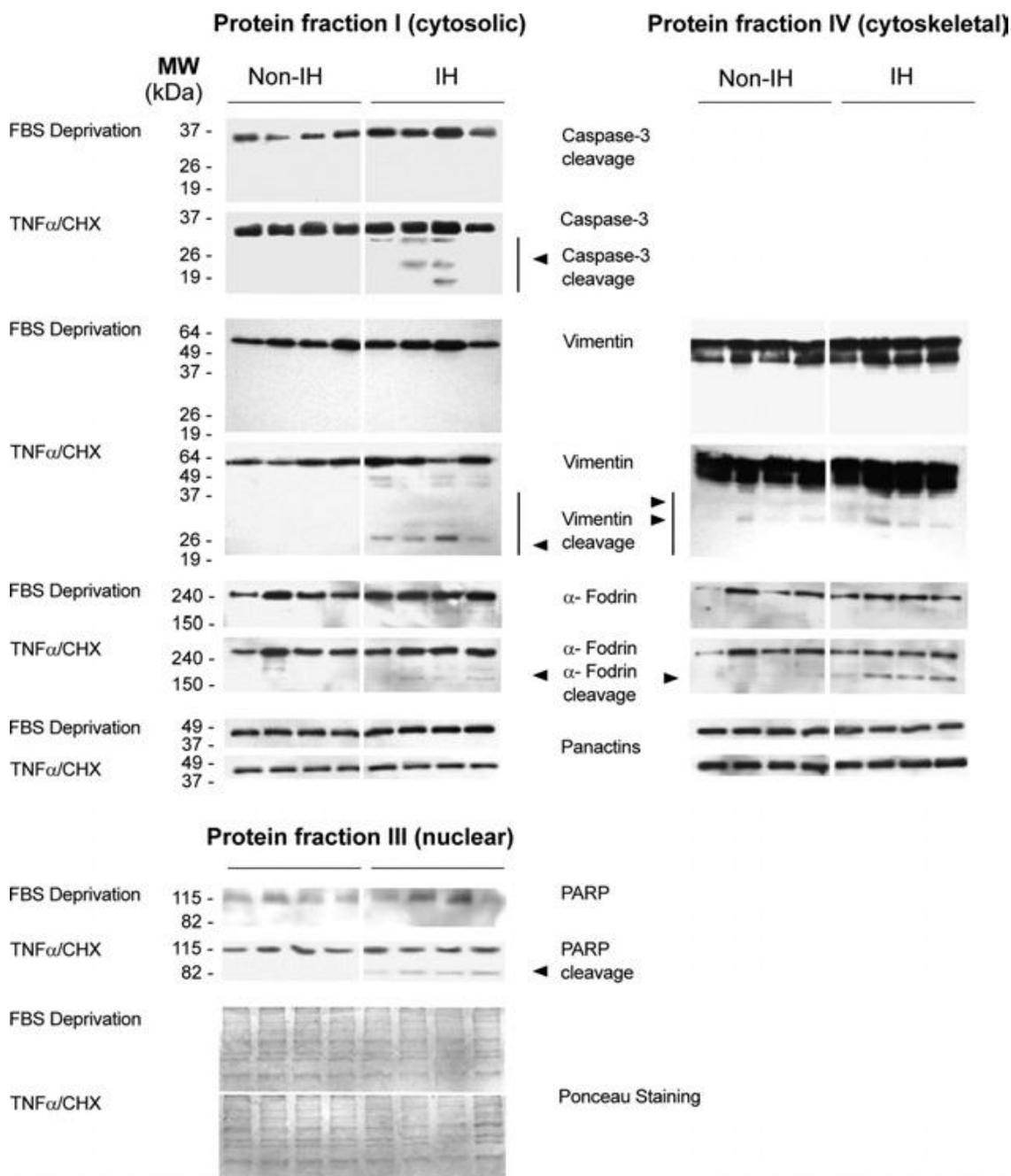


Figura 35. Inmunotransferencia de membranas de proteínas involucradas en la apoptosis. Inmunotransferencias representativas de análisis obtenidos a partir de fracciones citosólicas, nucleares y de citoesqueleto de pacientes control no-FHIs y pacientes con HI, FHIs, después del tratamiento con TNF α /CHX (detalles en la sección de material y métodos). La inmunotransferencia de pan-actinas (fracciones citosólica y citoesquelética) y la tinción de Ponceau de la membrana de transferencia de la inmunotransferencia (fracción nuclear) se realizaron con la función de control de carga.

5.2 Propiedades del músculo y los fibroblastos del TCI en pacientes afectados por la hernia incisional

La pared abdominal es un sistema biológico complejo cuyas propiedades funcionales son críticas para mantener las funciones normales del tronco (306). A saber, esta unidad funcional se compone de varias capas que sutilmente se influyen mutuamente para coordinar de manera conjunta sus prestaciones (307). Cuando aparece una HI es todo el sistema que es disfuncional (308). Aún así, y como ya hemos venido comentando, la mayor parte de estudios se han centrado exclusivamente en la fascia del tejido conectivo (294) y los determinantes del componente “músculo esquelético” que podrían contribuir a esta situación clínica siguen estando por definir (28) (35) (32) (309).

A raíz de los hallazgos descritos en el apartado anterior, y recogiendo también indicios de un trabajo previo en el que habíamos estudiado conjuntamente muestras de fascia y músculo esquelético de pacientes con HI (28) en la siguiente etapa hemos querido caracterizar con más profundidad muestras del músculo esquelético siguiendo el mismo esquema anterior (análisis de muestras de tejido y estudio de fibroblastos primarios, en este caso derivados del tejido conectivo intermuscular (TCI) de pacientes con HI y pacientes control no-HI), teniendo en cuenta también las particularidades propias del tejido muscular, para así poder proporcionar otra explicación al nivel del tejido, de modo que sintetizando los resultados obtenidos en ambos tejidos ayude a acelerar la (eventual) generación de nuevas hipótesis de enfermedad que se podrían derivar de los mismos.

Brevemente recordar que en este trabajo previo (28) demostramos alteraciones concomitantes y compartimentalizadas al nivel del tejido en pacientes con HI que apuntaban a una señalización inflamatoria local desregulada, y a una mayor expresión de metaloproteasas (MMPs) acoplada a un descenso en la expresión de sus inhibidores (TIMPs) que decantaba el equilibrio hacia una degradación continua aumentada. Destacó también un descenso muy marcado de TIMP-3, tanto en el músculo como en la fascia (TIMP-3 es el único inhibidor de MMPs fuertemente ligado a la MEC, con la propiedad de evitar la liberación de TNF-alfa de la membrana celular); una sobreexpresión de TNF-alfa y un descenso de sus receptores; y una sobre-expresión de IL6, especialmente en músculo. En conjunto, y desde una perspectiva clínica, los resultados sugerían una inflamación (¿molecular?) subyacente, crónica, que asociada a la disrupción de fibras de la MEC por un exceso de actividad MMP podría impactar en la homeostasis del tejido conectivo y, a la larga, provocar la ruptura del tejido, apremiando la necesidad de investigaciones posteriores sobre el microentorno local.

5.2.1 Cambios degenerativos en el músculo de los pacientes afectos de HI

Para observar la arquitectura y composición general del músculo, y también la morfología de las fibras empleamos diferentes tinciones histológicas, inmunohistoquímicas y enzimáticas (EHQ) utilizadas de manera rutinaria en la práctica clínica para el estudio de enfermedades musculares. Tanto para la realización de las técnicas como para su interpretación se contó con la colaboración y el asesoramiento de patólogos especialistas vinculados al Servicio de Anatomía Patológica del HUVH.

En una primera fase evaluamos la forma y el tamaño de las fibras musculares y la presencia de diferentes características partiendo de las diversas secciones histológicas (Figura 36, Figura 37). La valoración semicuantitativa de los resultados se muestra en la (Tabla 7), e incluye el análisis de: 1) la presencia de infiltrados inflamatorios, fibrosis, adipocitos, rotura de fibras, vacuolas, necrosis, regeneración, fibras hialinas y fibras en anillo (H&E), y acumulación de GAGs (azul alcian); y 2) una valoración (indirecta) de la actividad mitocondrial (tricrómico de Masson; EHQ NAD diaforasa).

Como puede observarse, ninguno de los pacientes estudiados mostró un índice de severidad (IS) superior a 2 (= presencia generalizada o leve del ítem). En realidad, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los enfermos que presentaban un IS=1, siendo la incidencia de este nivel (IS=1, presencia leve y focalizada del ítem) superior para diferentes parámetros en las muestras de pacientes con HI. En particular y como tendencia, las muestras derivadas del tejido con HI mostraron fibras menos compactas y de tamaño más variable que las del grupo control no-HI (las áreas de sección transversal –*cross-sectional area*, CSA- globales fueron superiores en la HI y mostraron una mayor dispersión). Además, en las muestras de HI se observaron focos de necrosis, áreas hipercelulares (fibroblastos y algunos infiltrados inflamatorios) con abundante depósito de MEC (fibras conectivas y GAGs) y presencia de áreas de regeneración muscular, mostradas por la presencia de fibras musculares con núcleos centrales, siendo el porcentaje de estas fibras superior en las muestras de HI. El resto de parámetros fue similar para ambos grupos (Figura 37; Tabla 7). Finalmente, las técnicas de inmunohistoquímica evidenciaron una presencia más abundante de colágeno de tipo IV en las láminas basales de las miofibras musculares; presencia fibroblastos vimentina-positivos en el tejido conectivo intramuscular (TCI); cúmulos de desmina en las zonas marginales de las miofibras; y un marcaje de α -SMA también limitado a las paredes vasculares, sin presencia de miofibroblastos (Figura 36).

Finalmente, y con la intención de correlacionar las características histológicas encontradas con posibles efectores mecanicistas de la regeneración muscular evaluamos la expresión de dos factores reguladores miogénicos (MRFs): la proteína de diferenciación miogénica (MyoD) y la miogenina. El MyoD se expresa en la primera fase de la regeneración participando en la determinación del linaje del mioblasto y en el proceso de proliferación de las células satélites, y la miogenina en la tardía promoviendo su diferenciación y mantenimiento (58). Como puede observarse en la Figura 36, los niveles de expresión en muestras representativas de cada grupo confirmó que tanto la expresión de MyoD como de miogenina fue superior en

los tejidos derivados de IH, indicando un posible estado regenerativo activo en el músculo esquelético al nivel local.

Tabla 7. Frecuencia de los índices de severidad de las características miopatológicas

Índice de severidad	No-HI (n=20)			HI (n=20)			P valor
	0	1	2	0	1	2	
<i>Característica patológica</i>							
<i>Células inflamatorias</i>	20			8	12		**
<i>Miofibras en regeneración</i>	18	2		6	12	2	**
<i>Miofibras necróticas</i>	20			12	7	1	**
<i>Miofibras divididas</i>	20			16	4		
<i>Fibrosis perimisial</i>	18	2		14	6		
<i>Fibrosis endomisial</i>	16	4		8	12		*
<i>Células adiposas</i>	18	2		16	4		
<i>Miofibras atrofiadas</i>	20			18	2		
<i>Miofibras hipertrofiadas</i>	20			20			
<i>Agrupamiento de miofibras</i>	20			20			
<i>Cores</i>	20			20			
<i>Miofibras Moth-eaten</i>	20			20			
<i>Targets</i>	20			20			
<i>Miofibras hialinas</i>	20			18	2		
<i>Miofibras con anillo (Ring)</i>	18	2		18	2		
Área de sección o CSA (μm^2)							
<i>CSA de las miofibras</i>	4083± 282			5662 ± 538			*
<i>Desviación estándar del CSA</i>	846			1704			*

Los datos se presentan como n. Las frecuencias para IS>2 no se muestran ya que ninguno de los pacientes mostró valores IS>2 para ninguna de las características evaluadas. Atrofia o hipertrofia: tamaño y/o forma de fibras anormales; infiltrado inflamatorio: macrófagos y leucocitos; lesiones tipo core: zonas libres de tinción enzimática oxidativa; lesiones apolilladas (moth-eaten fibres): tinción irregular debida a una disrupción intermiofibrilar; lesiones tipo diana o target: núcleo no reactivo rodeado de un borde de tinción más oscuro; fibras hialinas: fibras redondeadas, teñidas intensamente con H&E; fibras en anillo: intensa tinción subsarcolémica. Pacientes con HI (n=20), pacientes control no-HI (n=20). Prueba exacta de Fisher o prueba t de Student. El grado de significación se refiere al IS=1; *P < 0.05; ** P < 0.01.

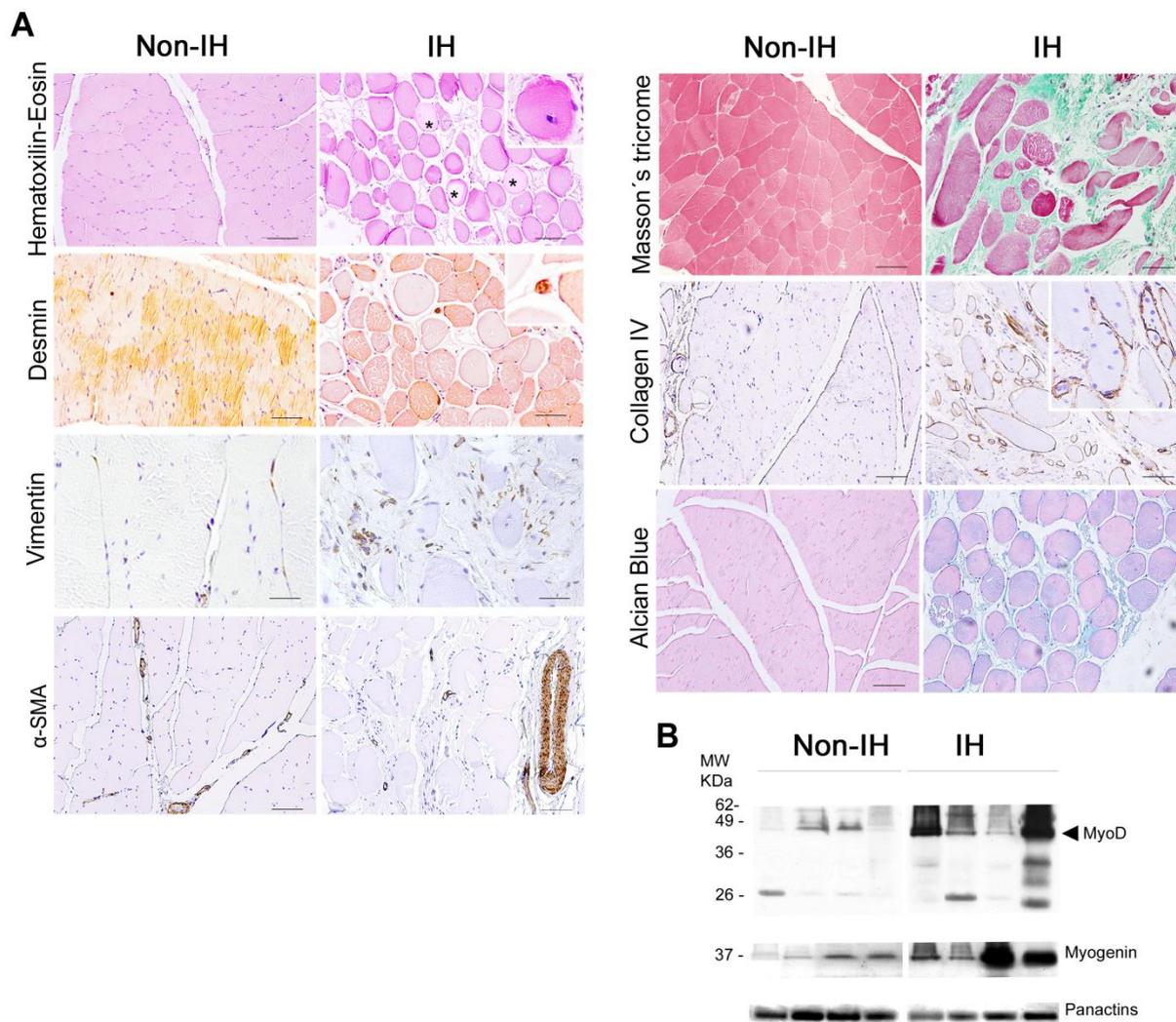


Figura 36. Características histológicas del músculo esquelético y del tejido conectivo intramuscular (TCI). Secciones representativas de muestras de pacientes con hernia incisional (IH) y pacientes control (no-IH), teñidas con H&E, Tricrómico de Masson, Azul alcian, y con anticuerpos anti-desmina, anti-vimentina, anti α -SMA; y anti-colágeno de tipo IV. (A) En las diferentes tinciones, destaca que las muestras de pacientes con HI presentan áreas de apariencia fibrótica con abundante depósito de MEC, fibroblastos positivos para vimentina, y presencia de miofibras en regeneración con núcleos centrales. Se observan también aglomerados de desmina en las zonas marginales de las miofibras (apreciable en la inserción a más magnificación), y más marcaje para colágeno de tipo IV. Magnificación: H&E, colágeno IV, y células necróticas (asteriscos: H&E), 100x (barra de escala = 100 μ m), excepto en la tinción de vimentina, 200x (barra de escala = 50 μ m). (B) Inmunotransferencia de membranas representativas de homogeneizados totales de biopsias de músculo esquelético para los factores de regeneración miogénicos MyoD y miogenina. Las pan-actinas se utilizaron como control de carga.

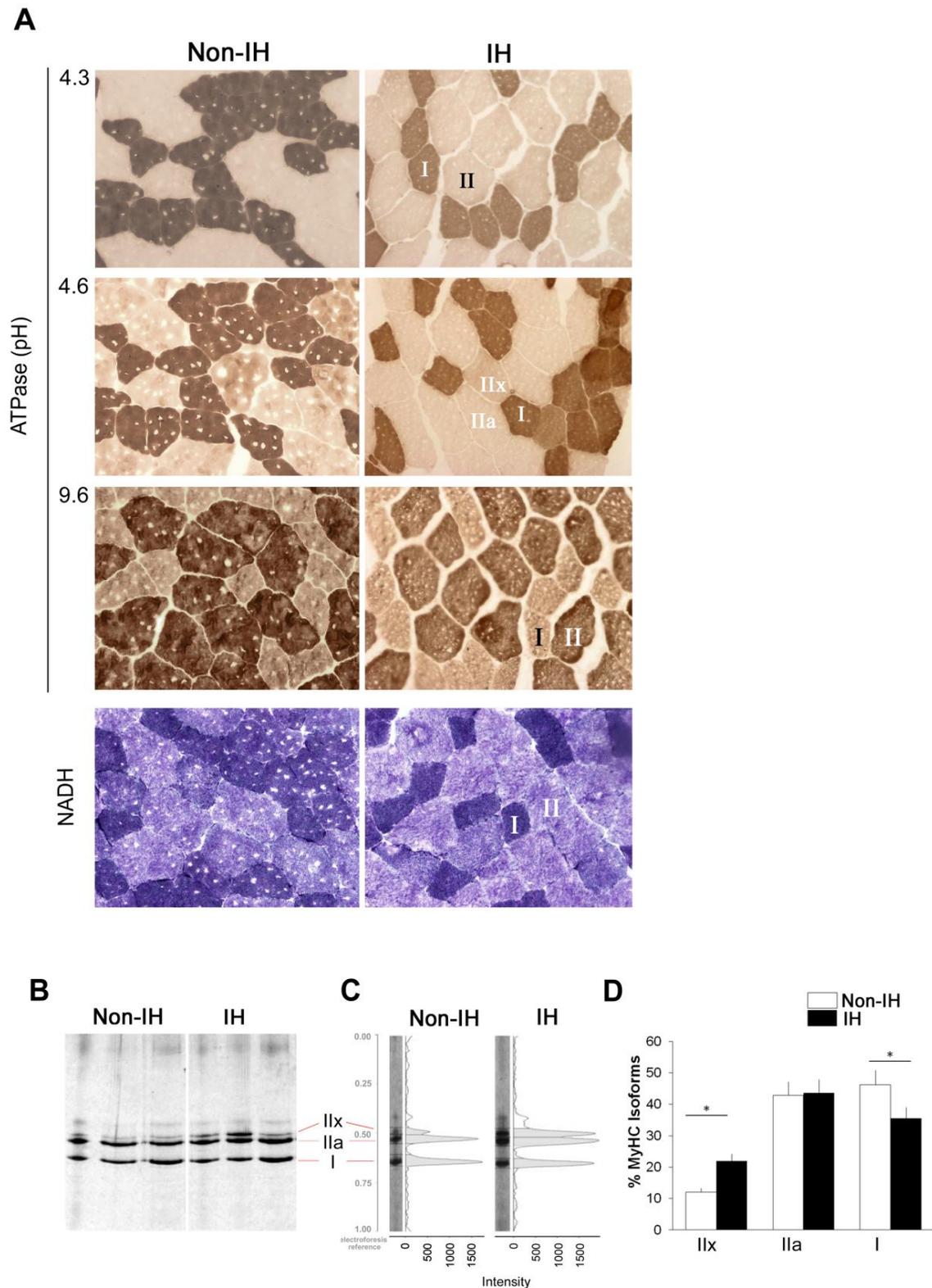


Figura 37. Caracterización de las miofibras musculares. (A) Imágenes representativas de las tinciones EHQ con ATPasa miosínica (incubación a 3 pH distintos: 4.3 –fibras tipo I, IIc; 4.6 – fibras tipo I, IIx y IIc- y 9.6 –fibras de tipo II-), y NADH (NAD diaforasa, actividad mitocondrial y diferenciación de tipos de fibra), de pacientes con hernia incisional (IH) y pacientes control (no-IH). Magnificación: 200x. (B, C y D) Resolución de las isoformas de la cadena pesada de la miosina (MyHC) mediante electroforesis SDS-PAGE, en muestras representativas de biopsias derivadas de pacientes con hernia incisional (IH) y pacientes control (no-IH) (B); análisis densiométrico (C) y cuantitativo (D, % respecto el total) de la expresión de las isoformas de la cadena pesada de la miosina en pacientes con hernia incisional (IH, n=16) y pacientes control (no-IH, n=16); * $P < 0.05$, prueba t de Student.

5.2.2 Las muestras de pacientes con HI muestran cambios en la expresión de isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC)

La identidad muscular se establece durante el desarrollo embrionario en respuesta a diferentes mecanismos intrínsecos de control miogénico. Posteriormente, hay múltiples vías de señalización implicadas en el cambio del tipo de fibras musculares en situaciones fisiopatológicas diversas lo que confiere una importante variabilidad interindividual. La miosina es la proteína predominante del músculo esquelético y es la principal responsable de su función contráctil. Está constituida por cuatro cadenas ligeras y por dos cadenas pesadas (MyHC), de las que se conocen hasta nueve isoformas. El análisis de las isoformas de MyHC, cuyo inventario y patrón de expresión completos ya están disponibles, proporciona un marcador útil para clasificar los diferentes tipos de fibras musculares (51).

Aplicado a nuestra situación, el análisis histológico por EHQ (Figura 37; tinciones ATPasa-miosínica pH 9.4 y NADH) destaca que las muestras derivadas de pacientes con HI mostraron una menor proporción de fibras de tipo I y un mayor predominio de fibras de tipo II (~1:3 vs 2:3 respecto al grupo control), las cuales resultaron ser también aparentemente más pequeñas (~ 50-70%) que las de tipo II. El análisis electroforético (SDS-PAGE modificada) de las MyHC confirmó la resolución de tres bandas con una movilidad paralela a los tipos I, IIa y IIx de las cadenas MyHC humanas. Interesantemente, en las muestras de HI se confirmó un incremento en la expresión de la isoforma IIx y una disminución de la isoforma I en comparación a las muestras derivadas de los pacientes control no-HI, compatible con una conmutación del tipo de miofibras que en última instancia podría afectar a la funcionalidad muscular.

5.2.3 El componente inflamatorio se encuentra incrementado en las muestras de pacientes con HI de forma localizada y leve

La presencia de focos de hiper celularidad en el análisis histológico de las muestras de HI acompañados de cambios sugestivos de degeneración y de regeneración muscular, nos impulsó a realizar una caracterización más exhaustiva del infiltrado celular potencialmente inflamatorio (77).

Efectivamente, y diferencia de lo que ya acabamos de describir para las muestras de fascia en las que no se detectaron células inflamatorias en ninguno de los casos, en las muestras de músculo esquelético de pacientes con HI se observaron pequeños focos con marcaje positivo (IS=1) para: linfocitos T y B (CD45, CD3, CD20), macrófagos (CD68) y neutrófilos polimorfonucleares (PMN, tinción PAS, ácido periódico de Schiff). Notablemente, se observaron pequeños cúmulos ocasionales de PMN entre las miofibras, en contacto íntimo con la lámina basal (Figura 38, Tabla 7). El grado leve y focalizado del infiltrado inflamatorio podría indicar que no se trata de un infiltrado asociado a una reparación aguda, si no de tipo crónico, sugiriendo una inflamación crónica de bajo intensidad (*chronic low grade inflammation*) (102), que a su vez correlacionaría también con nuestros hallazgos anteriores en los que ya describimos una desregulación inflamatoria molecular en la muestras del tejido muscular de pacientes con HI (28).

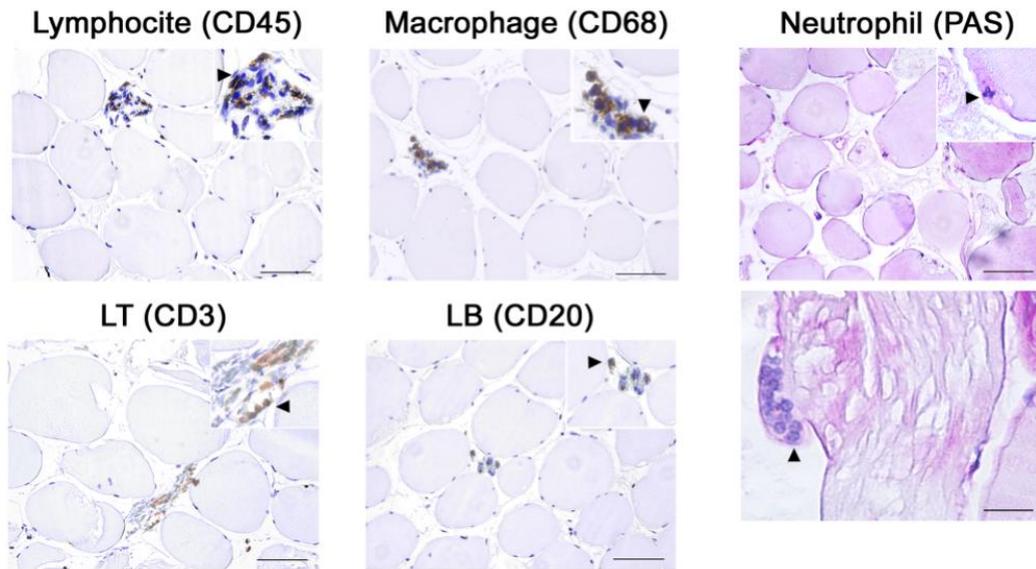


Figura 38. Caracterización del componente inflamatorio. Muestras representativas del marcaje por inmunohistoquímica de muestras derivadas de biopsias de pacientes con HI. Marcaje específico para linfocitos totales (CD45), macrófagos (CD68), linfocitos de tipo T (LT, CD3) y linfocitos de tipo B (LB, CD20). El triángulo en las magnificaciones indica el marcaje específico para cada condición. En la tinción con PAS puede observarse el contacto estrecho entre neutrófilos y miofibras. Magnificación: 200x (barra de escala=50 μ m) y en la imagen inferior de la tinción con PAS 600x (barra de escala=25 μ m).

5.2.4 Activación de posibles mecanismos apoptóticos en las vías apoptóticas en las muestras de pacientes con HI

A la luz de lo descrito hasta ahora, y también para comparar si lo ya observado al nivel de la fascia sucedía en el músculo esquelético, en un siguiente paso evaluamos los índices de TUNEL -indicador, como ya hemos comentado previamente de muerte celular- y de PCNA –asociado a la proliferación, pero también a procesos de reparación del DNA.- Tal y como puede observarse en la (Figura 39), los índices de TUNEL y PCNA, y a semejanza de lo ya observado en la fascia de pacientes con HI resultaron estar incrementados, tanto en las propias miofibras, como al nivel del TCI endomisial. Para el espacio endomisial, asumimos que este marcaje era fundamentalmente atribuibles a los fibroblastos (tanto por su condición de células positivas para vimentina, como por su morfología celular). Además, también en las miofibras se halló un correlación positiva entre los núcleos TUNEL-positivos y los PCNA-positivos ($r=0.850$; $P=0.001$) al igual que en el TCI endomisial ($r=0.740$; $P=0.001$). Adicionalmente se valoró el índice Bcl-2 en las miofibras, un marcador con carácter fundamentalmente antiapoptótico, siendo superior en las miofibras de los pacientes con HI y mostrando una correlación positiva, aunque más débil ($r=0.60$; $P=0.01$), con los núcleos con marcaje positivo para TUNEL.

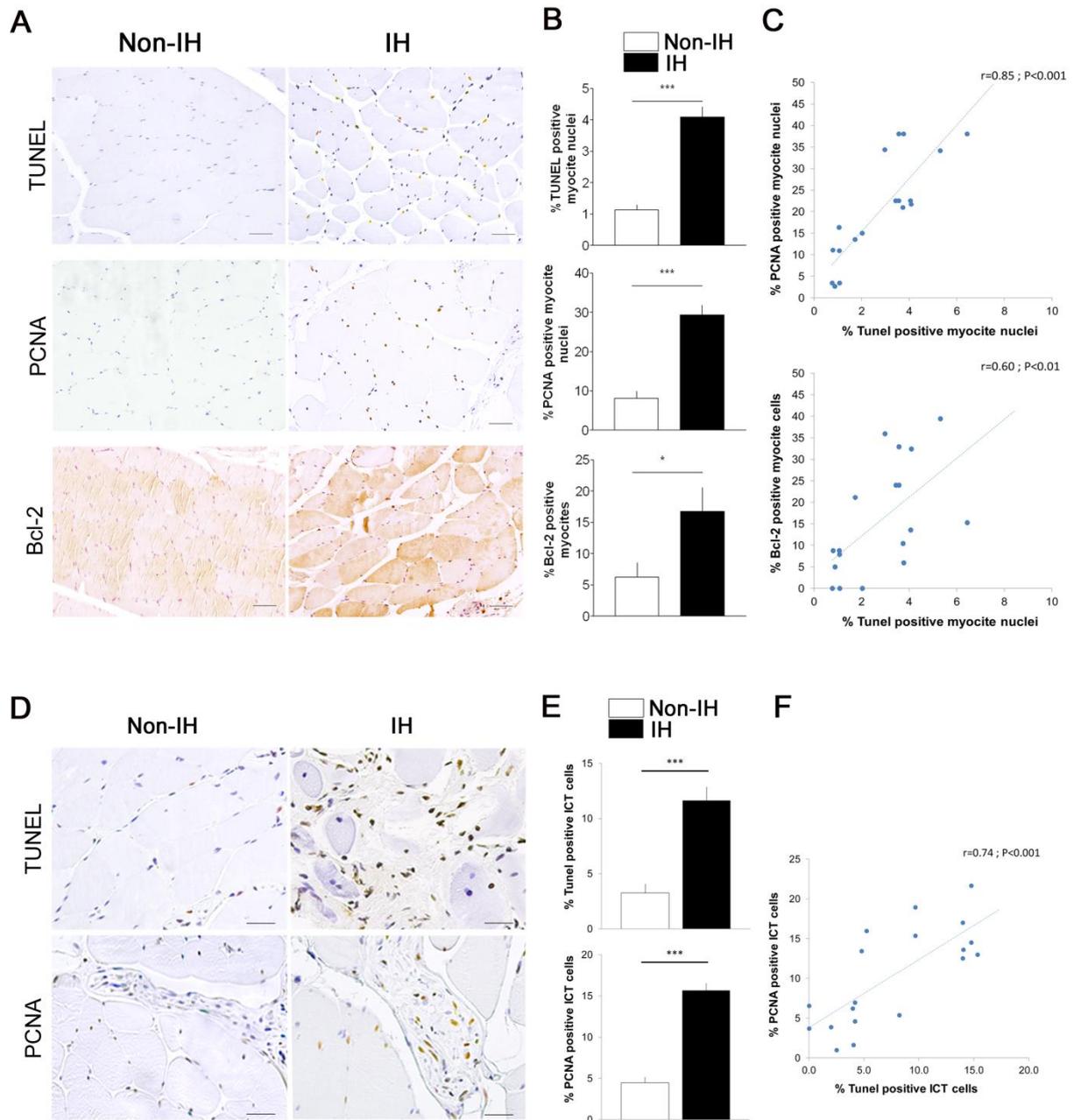


Figura 39. Marcadores de apoptosis, proliferación celular, y Bcl-2 en el músculo esquelético. (A) Secciones representativas de muestras de pacientes con hernia incisional (IH, n=20) y pacientes control (no-IH, n=20), según las tinciones inmunohistoquímicas de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dNTP-biotin nick end labeling), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) y BCL-2, y (B) análisis estadístico de la cuantificación de los índices correspondientes y (C) de sus correlaciones en las miofibras. (D) Secciones representativas de tinciones inmunohistoquímicas de TUNEL y PCNA, y (E) análisis estadístico de la cuantificación de los índices correspondientes y (F) de sus correlaciones en las células del endomisio del TCI, de las mismas muestras. Magnificación: 200x (barra de escala= 50 μ m) (A); 400x (barra de escala= 50 μ m) (B). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, prueba t de Student.

Como paso siguiente, analizamos también la presencia de caspasa-3 y de diferentes sustratos del citoesqueleto susceptibles de ser fragmentados por esta mediante inmunotransferencia de membranas (Figura 40). Los resultados confirmaron los mismos hallazgos ya observados en la fascia. Es decir, en las muestras derivadas de pacientes con HI se observaron niveles incrementados pro-caspasa-3 y de sus principales fragmentos activos con actividad proteolítica, concomitante una fragmentación incrementada de vimentina, α -fodrina, y PARP. Además, en este caso, se analizó también la desmina (principal filamento intermedio de las fibras musculares), confirmándose también unos niveles incrementados de fragmentación superior en las muestras de HI (que tal vez podrían relacionarse con los agregados de desmina que acabamos de describir para las tinciones por inmunohistoquímica), lo que sugiere que, efectivamente, la activación de procesos apoptóticos afecta también al tejido muscular. Finalmente, por otra parte, ni la β -tubulina ni la actina presentaron evidencias de fragmentación, lo que confirmaría la especificidad del proceso. En conjunto, estos resultados sugieren que pueden existir mecanismos apoptóticos incrementados a nivel global en el músculo (tanto en las fibras musculares como en el TCI) de los pacientes con HI.

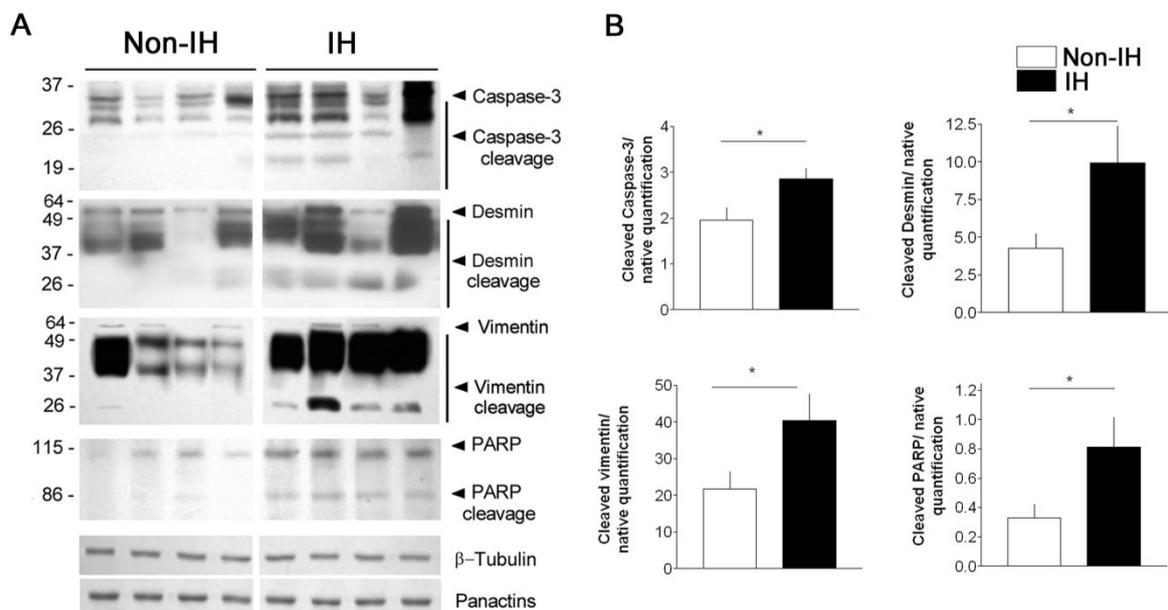


Figura 40. Fragmentación proteolítica de la caspasa 3 de sustratos del citoesqueleto en el músculo. A: Inmunoblots representativos de músculo de no-HI y HI. La pan-actina se usó como control de carga para su normalización. B: Análisis densimétricos de la expresión de la proteína nativa y fragmentada, en no-HI (n = 8) y HI (n = 8) (ns, no significativa; *P < 0.05, Student's t-test).

5.2.5 El músculo esquelético de los pacientes con HI muestra una expresión génica de proteoglicanos alterada

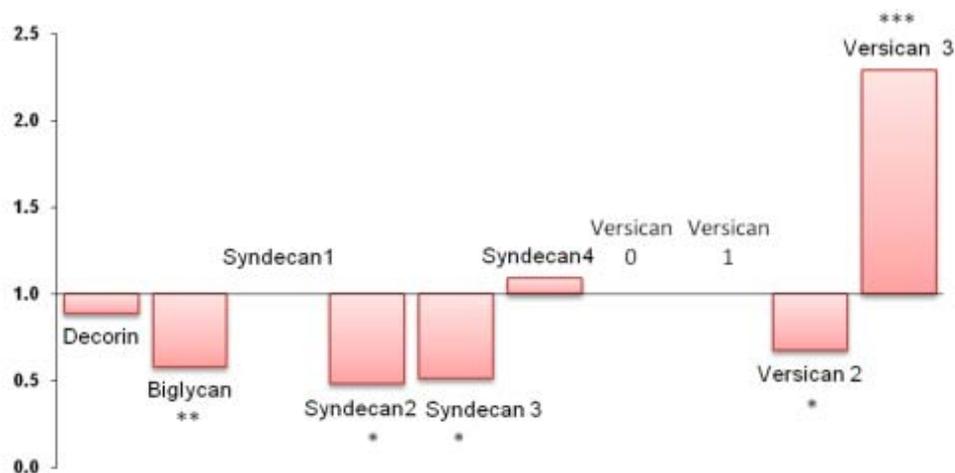
Las diferencias observadas en la tinción histológica con azul alcian sugerían que también en el músculo esquelético de pacientes con HI podrían encontrarse alteraciones en la expresión de diferentes PGs que, a su vez, podrían afectar diferentes funciones biológicas y eventualmente actuar como biomarcadores para la HI.

Gene	L19-normalized expression (mean \pm SEM)		Overall Ratio IH/non-IH	Student's t-test <i>p</i> -value (n=16)
	IH	Non-IH		
Decorin	0.89 \pm 0.06	1.00 \pm 0.08	0.89	0.273
Biglycan	0.57 \pm 0.10	0.99 \pm 0.10	0.58	0.007 **
Syndecan 1	n.e	n.e	n.e	
Syndecan 2	0.26 \pm 0.05	0.54 \pm 0.10	0.48	0.021 *
Syndecan 3	0.17 \pm 0.05	0.33 \pm 0.05	0.51	0.024 *
Syndecan 4	0.77 \pm 0.08	0.70 \pm 0.06	1.09	0.513
Versican 0	n.e	n.e	n.e	
Versican 1	n.e	n.e	n.e	
Versican 2	0.71 \pm 0.12	1.05 \pm 0.12	0.68	0.049 *
Versican 3	0.58 \pm 0.07	0.25 \pm 0.06	2.29	0.001 ***
Col IV	1.13 \pm 0.05	0.91 \pm 0.04	1.24	0.019 **

n.e = no observable gene expression

Figura 41. Análisis de la expresión de diferentes proteoglicanos por reacción de RT-PCR en muestras derivadas del músculo esquelético de pacientes control no-HI (n=16) y pacientes con HI (n=16). Panel superior: Productos de la reacción de RT-PCR resueltos por electroforesis en geles de agarosa 1-2%. Panel central: Análisis estadístico de la expresión de los genes, normalizados con el gen de referencia ribosomal L19. Panel inferior: Representación gráfica de los ratios de expresión HI/no-HI.; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, prueba t de Student.

ratio IH/non-IH gene expression



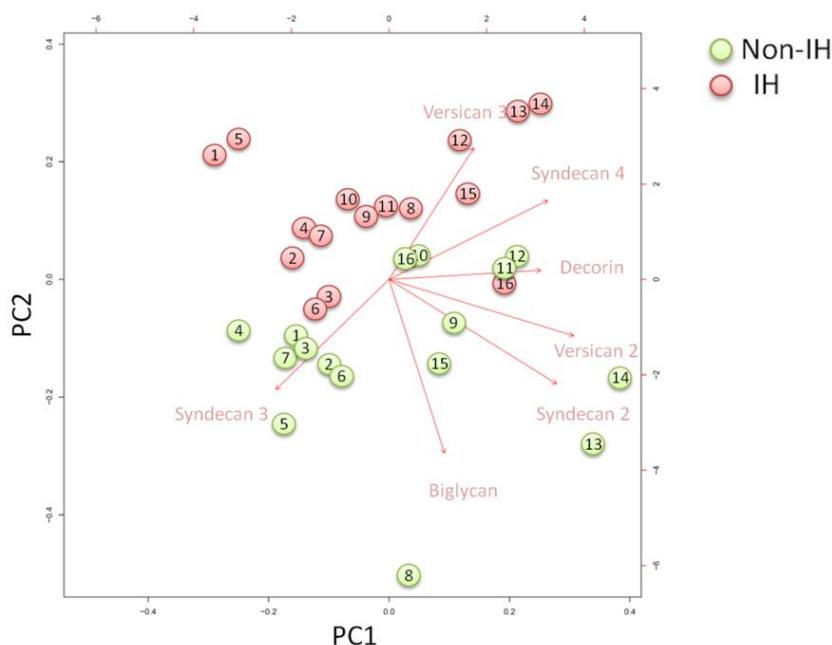


Figura 42. Representación biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la expresión de los proteoglicanos obtenida por reacción de RT-PCR, normalizadas con L19. En el gráfico biplot se representan simultáneamente las diferentes variables (proteoglicanos) y los resultados de las observaciones obtenidas (pacientes), teniendo como ejes los dos primeros componentes principales. Así, se puede observar como los dos grupos de estudio se distribuyen de forma separada (a excepción del paciente 16, del grupo de HI). El primer componente parcial (PC1) explica el 55% de la variabilidad encontrada y el segundo (PC2) el 25%.

Efectivamente, el análisis por reacción de RT-PCR confirmó la expresión diferencial para las isoformas de sindecanos -2 y -3, (PGs celulares) y para los PGs biglicano y versicano-2 (PGs extracelulares), los cuáles se encontraron infra-expresados en la HI. Como PGs sobre-expresados sólo se encontró la isoforma versicano-3. De forma adicional, en el análisis por reacción de RT-PCR, también se incluyó el colágeno de tipo IV con el fin de corroborar los resultados obtenidos en la tinción inmunohistoquímica del tejido, confirmándose también su sobre-expresión por RT-PCR en la HI (Figura 41). Finalmente, mediante el análisis de PCA también pudimos comprobar que los pacientes de ambos grupos se agrupaban separadamente en función de los resultados obtenidos (Figura 42).

Merece la pena comentar el hecho de que las diferencias de expresión génica entre la HI y la no-HI, fueron cualitativa y sensiblemente distintas de las observadas en la fascia, lo que por una parte sugiere una alteración específica de tejido (i.e., en músculo esquelético no detectamos expresión de sindecano-1, ni del versicano 0 o 1, indicando la unicidad del tejido). A su vez, observando la expresión génica del núcleo proteico de estos PGs parece que el balance neto se inclina hacia una disminución total en la HI (a excepción de versicano-3), lo que tal vez contradice lo observado al nivel de histología con la tinción de azul alcian. Una posible explicación podría ser que no estuviésemos considerando otros tipos de PGs sulfatados que sí que pudieran estar sobre-expresados en la HI. O bien, y probablemente más fehacientemente viendo el patrón de expresión de azul alcian en músculo, podría ser que al nivel de la reacción por RT-PCR estuviésemos apreciando fundamentalmente la expresión génica total de las fibras musculares, en detrimento de la de la fracción

ocupada exclusivamente por el TCI el cual se encuentra en poca abundancia relativa respecto al total del músculo (de ahí surgiría la discordancia entre la fuerte intensidad de azul alcian en la MEC del TIC y los valores de expresión génica). Una muestra a favor de esta segunda explicación podría ser la concordancia observada entre los resultados de la tinción inmunohistoquímica para el colágeno IV (características de láminas basales) y su expresión génica, también incrementada en la HI.

Con la intención de avanzar un poco más, realizamos inmunotransferencias de membrana para el tejido muscular utilizando un anticuerpo anti-versicano. Como puede observarse en la Figura 43, la expresión total de bandas específicas para versicano fue mayor en las muestras derivadas de pacientes con HI. Así, en una primera inmunotransferencia sin tratamiento con condroitinasa ABC (PGs unidos a GAGs) se observaron 3 zonas o bandas más intensas: una banda o zona >150 KDa, una banda de ~64 KDa, y una banda < ~26 KDa, todas ellas de mayor intensidad en los pacientes con HI, si bien sólo con significación estadística para la banda ~26 KDa (aunque en la >150 KDa también se observó una fuerte tendencia significativa, $P=0.056$). Por otra parte, el análisis de ANOVA de dos factores mostró que tanto el factor banda ($F<0.001$) como el factor grupo ($F<0.001$) eran significativos (sin observarse interacción entre ellos). Después de aplicar un tratamiento con condroitinasa ABC desaparecieron multitud de bandas de la inmunotransferencia de membranas, en relación al análisis de versicano que acabamos de describir sin tratamiento, permaneciendo solo las zonas o bandas descritas anteriormente, viéndose claramente en las muestras de HI. Así pues, y a pesar de no haber detectado expresión por reacción de RT-PCR de los versicano 0 y 1 (372 KDa y 265 KDa, respectivamente), sí que se pudieron detectar bandas proteicas >150 KDa, que podrían corresponder o bien a estas isoformas de versicano y/o a la isoforma de versicano-2 (182 KDa). Finalmente, y aunque la expresión génica de versicano-3 era apreciable en la reacción de RT-PCR, las bandas observado en la inmunotransferencia de menor peso molecular (~64 KDa y ~26 KDa), no corresponden exactamente con la descrita para el versicano-3 (74 KDa).

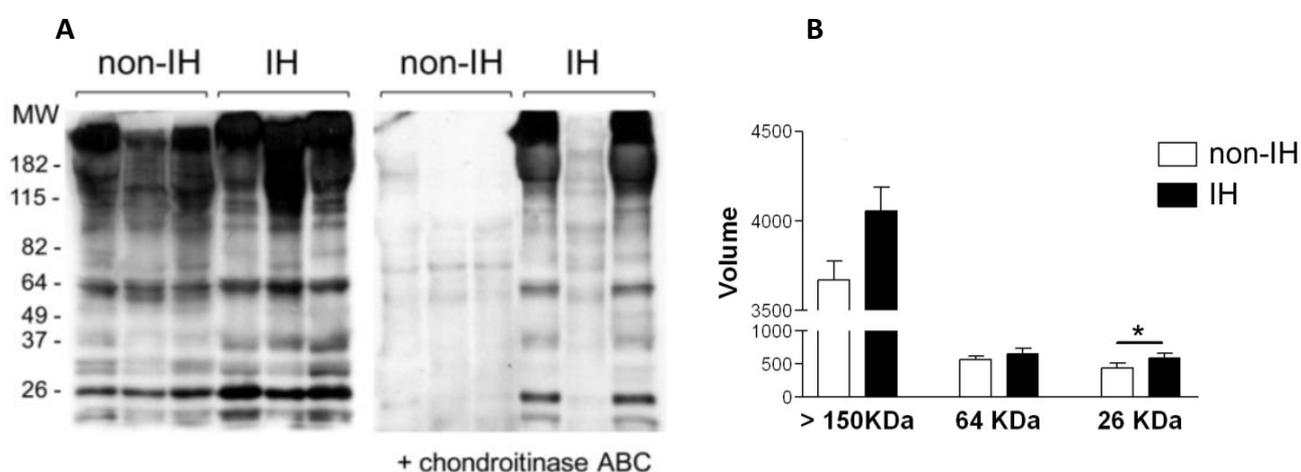


Figura 43. Expresión proteica de versicano. (A) Análisis representativo de inmunotransferencia de membranas en muestras de músculo esquelético de pacientes con hernia incisional (IH, n=8) y pacientes control (no-IH) para versicano, sin y con condroitinasa ABC. (B) Análisis densitométrico y cuantitativo de las bandas observadas sin el tratamiento de condroitinasa (media \pm ESM). Volumen: Densidad óptica \times mm². * $P < 0.05$, prueba t de Student.

Nuestra conclusión es que, y a pesar de que ha sido descrito en la bibliografía (310), este bandeo <150 kDa es complicado de interpretar debido a que el anticuerpo primario reconoce todas las formas de versicano, sin especificidad para ninguna de las isoformas. Dado que los versicanos son sustratos de diversas MMPs (1, 2, 3, 7 y 9), de enzimas de la misma familia, como la ADAMTS, así también como de la serina-proteasa plasmina (311), tal vez fragmentos observados en la inmunotransferencia podrían ser debidos a una actividad proteolítica incrementada y permanente en los pacientes con HI (28).

5.2.6 Los fibroblastos del TCI de los pacientes con HI muestran un fenotipo patológico

Siguiendo lo observado previamente en la fascia, y teniendo en cuenta que los fibroblastos residentes en el del TCI son los principales responsables del mantenimiento de la MEC local, indispensable para un funcionamiento adecuado del tejido muscular, también quisimos analizar el comportamiento *in vitro* de fibroblastos primarios derivados de biopsias peroperatorias del tejido de músculo esquelético de pacientes con HI y control.

También en el músculo se observaron diferencias al nivel de eficiencia en la obtención de células primarias a partir de explantes de los tejidos biopsiados, de modo que sin tratamiento previo con tripsina para disgregar el tejido, la eficiencia en los derivados de HI era superior (HI, 60% vs 7% no-HI.; $P < 0.05$). En este caso, y a pesar de las diferencias, sí que se obtenía algún cultivo de pacientes control no-FHIs, a diferencia de la fascia en la que su obtención era nula. Esto refleja también las propiedades físicas diferenciales de ambos tejidos, teniendo la fascia tiene una estructura más compacta y rígida que el músculo. La facilidad con la que se obtenían células a partir de muestras de músculo de HI sin necesidad de disgregación previa, correlaciona de nuevo y al igual que en la fascia con la pérdida de estructura ya observada al nivel del análisis histológico. Los fibroblastos fueron también positivos para vimentina y CD90, según tinciones inmunocitoquímicas. La tinción de β -galactosidasa indicó también una presencia muy baja (<1%) de células senescentes en ambos grupos de estudio.

Así pues, parecía que varias de las características observadas en los fibroblastos de fascia se observaban también en los fibroblastos del TCI del músculo esquelético, con lo que decidimos proseguir con la caracterización morfológica y funcional. Además, en este caso (fibroblastos primarios de músculo), se analizaron células procedentes de cultivos en confluencia (*confluent*) y no confluentes (*non-confluent*) para poder evaluar el efecto del contacto célula-célula al nivel del citoesqueleto (en el caso de la fascia no nos había parecido necesario dado que su hábitat natural es el de ser células aisladas rodeadas de MEC, mientras que en el músculo esquelético el contacto entre células es evidente).

5.2.6.1 Principales características de los FHIs del TCI del músculo esquelético observadas *in vitro*

Al nivel morfológico, y en la modalidad de cultivos no confluentes, los fibroblastos derivados del músculo esquelético se comportaron de manera similar a los fascia. Así pues, los fibroblastos de HI (FHIs) mostraban una

superficie celular menor y se encontraban más polarizados. Presentaban también menos proyecciones citoplasmáticas, una red de filamentos de actina (fibras de estrés y geodomas) menos organizada, y una red de vimentina citoplasmática menos densa, en comparación con los fibroblastos procedentes de pacientes control (no-FHIs).

Aparte de estas diferencias morfológicas, también se pudieron detectar alteraciones en la red de actina y las adhesiones focales (AF). Aparentemente, los FHIs presentaban un patrón de AFs característico de células que migran (312) (312): el marcaje por vinculina identificaba en el frente de avance celular AF nacientes ($0.5 \mu\text{m}, \varnothing$) (en el filopodium/lamellipodium), complejos focales esféricos ($0.5 \mu\text{m}, \varnothing$) (en la zona de transición entre el lamellipodium y el lamellum), y AF elipsoides en el lamellum y límite posterior ($2 \mu\text{m}$, longitud). En algunos casos, estas AFs se conectaban longitudinalmente por filamentos de actina o fibras de estrés (arcos transversales y dorsales). En el filopodium/lamellipodium también se podían identificar estructuras de actina ramificadas. La distribución de la vinculina coincidía con la de paxilina y la FAK en los complejos focales y en las AFs. Por el contrario, y de forma notoria, los FHIs no presentaron adhesiones fibrilares ($>5 \mu\text{m}$, longitud), si bien sí que existía un cierto marcaje para tensina (estas adhesiones fibrilares son estructuras alongadas muy estables, situadas normalmente en la zona central de la célula. Representan un paso de maduración de las AFs, y suelen formarse en fibroblastos cultivados en sustratos ricos en fibronectina. Se asocian a procesos de remodelación de la MEC, y al ensamblaje de fibronectina y no abundan en células migratorias (312) (312). Por el contrario, los fibroblastos control no-FHIs, mostraron características propias de proto-miofibroblastos/miofibroblastos exhibiendo: una tasa para el área de AF total/área celular superior (también el área individual de las AFs fue mayor), más fibras de estrés y geodomas, y una expresión de α -SMA superior (313; 314). En este caso, sí que se observaron abundantes y extensas ($>10 \mu\text{m}$, longitud) adhesiones fibrilares (Figura 44, Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de los fibroblastos del TCI en cultivos no-confluentes y confluentes

	No-HI	HI	P-valor
Eficiencia del cultivo celular			
Digestión sin tripsina (n)	20	14	
Éxito % (%)	7	60	*
Digestion con tripsina (n)	20	20	
Éxito (%)	78	83	
Tiempo de aparición de los fibroblastos en el explante	16.3 ± 2.1	9.5 ± 1.3	*
Rendimiento (x 10 ⁶ células/biopsia)	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	*
	<u>No-confluyente/ Confluyente</u>	<u>No-confluyente/ Confluyente</u>	
Análisis morfológico (n=5)			
Área celular (µm ²)	8757 ± 496 / 8844 ± 474	987 ± 49 / 3914 ± 13 ^{††}	**/ §§
Células polarizadas (%)	15.5 ± 1.8 / 2.6 ± 0.4 ^{††}	69.5 ± 2.8 / 3.8 ± 0.6 ^{††}	**/ ns
Estructura de los microfilamentos de actina (n=5) (%)			
Células con geodomas y fibras de estrés	78.4 ± 1.9 / 96.8 ± 0.8 ^{††}	45.0 ± 2.8 / 52.0 ± 1.1	**/ §§
Células con fibras de estrés	25.0 ± 2.2 / 97.1 ± 0.8 ^{††}	6.8 ± 0.8 / 91.0 ± 2.3 ^{††}	**/ ns
Células positivas α-SMA (%)	18.1 ± 1.2 / 23.5 ± 0.5 [†]	7.5 ± 0.3 / 7.6 ± 0.5	**/ §§
Adhesiones focales (AF) (n=5)			
Área (µm ²)	3.1 ± 0.1 / 3.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1 / 2.9 ± 0.1	**/ §§
% área de AF / área célula	5.6 ± 0.2 / 6.6 ± 0.3 [†]	3.3 ± 0.5 / 3.0 ± 0.3	**/ §§

Eficiencia del cultivo celular: * P < 0.05, no-HI vs. HI , prueba t de Student

Análisis morfológico, microfilamentos de actina, adhesiones focales (prueba exacta de Fisher)

Cultivo no-confluyente (no-HI vs. HI): **/ P < 0.001.

Cultivo confluyente (no-HI vs. HI): §§/ P < 0.001, ns: no significativo.

Cultivo no-confluyente vs. confluyente, dentro de cada grupo: [†] P < 0.05; ^{††} P < 0.01,

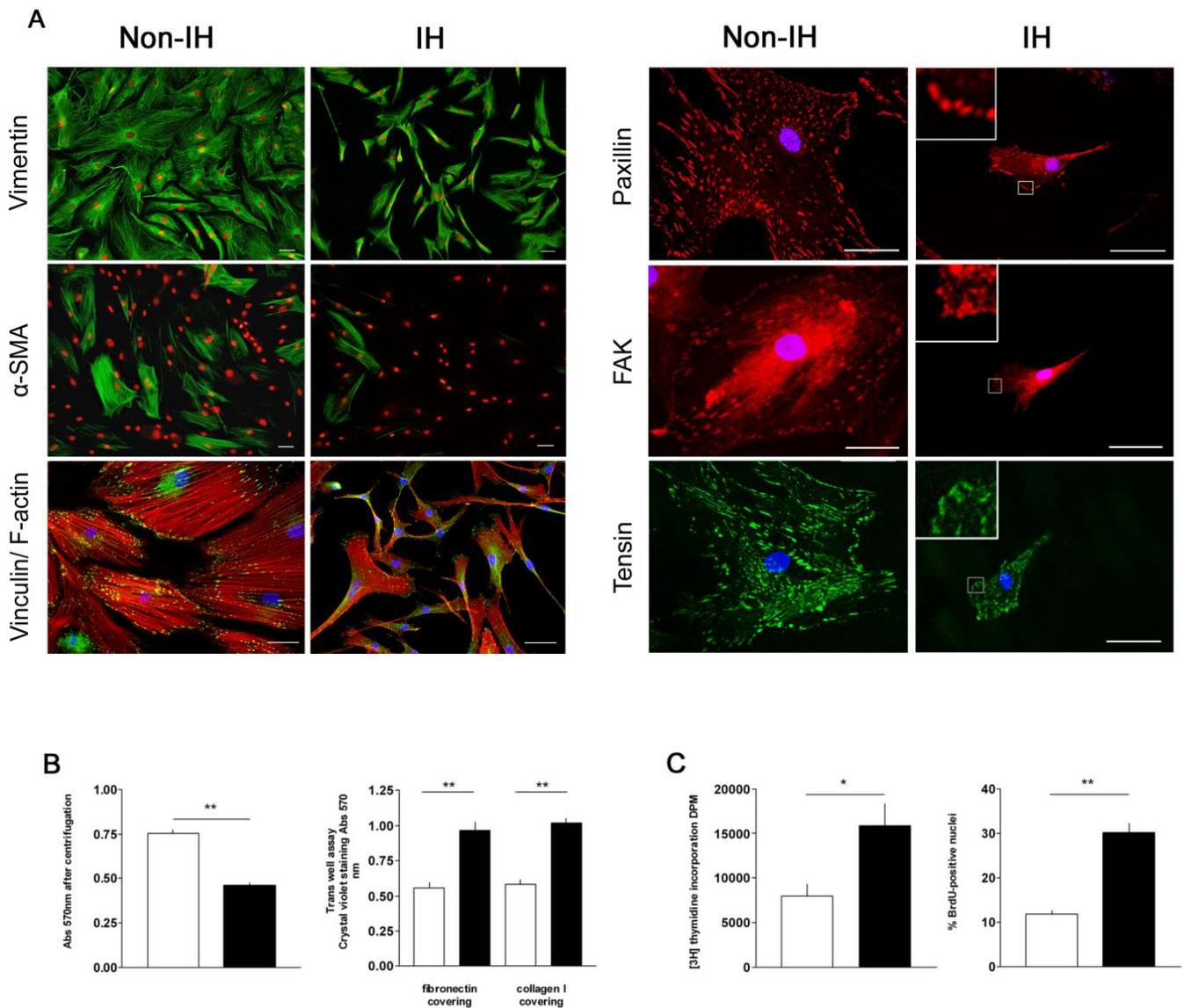


Figura 44. Caracterización de los fibroblastos del TCI de músculo esquelético. Imágenes obtenidas tras la tinción por técnicas de inmunocitoquímica de muestras representativas de fibroblastos primarios derivados de músculo esquelético de pacientes control (no-IH) y pacientes con HI (IH). (A) vimentina (verde), α -SMA (verde), y vinculina/actina (verde/rojo), paxilina (rojo), FAK (rojo), tensina (verde), núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo) o DAPI (azul). En las magnificaciones de las inmunocitoquímicas de los FHIs de paxilina y FAK, se pueden apreciar con más detalle las AF nacientes y los complejos focales. En el caso de la tensina se distinguen pequeños agregados de tensina, que no conforman adhesiones fibrilares en los FHIs. En los no-FHIs se aprecian adhesiones fibrilares que se sitúan mayoritariamente en la parte central. Magnificación: 100x (vimentina, α -SMA), 200x (vinculina/faloidina), 400x (paxilina, FAK y tensina); barra de escala =50 μ m. (B) Cuantificación del ensayo de adhesión al sustrato por centrifugación invertida y migración de los fibroblastos a través del inserto de los transwells recubiertos con fibronectina y colágeno de tipo I de FHIs (n=5) y no-FHI (n=5), media \pm ESEM. (C) Ensayos de proliferación: Incorporación de [³H]-timidina y BrdU (inmunocitoquímica) de FHIs (n=5) y no-FHI (n=5), media \pm ESEM. Abs., absorbancia; DPM, desintegraciones por minuto; no-FHIs (n=5) y FHIs (n=5); *P < 0.05, **P < 0.01, prueba U de Mann-Whitney.

En relación a las propiedades funcionales, y al igual que para los fibroblastos de fascia, en cultivos no-confluentes, los FHIs proliferaron de forma más rápida y mostraron tasas de replicación menores que los fibroblastos control (no-FHIs): PD 16.0 ± 3.0 vs. 25.8 ± 2.7 /día, respectivamente. Esta tendencia también quedó confirmada cuantitativamente mediante la utilización de ensayos de proliferación utilizando la incorporación [3 H]-timidina y de BrdU (inmunocitoquímica).

También, y en concordancia con los resultados obtenidos para la valoración de las AFs, se observó que los FHIs migraban de forma más rápida en el ensayo de transwell, tanto en superficies recubiertas de fibronectina como con colágeno, y también presentaban menos adhesión a las placas de cultivo poliestireno, medida por centrifugación reversa, respecto a los fibroblastos control (esto podría sugerir que la mayor abundancia de AF de tipo estático en los no-FHIs correlacionaba con una mayor capacidad de adhesión al sustrato) (Figura 44, Tabla 8).

En los cultivos confluentes los fibroblastos de pacientes con HI perdieron drásticamente la polaridad observada en cultivos no confluentes, incrementando las fibras de estrés y el área celular. Sin embargo, no se detectó ningún incremento en el número de AFs (ni tampoco de su tamaño), ni en los niveles de expresión de α -SMA. En el caso de los fibroblastos control no-FHIs, los cambios fueron más acentuados de modo que, en cultivos confluentes, se incrementó el número de células que expresaban fibras de estrés (al igual que para los FHIs), pero también la presencia de geodomas y células que expresaban una tinción positiva para α -SMA, y AF de 10 μ m de longitud en la periferia celular, identificadas con el marcaje de vinculina, compatibles con AF supermaduras (*supermature-focal adhesion*). Este tipo de AF son identificables a simple vista por su longitud (8-30 μ m de longitud) y aparecen en cultivos celulares de sustratos muy rígidos (ej. placas de poliestireno), concomitante con la expresión de α -SMA. Aparte de la proteínas estudiadas aquí, vinculina y tensina, las AF supermaduras se caracterizan por estar constituidas por las integrinas α v β 3, α 5 β 1, y FAK fosforilada, esta última participando en procesos de supervivencia y crecimiento celular (315; 316).

Finalmente destacar, que se observaron uniones célula-célula similares a las del tipo *fibronexus* en los IHFs en contacto entre sí, indicadas por el marcaje con vinculina. En este tipo de unión se alinean de forma extensa la actina intracelular (F-actina) y la fibronectina extracelular (segregada por las células) entre dos células en contacto, formando asociaciones trans-membranales de las redes de actina. Se conoce que este tipo de unión entre células permite mejorar la integridad-resistencia de monocapas de células en cultivo frente a estímulos apoptóticos (317). En definitiva, cuando las células fueron cultivadas en confluencia, se mantuvieron diferencias importantes entre los dos grupos (en el mismo sentido de lo que ya había sido observado en los cultivos no confluentes) a excepción del porcentaje de células polarizadas y de células que solo tenían fibras de estrés (Figura 45, Tabla 8).

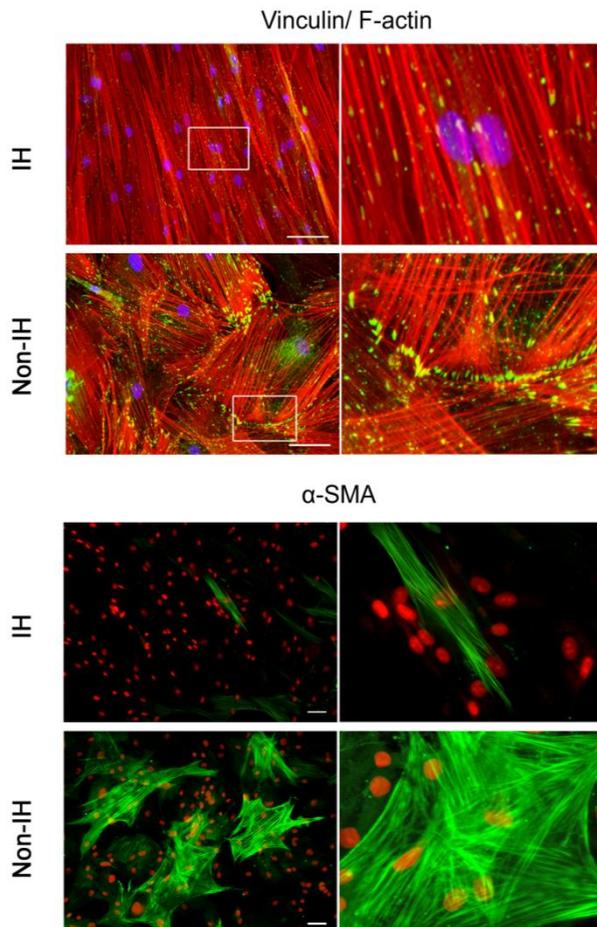


Figura 45. Comportamiento de los fibroblastos del TCI del músculo esquelético en cultivos confluentes. Panel superior: Inmunocitoquímica para vinculina (verde)/ actina (rojo). En los no-FHIs se observa la formación de estructuras de unión tipo fibronexus (recuadro ampliado de la derecha), donde se observa una continuidad de la red de actina entre células contiguas, creándose complejas arquitecturas de microfilamentos de actina a su alrededor. Cerca de estas uniones se aprecian AF supermaduras. Panel inferior: Inmunocitoquímica para α -SMA. En este caso, la confluencia no parece afectar a los FHIs en su expresión y si de forma evidente en los no-FHIs, formándose estructuras complejas entre las células, posiblemente ligada a la presencia de AF supermaduras. Magnificación: 200x; barra de escala=50 μ m. Columna derecha, magnificación. Núcleos marcados DAPI (azul) o con yoduro de propidio (rojo).

5.2.6.2 Los fibroblastos del TCI de músculo esquelético de pacientes con HI muestran una fosforilación incrementada de la vimentina

El citoesqueleto de los fibroblastos, especialmente a través de los filamentos intermedios (vimentina), permite la adecuada mecanotransducción, y la adaptación de las tensiones externas del micro-entorno celular hacia el interior celular contribuyendo a la homeostasis y la correcta funcionalidad del tejido (241). Para seguir profundizando en las posibles repercusiones funcionales de las alteraciones observadas, nos focalizamos en el estudio del citoesqueleto de vimentina.

Como puede observarse en la (Figura 46, A), los fibroblastos de pacientes con HI, más motiles (y con forma de abanico o fan-shape), exhibían una red de largos y delgados filamentos de vimentina (VF) concentrados principalmente en el parte posterior celular y en la zona perinuclear. Algunos de ellos, bien definidos, se expandían hacia el frente de avance (lamella-lamellipodium), llegando un número de ellos a alcanzar la *lamella* acabando en forma de garabato poco definido (*squiggles*). Por el contrario, los fibroblastos derivados de pacientes control, no-FHIs, menos motiles, mostraron una red densa y compleja de VF gruesos alrededor del núcleo, expandiéndose radialmente, y disminuyendo su densidad en la zona pericelular, pero que con extremos finales bien definidos. Por lo tanto, se observaba que la red de la VF parecía menos ensamblada o estructurada en los FHIs, sugiriendo muy posiblemente una menor capacidad para soportar esfuerzos externos.

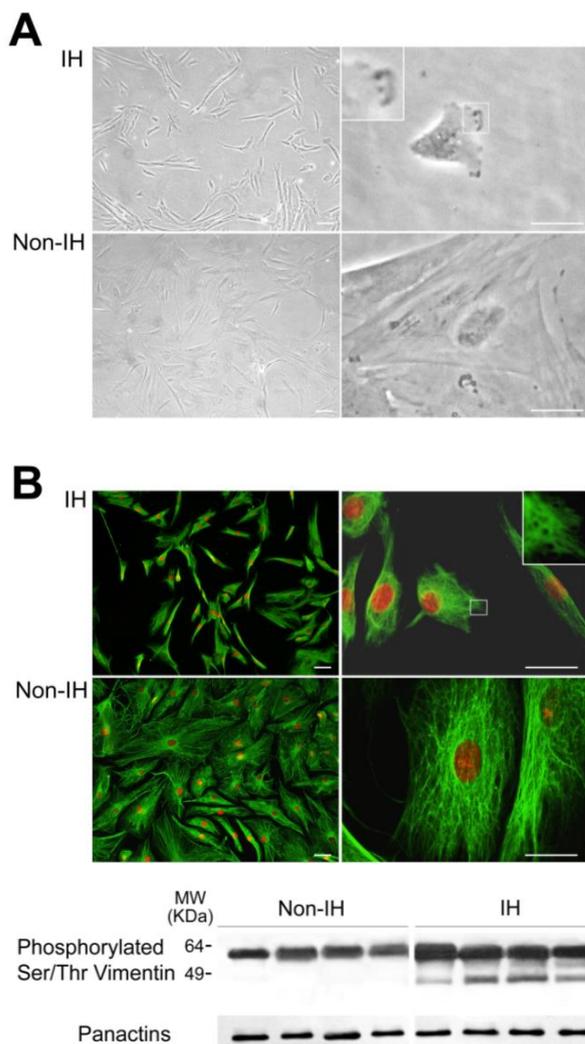


Figura 46. Análisis del citoesqueleto de vimentina de los fibroblastos del TCI de músculo esquelético. (A) Imágenes de contraste de fases. Característica forma de abanico de un FHI en migración (derecha; 400x). Se puede observar el lamellipodium ondulante (ruffling) del frente de avance, con los filopodium (magnificación). (B) Inmunocitoquímica de vimentina (verde) y núcleos (rojo) marcados con yoduro de propidio, e inmunotransferencia de vimentina fosforilada (Ser/Thr) de cultivos representativos de no-FHIs y FHIs. En la inmunocitoquímica se puede observar la estructura más difusa y menos estructurada en los FHIs, que probablemente correlaciona con una mayor solubilidad y una fosforilación incrementada de vimentina (especialmente del fragmento ~48KDa). Las panactinas se utilizaron como control de carga. Magnificación: izquierda 100x, derecha 400x; barra de escala = 50 μ m.

Finalmente, y una vez observada la menor estructuración del citoesqueleto de vimentina en los IHFs, se analizó también el estado de fosforilación (Ser/Thr) de la vimentina mediante inmunoprecipitación seguida de inmunotransferencia de membranas, ya que como ya hemos descrito anteriormente para la fascia es un buen indicador de los mecanismos que regulan el ensamblaje y organización de los filamentos intermedios de vimentina (cambios en la solubilidad y en la fosforilación de la vimentina, regulan diferentes procesos relacionados con la motilidad, proliferación y la capacidad de resistir esfuerzos externos para la célula, (318; 319; 320; 321). Una vez más, y de forma remarcable, pudimos observar que los FHIs presentaban un incremento en la fosforilación de vimentina, especialmente del fragmento soluble de ~ 48 KDa (cultivos no confluentes) (Figura 46, B).

5.2.7 Los fibroblastos del TCI del músculo esquelético de pacientes con HI muestran mayor sensibilidad a estímulos apoptóticos

Un evento que se desarrolla durante la apoptosis es la fragmentación y la desestructuración del citoesqueleto de vimentina. Uno de los mecanismos que induce esta desestructuración es debida a la propia actividad proteolítica de las caspasas, pero también participa la fosforilación de la vimentina (por la activación de quinasas activadas por las propias caspasas). Este mecanismo actúa también en los microfilamentos de actina durante la apoptosis, provocando el redondeo típico de la célula apoptótica (207) (322). En nuestro caso, y además de los antecedentes ya descritos para los FHIs en la fascia, tanto la menor estructuración del citoesqueleto de vimentina, como la fosforilación incrementada de vimentina en los FHIs, podrían sugerir que también los FHIs serían más susceptibles a estímulos pro-apoptóticos. Por lo tanto, como paso siguiente, se evaluó la sensibilidad de los FHIs a estímulos pro-apoptóticos, analizando el comportamiento del citoesqueleto de vimentina y su fosforilación, y la activación de la actividad caspasa 3. También aquí, la apoptosis fue inducida mediante la combinación pro-apoptótica de TNF α /CHX.

Como puede observarse en la Figura 46., y del mismo modo que en los FHIs de fascia, el TNF α /CHX indujo de forma más efectiva la apoptosis en los FHIs, los cuales presentaron un porcentaje más elevado de células apoptóticas tempranas y tardías en el ensayo de unión a anexina (Vybrant Apoptosis Assay kit II) (Figura 47) Morfológicamente, los FHIs presentaban un redondeo celular, parecían perder la adhesión al sustrato (refringencia en el microscopio), con vesículas desprendiéndose y con abultaciones citoplasmáticas (blebbing). En algunas células se observaron también núcleos lobulados en proceso de fragmentación (Figura 47, A). La inmunocitoquímica de los filamentos de vimentina de los FHIs sometidos al estímulo pro-apoptótico, mostró un marcaje difuso en el que era difícil diferenciar los VF de forma discreta. De hecho, el marcaje propiamente dicho era mucho más intenso, sugiriendo que, posiblemente, la fragmentación de la vimentina en el proceso apoptótico ofrecía al anticuerpo primario anti-vimentina un acceso más fácil a los diferentes epítetos, incrementándose la señal inmunofluorescente (Figura 47, B).

También se analizó la fragmentación de la vimentina y de otros sustratos de las vías apoptóticas, con inmunotransferencias de membrana de lisados de células (realizado con muestras fraccionadas al nivel subcelular mediante la utilización del *kit ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction*), obtenidos en el mismo experimento de inducción de apoptosis en donde se analizó esta mediante el ensayo de anexina. De forma similar a lo descrito en la fascia, en los derivados del TCI del músculo esquelético, se encontró la caspasa-3 activada. También, ciertos sustratos de citoesqueleto, diana de su actividad, presentaron una fragmentación incrementada: la α -fodrina, vimentina, y el *PARP* (Figura 48). Tanto la activación de caspasa, como la fragmentación de sustratos, mostró un patrón similar al descrito para el tejido muscular, sugiriendo, al igual que en la fascia, que los procesos apoptóticos también se podrían producir *in vivo*.

Respecto a la fosforilación de la vimentina después de inducir la apoptosis con el tratamiento de $\text{TNF}\alpha$ /CHX, en ambos grupos se observó un incremento de la vimentina fosforilada siendo más evidente en los FHIs. Esto sugiere también que la inducción de apoptosis puede afectar al estado fosforilativo de la vimentina, facilitando su desmantelamiento, especialmente en la HI (Figura 47, C). El aparentemente menos estructurado citoesqueleto de vimentina, y su mayor susceptibilidad a ser fragmentado y fosforilado después de un estímulo pro-apoptótico, apuntaría a un fenotipo patológico *in vivo*.

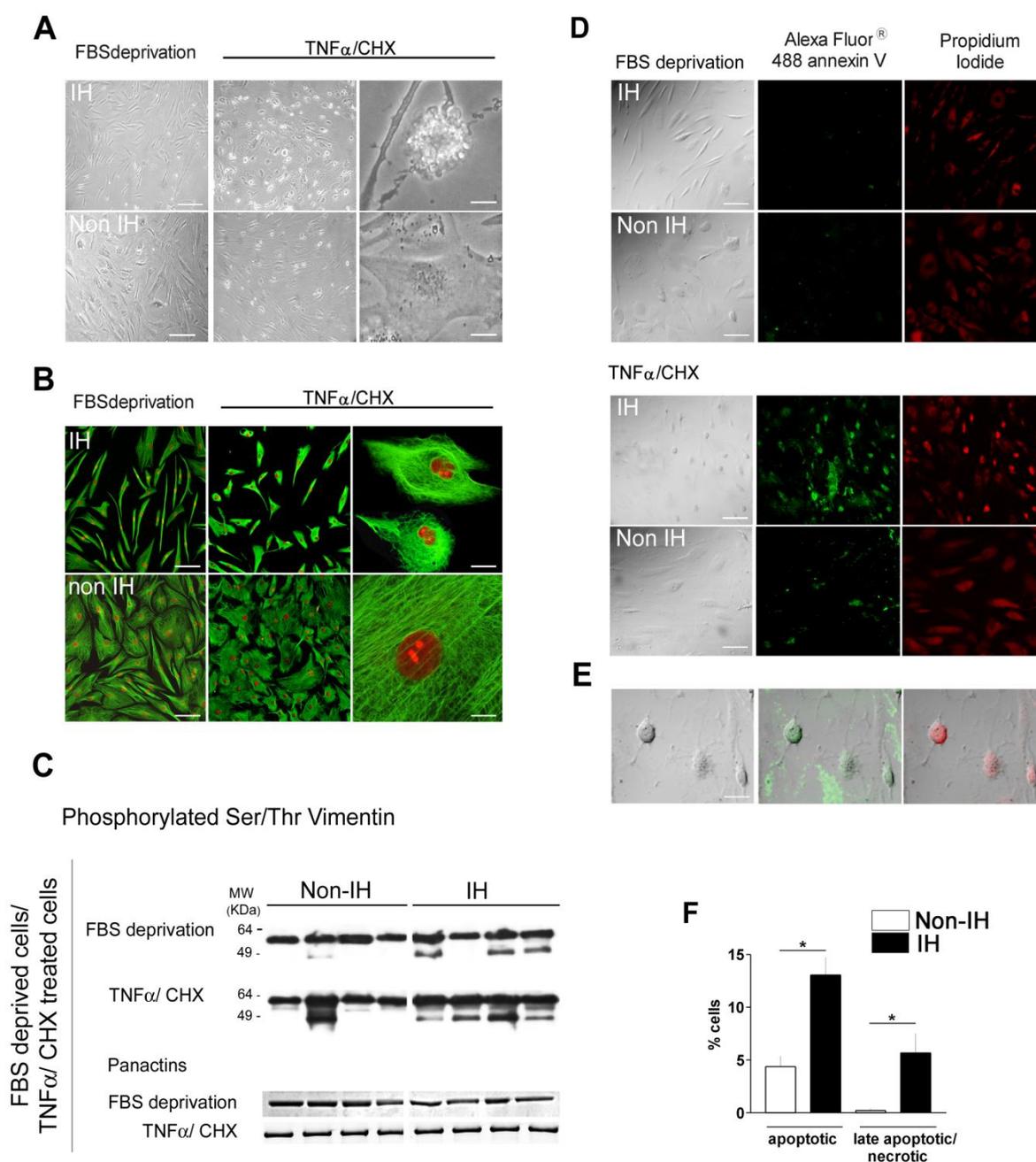


Figura 47. Susceptibilidad de los fibroblastos a estímulos pro-apoptóticos (tratamiento TNF_{α} -a/CHX, 72 h). (A) Imágenes representativas de contraste de fases. Característico blebbing de los FHIs apoptóticos (derecha) (izquierda y centro, 100x; derecha 600x). (B) Inmunocitoquímica de vimentina. Se puede observar como los fibroblastos control no-FHIs soportan mejor la inducción apoptótica, manteniendo la red de VF más íntegra, mientras que la red de VF parece estar desintegrándose en los FHIs, observándose núcleos lobulados (derecha) (izquierda y centro, 100x; derecha 600x). Esta aparente solubilización o fragmentación se relaciona con un aumento de la fosforilación de la vimentina, sobre todo en los FHIs (C). (D-F) Respuesta apoptótica de los no-FHIs ($n = 5$) y FHIs ($n = 5$) analizada mediante el Vybrant Apoptosis Assay kit II. Células de color verde apoptóticas (tempranas o tardías), células apoptóticas tardías con citoplasma rojo intenso, y células necróticas con núcleo de color rojo intenso (100x). (E) Imágenes solapadas de campo claro y el marcaje con el Vybrant Apoptosis Assay kit II (400x). (F) Porcentaje de células apoptóticas (* $P < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney). Barra de escala: 100 μm (100x); 50 μm (600x).

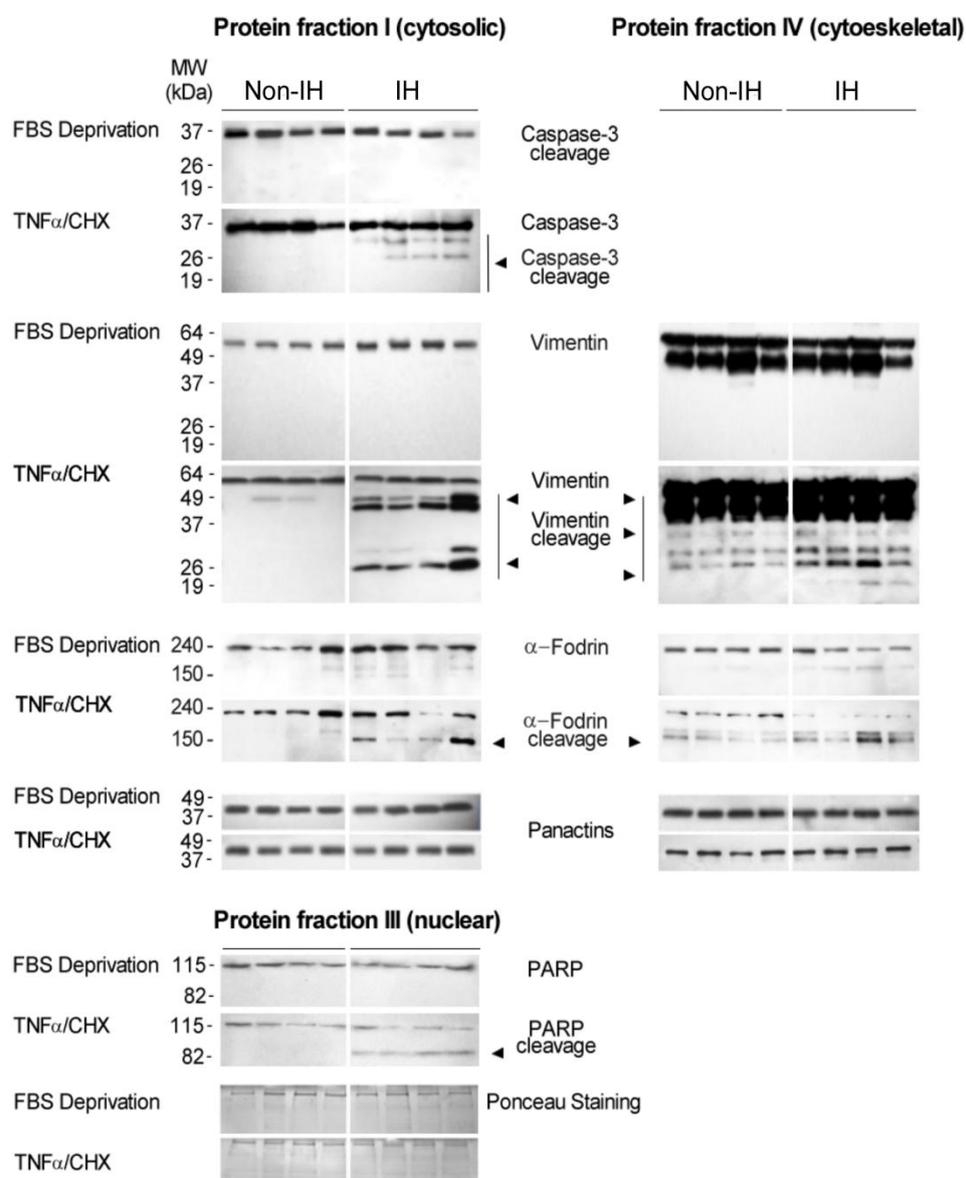


Figura 48. Inmunotransferencia de membranas de proteínas involucradas en la apoptosis. Inmunotransferencias representativas de análisis obtenidos a partir de fracciones citosólicas, nucleares, y de citoesqueleto de pacientes control, y pacientes con HI, después del tratamiento con TNF α /CHX. El inmunoblot de las pan-actinas (fracciones citosólica y citoesquelética) y la tinción de Ponceau de la membrana de transferencia de la inmunotransferencia (fracción nuclear) se utilizaron como control de carga.

5.3 Modulación del fenotipo de fibroblastos del TCI del músculo esquelético mediante la rigidez del sustrato

Recientemente diferentes trabajos han alertado sobre la importancia de la influencia de las características mecánicas del sustrato para una correcta respuesta celular (mecano-transducción) (llama la atención, por ejemplo, que el cultivo de células en presencia de sustratos blandos (<50kPa) es capaz de promover por sí mismo cambios característicos de apoptosis, que incluyen, entre otros, la presencia de células redondeadas, condensación nuclear, pérdida de adhesiones focales y exposición de fosfatidilserina al exterior celular (188)

En esta línea, y como un paso más hacia una eventual aplicabilidad terapéutica, dados los resultados obtenidos tanto al nivel de la caracterización de los tejidos (en donde destaca una pérdida de estructura, acompañada de cambios cuali- y cuantitativos de diferentes componentes celulares y de la MEC, como por ejemplo cambios en el perfil de PGs, tanto en la fascia como en el músculo esquelético), como también de la caracterización *in vitro* de los fibroblastos primarios derivados de pacientes (en donde se observaron diferencias de fenotipo, con alteraciones relevantes al nivel de las adhesiones focales o de diferentes componentes del citoesqueleto, así como del comportamiento proliferativo, o de sensibilidad a la apoptosis entre otros), decidimos adentrarnos en las posibles implicaciones que los cambios en la rigidez del sustrato podrían ejercer sobre el comportamiento de los fibroblastos de pacientes con HI (estos cambios parecen plausibles por estas mismas características histológicas y por la desregulación proteolítica e inflamatoria descrita previamente, y que probablemente podrían alterar las propiedades mecánicas del tejido en la HI, en comparación con los tejidos control).

Utilizamos fibroblastos derivados del músculo esquelético de pacientes (con y sin hernia incisional) y sustratos comerciales (<http://www.excellness.com/>) de polidimetilsiloxano (PDMS), con propiedades viscoelásticas y de diferente rigidez (2, 5, 10, 30 y 100kPa de módulo de Young), comparándolos con superficies control (placas de cultivo convencionales y superficies de vidrio) en presencia o ausencia de fibronectina. Evaluamos diferentes parámetros relacionados con la proliferación y la presencia de apoptosis, así como diferentes componentes del citoesqueleto, adhesión celular, progresión de ciclo celular, mediante marcadores específicos y detección por inmunofluorescencia. Finalmente, se analizaron también cambios en los sobrenadantes de dichos cultivos (actividad degradativa metaloproteásica). Los resultados confirman diferencias entre ambos grupos (pacientes con y sin hernia), y refuerzan la hipótesis de una posible biología de la hernia.

5.3.1 La rigidez del sustrato modula el fenotipo de los fibroblastos del TCI

Las diferentes rigideces del sustrato y también la presencia o no de FN, afectó al comportamiento de los fibroblastos, observándose unos efectos más marcados especialmente en los FHIs.

En una primera etapa, y con el objetivo de preseleccionar alguna(s) rigidez(es) significativa(s) que nos permitiese reducir el número de experimentos, separamos el estudio según dos grandes grupos: a.- cultivo de fibroblastos en presencia de sustratos de PDMS recubiertos con fibronectina (PDMS-FN) con diferentes rigideces (2, 5, 30, 100 kPa), y b.- cultivo de fibroblastos en presencia de vidrio (glass; 1 GPa de rigidez teórica) con o sin la presencia de un recubrimiento de FN (glass FN vs. glass). De este modo podríamos observar el comportamiento de los fibroblastos en un rango de rigideces fisiológico, y por otro lado estudiar el efecto de la FN en un sustrato de referencia de uso habitual en cultivos celulares, como es el vidrio.

Los resultados se muestran en la (Figura 49). Como puede observarse, con el análisis de ANOVA de 2 factores de los sustratos de PDMS-FN (2-100 kPa) se apreció que el factor grupo ($F=24.8$, $P < 0.001$) y el factor rigidez del sustrato ($F=10.9$, $P < 0.001$) influía de forma significativa en: el área celular, en el área de las AFs (grupo: $F=33.7$, $P < 0.001$; rigidez: $F=9.5$, $P < 0.001$; interacción: $F=4.6$, $P < 0.001$), y en el porcentaje de área de AF por célula (grupo: $F=21.1$, $P < 0.001$; rigidez: $F=13.2$, $P < 0.001$, interacción: $F=8.8511$, $P < 0.01$). En relación al efecto de la FN en vidrio (Glass vs Glass-FN), el análisis de ANOVA de dos factores indicó que la interacción del grupo y de la presencia de FN influía significativamente en el área celular ($F=12.8$, $P < 0.001$). Este resultado es debido a que el área celular de los FHIs era mayor con FN y menor sin FN, a la inversa que en los no-FHIs. Los resultados del área celular coincidían con los obtenidos en cultivos en placas de poliestireno (libres de FN) utilizadas en los estudios 5.1 y 5.2, donde los no-FHIs tenían un área celular mayor. El área de las AF también se vio afectada por los dos factores (sustrato: $F=6.2$, $P < 0.01$; FN: $F=8.0$, $P < 0.01$), así como también el porcentaje de área de AF por célula (sustrato: $F=12.59$, $P < 0.001$; FN: $F=50.5$, $P < 0.001$), ambos casos sin interacción.

El resultado de las influencias del grupo (no-HI vs. HI) y del sustrato se traducían en un cambio de fenotipo en la morfología celular, de las características de las adhesiones focales (AF), y del citoesqueleto de actina y vimentina, conjuntamente. En los sustratos con FN (PDMS y Glass-FN, desde una rigidez de 2 kPa hasta de 1 GPa), los no-FHIs parecen transitar entre las diferentes rigideces con un fenotipo similar, entre fibrocito y fibroblasto, mientras que los FHIs sufrían cambios más extremos. Es decir, los fibroblastos de HI exhibían un fenotipo compatible con el típico apoptótico y de fibrocito, a baja rigidez (2-5 kPa), pasando a uno de fibroblasto a rigidez media (10 kPa) y a proto-miofibroblasto/miofibroblasto a rigidez alta y extrema (100 kPa- 1 GPa) (Figura 50, Figura 50). En ambos grupos el área celular se incrementaba con el aumento de la rigidez del sustrato, al igual que el área de las AFs (a baja rigidez se apreciaba un marcaje difuso). Solo cuando la rigidez era extrema (1 GPa; Glass-FN), se producía una disminución del área celular, y cuando se eliminaba la FN del sustrato se disminuía el porcentaje de área de AF en la célula. Todos estos cambios descritos eran más pronunciados en los fibroblastos de pacientes con HI.

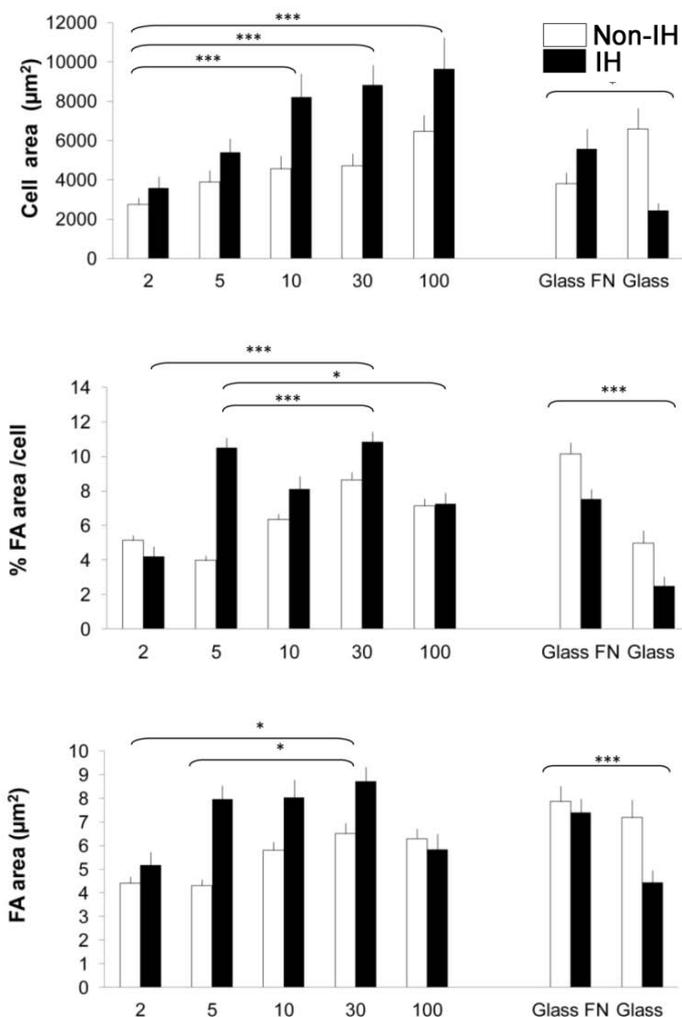


Figura 49. Análisis de ANOVA de dos factores del área celular y de las adhesiones focales medidas (media ±ESM) en sustratos de PDMS-FN y cristal en presencia o no de FN (Glass-FN y Glass). El análisis se hizo separadamente para los sustratos PDMS-FN, y vidrio. Los resultados detallados del análisis se encuentran en el texto. Se analizaron entre 20-35 células por cada sustrato, de una línea celular por grupo; *P < 0.05, ***P < 0.001, ANOVA seguida del contraste post-hoc de Tukey.

Respecto al citoesqueleto de vimentina y actina, los cambios se encontraban igualmente relacionados con el aumento de rigidez del sustrato, afectando también más intensamente a los fibroblastos de HI. Así pues, a rigidez baja, los FHIs presentaban una forma más redondeada y con un citoesqueleto de vimentina difuso, mientras que a medida que aumentaba la rigidez se transformaban en una forma estrellada-dendrítica (típica de fibroblasto), acabando en una forma estrellada-estirada y con un citoesqueleto de filamentos de vimentina bien definido y estructurado, recordando a los miofibroblastos (Figura 50, Figura 51). Del mismo modo, el análisis preliminar descriptivo de la red de microfilamentos de actina (Tabla 9) sugirió que a rigidez baja los FHIs tenían apariencia de células apoptóticas (con microfilamentos periféricos poco definidos, y células en situación de pérdida de adherencia con el sustrato; *peripheral actin bundling and retracting shrinking cell*), mientras que a medida que se incrementaba la rigidez se incrementaban también el número de fibras de estrés y geodomas. Un efecto a destacar de la rigidez del sustrato, es que a rigideces >10kPa disminuían drásticamente los FHIs polarizados, mientras que esta característica se mantenía relativamente constante en el resto de rigideces del sustrato PDMS-FN.

Tabla 9. Arquitectura de los microfilamentos de actina de los fibroblastos. Porcentaje de la característica indicada.

Sustrato rigidez (kPa)	Geodomas	Fibras de estrés	Polarizadas	Sin fibras	Microfilamentos periféricos o pérdida de adherencia
HI					
2	13.5	35.1	43.2	48.6	29.7
5	15.0	70.0	22.5	25.0	0.0
10	22.6	64.5	32.3	35.5	0.0
30	51.6	96.8	9.7	3.2	0.0
100	42.9	90.5	9.5	4.8	0.0
Glass + FN	58.3	89.7	13.8	10.7	0.0
Glass	1.1	40.7	48.1	59.3	0.0
no-HI					
2	10.8	62.2	48.6	21.6	8.1
5	8.1	59.5	70.3	40.5	0.0
10	10.8	70.3	40.5	27.0	0.0
30	13.9	69.4	27.8	22.2	0.0
100	17.2	86.2	34.5	6.9	0.0
Glass + FN	39.3	89.3	21.4	10.3	0.0
Glass	55.2	93.1	10.3	6.9	0.0

Tabla descriptiva de la estructura de la red de microfilamentos de actina. Resaltadas las condiciones que se seleccionaron para el análisis de apoptosis a baja rigidez con PDMS-FN (2-5 kPa) y a extrema con Glass vs. Glass FN. Se analizaron entre 20-35 células de cada sustrato, de una línea celular por grupo.

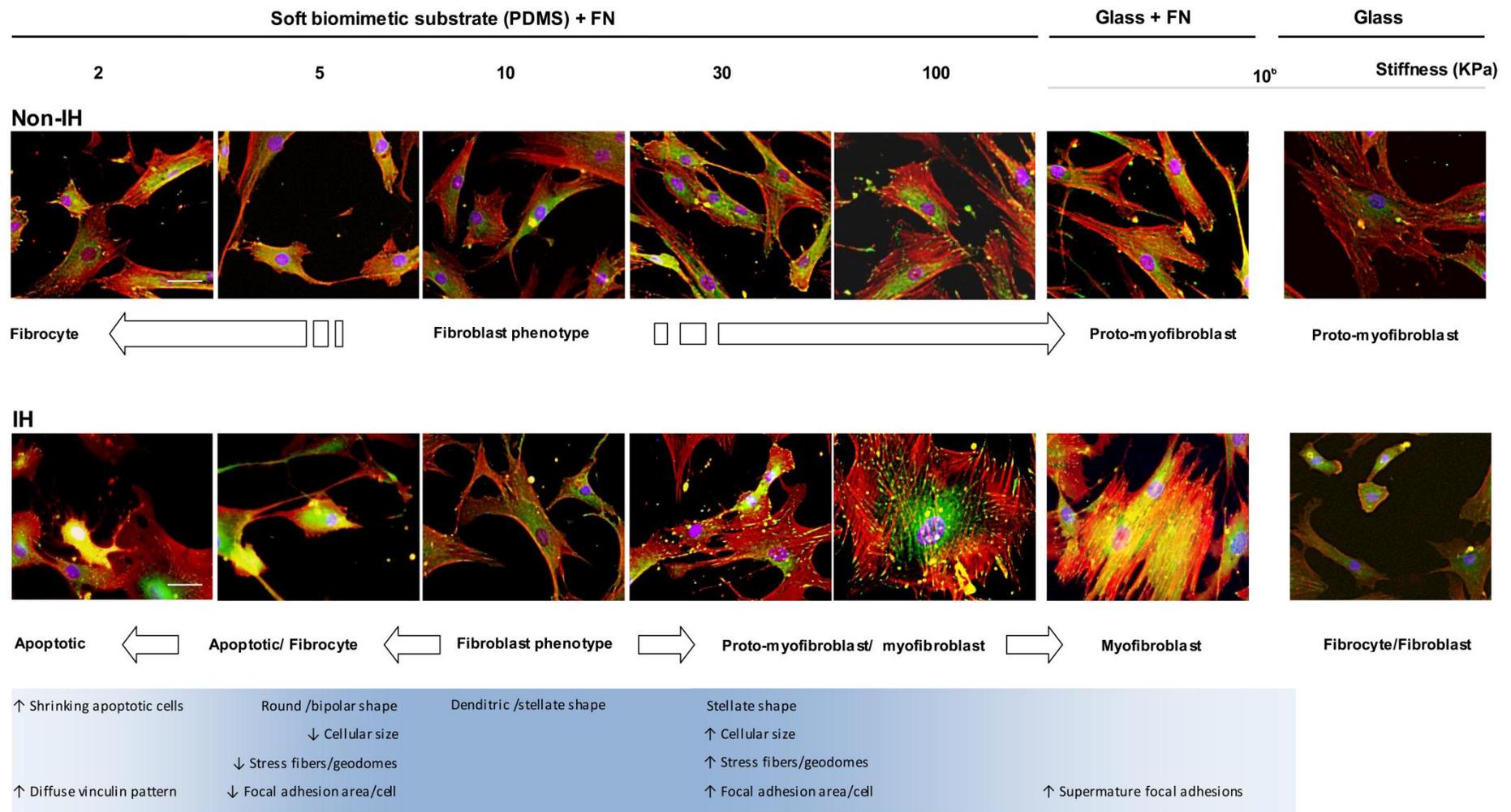


Figura 50. Análisis de las adhesiones focales y del citoesqueleto de actina de los fibroblastos del TCI a diferente rigidez en sustratos de PDMS-FN, Glass-FN, y Glass. Inmunofluorescencias representativas de no-FHIs y FHIs primarios del TCI: actina (rojo, faloidina), vinculina (verde), y núcleo (azul, DAPI). Se puede apreciar el cambio de la morfología, las adhesiones focales y el citoesqueleto de microfilamentos de actina a diferente rigidez. Se observa que los FHIs presentan un fenotipo apoptótico a baja rigidez (2-5 kPa) y un fenotipo similar a los miofibroblastos a alta-extrema rigidez (1 GPa). De forma notable a la rigidez de 10 kPa los dos grupos parecen exhibir un fenotipo similar; rigidez teórica del músculo. También se hace patente que en el sustrato Glass (sin FN) el nº de adhesiones focales disminuye y que el tamaño del área celular se invierte en los dos grupos respecto al sustrato Glass FN. En las indicaciones inferiores se sugiere el posible cambio de fenotipo de los FHIs. Magnificación: 400x, barra de escala= 25 µm.

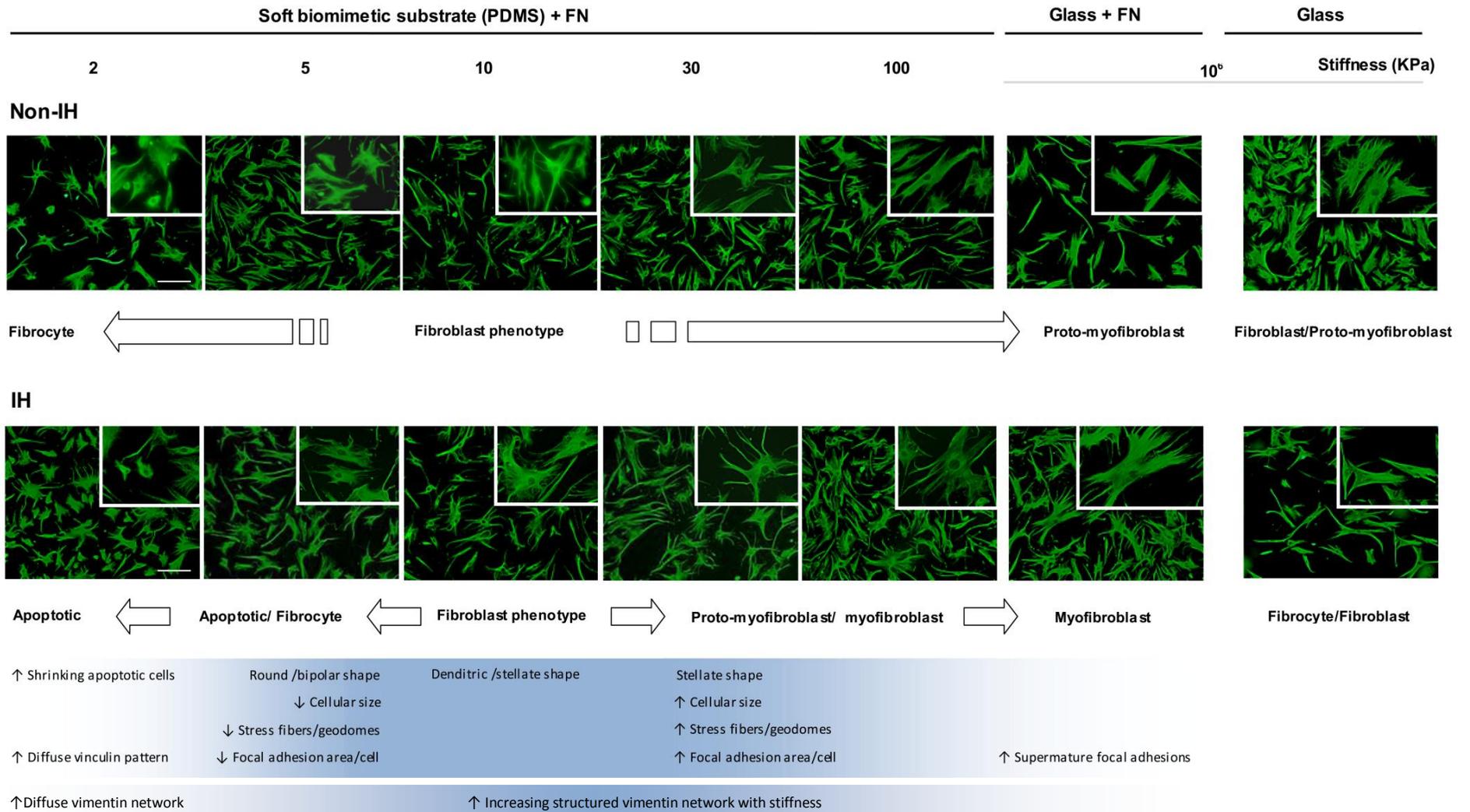


Figura 51. Análisis del citoesqueleto de vimentina de los fibroblastos del TCI a diferente rigidez en sustratos de PDMS-FN, Glass-FN, y Glass. Inmunofluorescencia representativas de no-FHIs y FHIs primarios del TCI en donde se puede apreciar el cambio de la morfología, tamaño y del citoesqueleto de vimentina que definen el fenotipo del fibroblasto a diferente rigidez. En las indicaciones inferiores se sugiere el posible cambio de fenotipo de los FHIs. Se puede observar que el fenotipo de los no-FHIs no presenta tantas variaciones como los FHIs. Magnificación: 100x, barra de escala= 100 μ m.

5.3.2 La proliferación de los IHFs del TCI es menos sensible a los cambios en la rigidez del sustrato

Destacan también cambios en los valores de proliferación celular. Así pues, en general, el aumento de rigidez del sustrato tendió a incrementar la proliferación celular, aunque a valores altos (100 kPa) se producía un cierto decremento o estabilización. Es importante destacar, que el efecto de la rigidez influía más en los fibroblastos control no-FHIs que en los derivados de pacientes con HI, al contrario de lo observado hasta ahora en las características anteriores.

El índice de proliferación (% de núcleos marcados con EdU/núcleos totales) fue más elevado en los fibroblastos control (no-FHIs) para todas las rigideces (tanto en PDMS-FN como en Glass-FN), excepto a 10 kPa donde ambos fueron iguales (repetido y verificado). De forma sorprendente, la falta de recubrimiento con fibronectina del vidrio revertía esta relación. En este caso, los índices de proliferación eran superiores en los fibroblastos de HI, lo que coincide también con lo que hasta ahora habíamos podido observar en los análisis de proliferación efectuados en fibroblastos de fascia y de músculo esquelético utilizando placas de poliestireno, y que acabamos de describir en los estudios 5.1 y 5.2 de esta memoria. Por último, a baja rigidez (2 kPa) la proliferación de fibroblastos de HI disminuía de manera drástica, mientras que los fibroblastos control, no-FHIs, mantenían valores similares a los obtenidos cuando eran cultivados a 30 kPa (Figura 52).

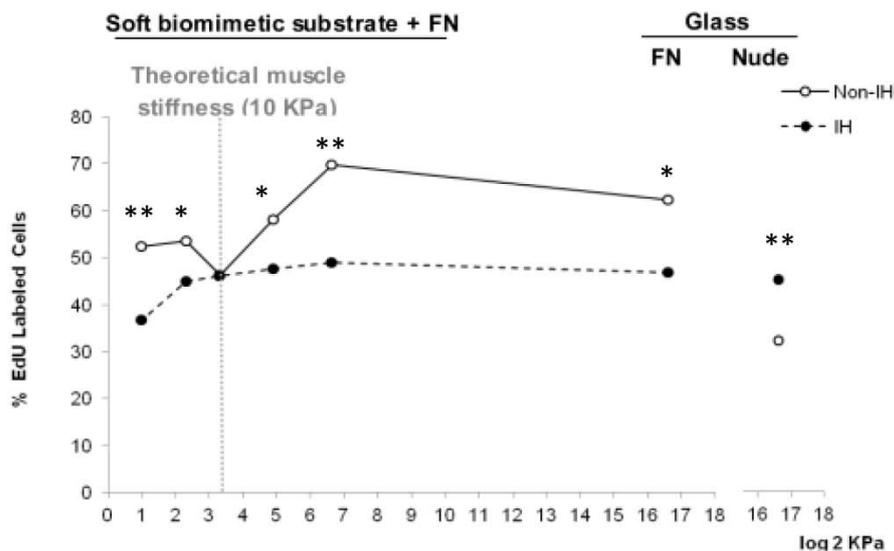


Figura 52. Ensayo de proliferación de los fibroblastos del TCI de músculo esquelético mediante la incorporación de EdU (% núcleos positivos). La escala de la rigidez se ha transformado a log2 con la finalidad de comprimir el eje de la variable. En orden creciente, las rigideces en el log 2 corresponden a 2, 5, 10, 30, 100 kPa (PDMS-FN,) y en el Glass FN (o Glass nude) a 1 GPa. Prueba U de Mann-Whitney entre los 2 grupos para cada rigidez en particular. Los resultados corresponden a 4 réplicas biológicas de una línea celular por grupo; *P < 0.05, **P < 0.01.

5.3.3 Los FHIs son más susceptibles a la apoptosis en presencia de sustratos de baja rigidez (2 kPa)

Los resultados obtenidos en los análisis preliminares sugirieron que la rigidez de 10 kPa era la que permitía establecer un punto común para el fenotipo de ambos grupos de fibroblastos, coincidiendo con las características fenotípicas (morfológicas) propias del fibroblasto. De forma remarcable, este punto coincide con la rigidez teórica del músculo (10 kPa) (323). Alejándonos de este punto común los fibroblastos de HI sufren cambios en su fenotipo más acentuados que los del grupo control. A niveles inferiores de rigidez, los cambios observados podrían interpretarse como de tipo pro-apoptóticos o apoptóticos, en coincidencia con los resultados que hemos descrito anteriormente. Es decir: citoesqueleto de vimentina difuso; pérdida de adhesiones focales y de estructuración de microfilamentos de actina; disminución del área celular, redondeo celular y pérdida de prolongaciones citoplasmáticas.

Teniendo en cuenta estos resultados, finalmente, decidimos realizar un análisis de apoptosis a baja rigidez (2 y 5 kPa), comparándolos con los valores observados en vidrio con y sin fibronectina. De forma significativa, los fibroblastos de HI presentaron signos de apoptosis y necrosis celular muy superior a los fibroblastos control a rigidez baja (2 kPa PDMS-FN). Este resultado podría correlacionar perfectamente con las características de morfología celular, AFs, y red de microfilamentos de actina presentes a 2 kPa, así como también la disminución observada en los valores de proliferación celular (medida como incorporación de EdU). Se observó también una tendencia a que el sustrato de vidrio recubierto con fibronectina, inducía con más frecuencia fenómenos apoptóticos-necróticos que el vidrio en los fibroblastos de HI, aunque siempre muy por debajo de los inducidos a baja rigidez (2kPa). Esta tendencia también coincidía con una cierta disminución de la proliferación, desde los valores máximos. Esto podría indicar que ambos extremos de la rigidez parecen inducir la disminución de la proliferación y favorecer la inducción de la apoptosis, respecto a una rigidez óptima intermedia, al menos donde el sustrato contiene FN (Figura 53).

Por último, el análisis particular del área celular y de las AFs indicó que no existían diferencias en el área de las AF, ni en el porcentaje de área de AF/célula a 2 kPa, entre los dos grupos. En cambio a 5 kPa el área de las AFs y el porcentaje de área de AF/célula fueron superiores en los fibroblastos de HI. Esto podría sugerir que la rigidez crítica para los fibroblastos de HI se sitúa <5 kPa y que detrás del tamaño del área celular y de las características de las AFs (su incremento en magnitud favorecen la supervivencia), se esconde algún mecanismo que hace que los FHIs sean más susceptibles a la apoptosis a 2 kPa. En el caso del sustrato de vidrio recubierto con fibronectina solo existían diferencias significativas en el porcentaje de área de AF/célula, siendo superior en los fibroblastos control. Por último en el sustrato vidrio, se repetían los resultados observados en los cultivos en placas de poliestireno en los que tanto el área celular, el área de las AF, y el porcentaje de área de AF/ célula era superior en los fibroblastos control (Figura 54).

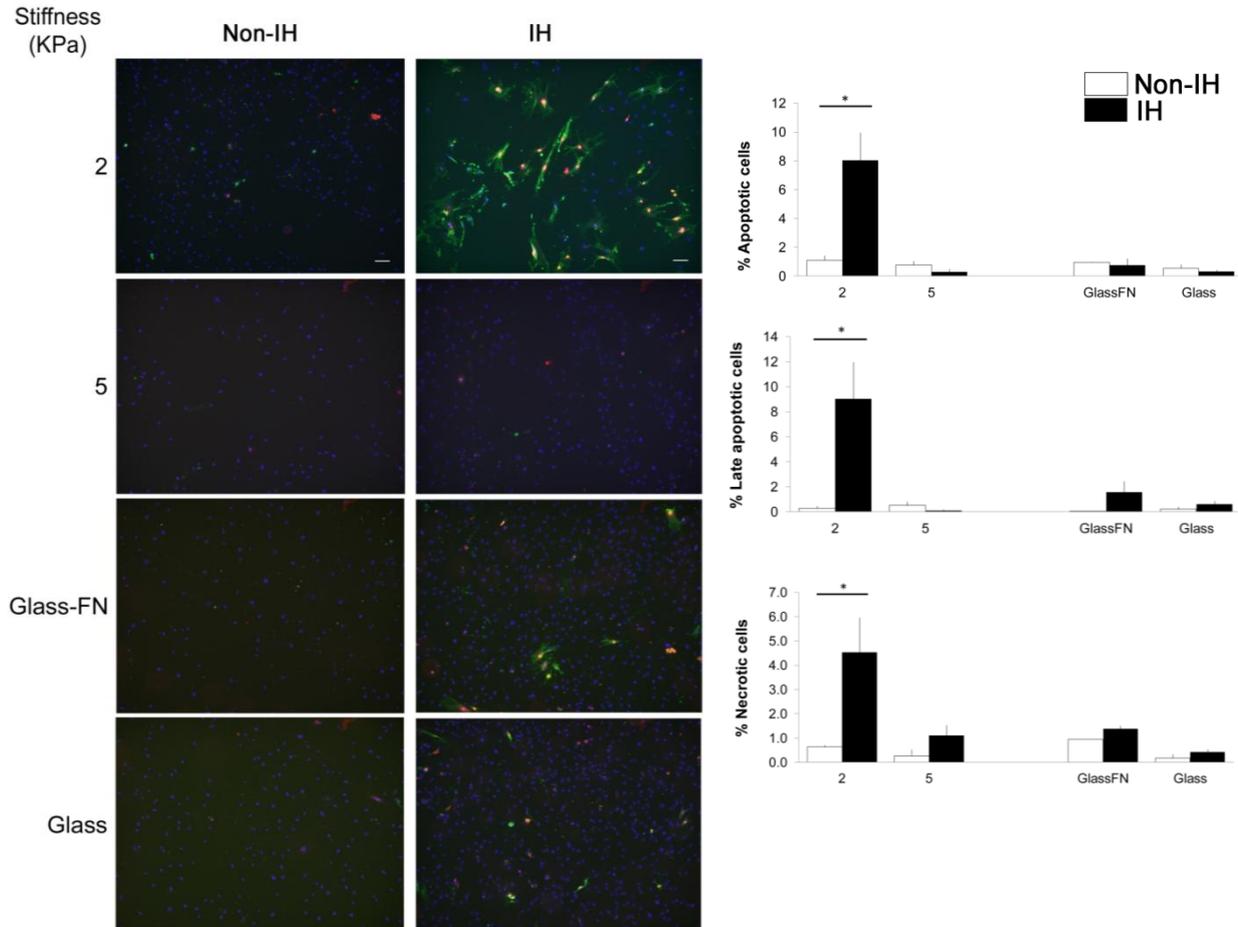


Figura 53. Valoración de la apoptosis en los fibroblastos del TCI de músculo esquelético cultivados en sustratos de PDMS de rigidez de 2 y 5 kPa (PDMS-FN), y en cristal en presencia o no de fibronectina (Glass-FN y Glass) mediante la utilización del kit Promokine apoptotic/necrotic/healthy cells detection kit. Panel izquierdo: se puede observar como los FHIs son más sensibles de forma significativa a la inducción apoptótica por el sólo hecho de entrar en contacto con sustratos de baja rigidez. Células de color verde apoptóticas (tempranas o tardías), células apoptóticas tardías con citoplasma rojo intenso, y células necróticas con núcleo de color rojo intenso. Panel derecha. Análisis estadístico de las células apoptóticas y necróticas. Análisis de 4 réplicas biológicas de una línea celular por grupo; *P < 0.05, Prueba U de Mann-Whitney. Magnificación: 100x, barra de escala= 100 μ m.

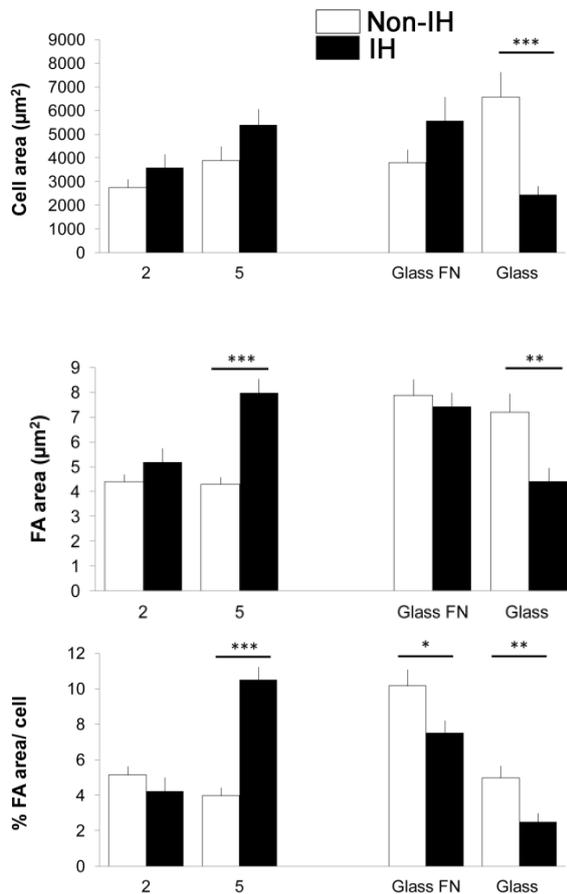


Figura 54. Análisis estadístico del área celular y de las AFs de los fibroblastos de TCI en los sustratos de PDMS de rigidez variable (2-5 kPa), y cristal con y sin fibronectina (glass-FN y glass). Se analizaron entre 20-35 células de cada sustrato, de una línea celular por grupo; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba t de Student.

Respecto a la red de microfilamentos de actina los efectos más acusados de la baja rigidez se observaron en los FHIs. El cambio de rigidez de 5 a 2 kPa alteró la complejidad de la arquitectura de la red de microfilamentos de actina, la cual disminuyó más dramáticamente en los FHIs. Es decir, disminuyeron las fibras de estrés, aumentó el número de células que no tenían ningún tipo de microfilamento y también, remarcablemente, las que presentaban actina periférica poco polimerizada, una característica propia de las células apoptóticas. En el caso de los sustratos de máxima rigidez, los fibroblastos control en presencia de vidrio presentaban una arquitectura significativamente más compleja (geodomas, fibras de estrés), con menos células polarizadas (tal como en las placas de poliestireno), y en presencia de vidrio recubierto con fibronectina, los FHIs presentaban incrementados los geodomas con respecto a los no-FHIs (Figura 55).

Resultados

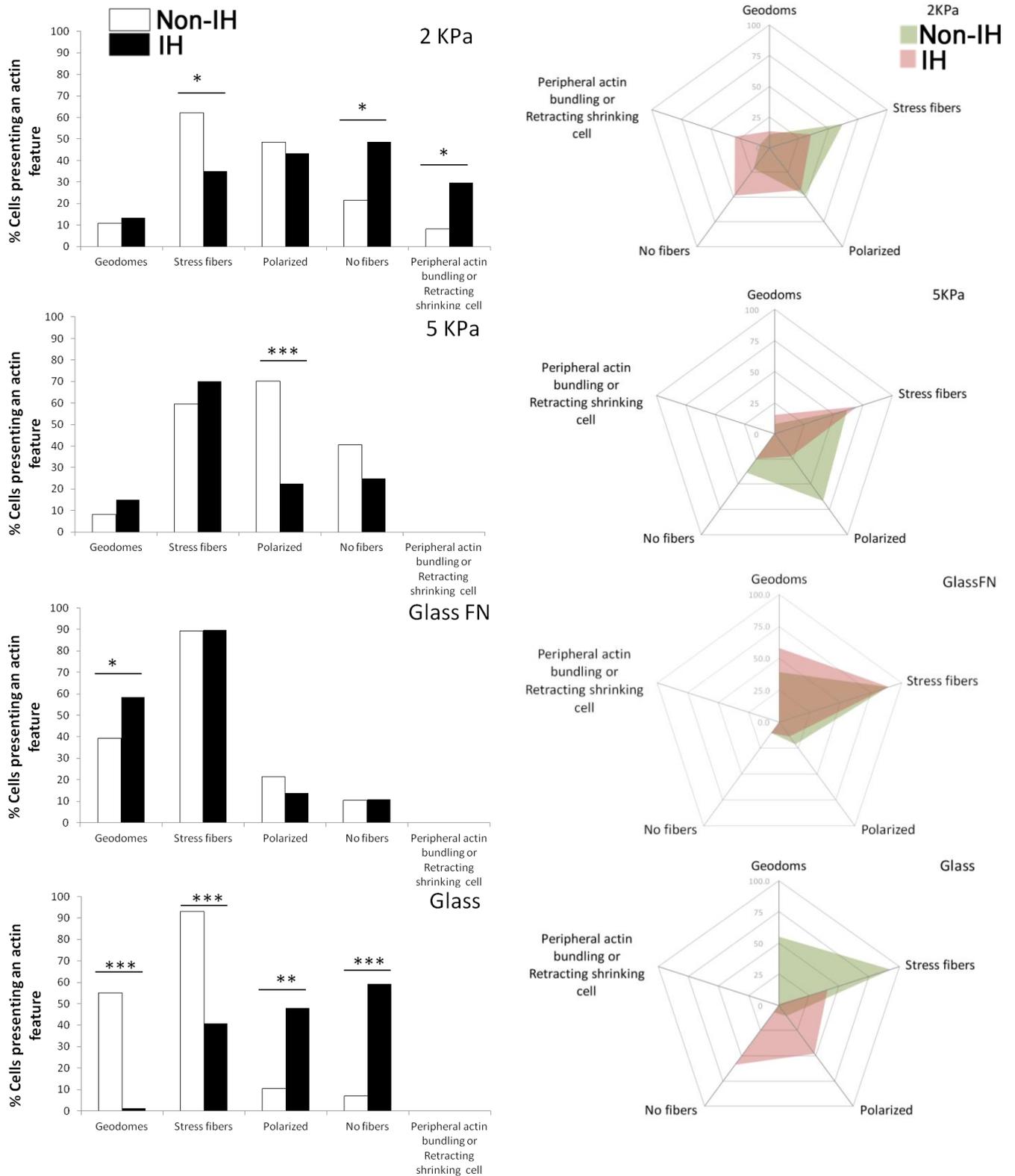


Figura 55. Panel derecho. Análisis estadístico de las características de la arquitectura de los microfilamentos de actina de los fibroblastos de TCI de músculo esquelético en presencia de sustratos de PDMS-FN de rigidez 2-5 kPa, y vidrio (Glass-FN y Glass). Se analizaron entre 20-35 células de cada sustrato, de una línea celular por grupo; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba exacta de Fisher. Panel izquierdo. Diagrama de radar de las características analizadas del citoesqueleto de actina. Destacan especialmente las diferencias observadas a 2 kPa PDMS-FN y en vidrio entre los fibroblastos control y los de HI.

5.3.4 Los medios condicionados de los FHIs presentan una actividad MMP 2, -9 diferencial respecto a los no-FHIs

Previamente en nuestro grupo se indicó un incremento de la relación MMPs/TIMPs en el tejido conectivo de la HI (28). Además los resultados obtenidos en los estudios 5.1 y 5.2 de este trabajo sugerían una desestructuración del tejido en la que podía participar la actividad MMP, con una posible pérdida de consistencia y rigidez. Observando estos resultados, y asumiendo que la actividad MMP en la fascia (y el TCI) proviene en su gran mayoría del fibroblasto, decidimos analizar la actividad gelatinasa encontrada en los medios condicionados por los fibroblastos de HI y control cultivados a diferentes rigideces de sustrato.

Como puede observarse en la (Figura 56), y por lo que hace referencia a la actividad MMP9, sorprendentemente, la media de la actividad observada en los medios condicionados por fibroblastos de HI siempre se mantuvo por encima de la media de los fibroblastos control, para todas las condiciones de sustrato. Así el análisis de ANOVA de dos factores indicó que estaba influenciada fuertemente por el factor grupo ($F=49.7$, $P < 0.001$), y aunque en menor medida también por la rigidez ($F=4.9$, $P < 0.01$), con interacción entre ambos ($F=3.9$, $P < 0.05$). El aumento de la rigidez dentro del grupo de los fibroblastos de HI, provocaba un aumento considerable de la actividad MMP9, que por el contrario no se apreciaba en los fibroblastos control.

En cuanto a la media de la actividad MMP2 de los medios condicionados fue similar en ambos grupos a excepción de los medios procedentes de FHIs cultivados en sustratos de bajas rigideces, en cuyo caso los valores fueron inferiores. El análisis de ANOVA de dos factores indicó que el factor de rigidez ($F=29.03$, $P < 0.0001$) tenía influencia en la actividad MMP2. Un hecho a destacar, es que la presencia de FN en el sustrato de vidrio (Glass-FN) incrementaba fuertemente la actividad MMP2, en ambos grupos de forma similar.

En conjunto, estos resultados sugieren que los mecanismos que rigen la actividad MMP- 2 y -9 a través de la rigidez del sustrato son característicos y específicos de cada grupo.

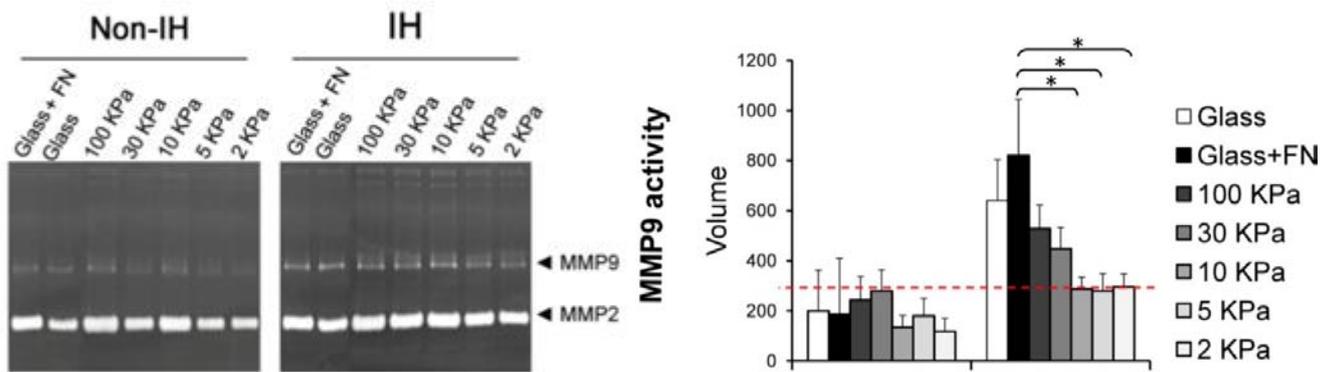
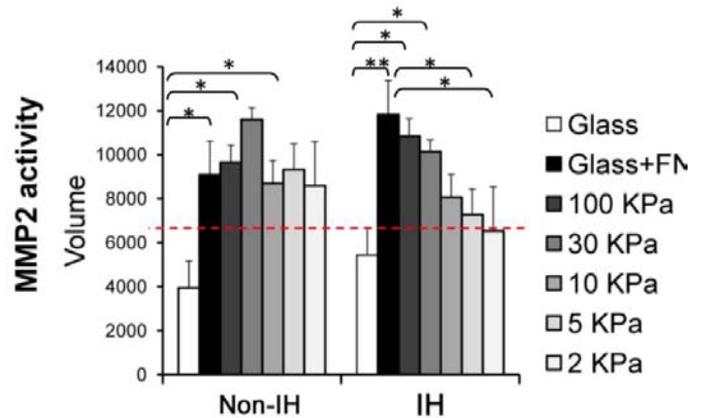


Figura 56. Análisis de ANOVA de dos factores de la actividad MMP2 y MMP9 de los medios condicionados por el cultivo de fibroblastos del TCI del músculo esquelético de pacientes con HI y control. Panel izquierdo. Zimografía representativa de la actividad gelatinasa a diferentes rigidices de sustrato. Panel derecho. Análisis estadístico de ANOVA de un factor después de realizar uno previo de ANOVA de dos factores, y comprobar que factor era el más influyente. MMP9: ANOVA de un factor (variable grupo: no-HI: $F=1.9$ ns; HI: $F=4.6$, $P<0.01$); MMP2: ANOVA de un factor de la rigidez (no-HI: $F=4.8$, $P<0.01$; HI: $F=6.9$, $P<0.01$). Las significancias indicadas son resultado del contraste post-hoc de Tukey. Análisis de 4 réplicas biológicas de cada grupo; ns: no significativo; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



6 Discusión

A pesar de que el distintivo patognomónico de la hernia incisional es la degeneración insidiosa miofascial con la eventual ruptura del tejido, la hipótesis de que una causa biológica puede subyacer al problema (9) apenas ha sido explorada en muestras de pacientes humanos, con lo que la etiología última y sus vías de señalización permanecen desconocidas. Esta falta relativa de conocimiento sorprende, pero se explica, al menos en parte, por la disponibilidad extendida de materiales protésicos para su tratamiento, lo que ha generado la creencia en la comunidad quirúrgica de que ya no era necesario profundizar en los mecanismos fundamentales de la enfermedad (los biopolímeros produjeron una auténtica revolución en la reparación de la hernia, reduciendo drásticamente sus recidivas y permitiendo la reconstrucción de grandes defectos ventrales antes eran irreparables, (3)) El reclutamiento de pacientes para los posibles estudios ha podido ser también un hándicap ya que al tratarse de una patología multifactorial es muy difícil definir adecuadamente los criterios específicos de inclusión y de exclusión, tanto de los propios pacientes afectados como también y especialmente de los de un grupo considerado como control o de referencia, dada la facilidad con la que se presentan comorbilidades diversas (i.e, patología inflamatoria, genética, metabólica) que ya *per se* podrían afectar al tejido conectivo de la pared abdominal (28). Finalmente, incluso con un reclutamiento idóneo y cuidadoso de los pacientes, muchos de los estudios disponibles abarcan solo el primer año de seguimiento después de la laparotomía, mientras que los datos clínicos actuales confirman que la incidencia de la HI crece ~ un 60% entre el 1er y el 3er año después de la intervención (324), lo que implicaría la necesidad de desarrollar más estudios longitudinales, a su vez complicados de planificar y de llevar a cabo.

Teniendo en mente una potencial “biología de la hernia” (9), aquí hemos intentado identificar (nuevas) claves celulares y moleculares con un papel potencial en la patogénesis de la HI, que en un futuro pudieran ser útiles para nuevos enfoques preventivos y terapéuticos. Para ello hemos evaluado simultáneamente muestras de tejido y muestras de cultivos primarios de fibroblastos derivados todos de biopsias peroperatorias de fascia y de músculo esquelético abdominales de pacientes con HI y pacientes control, adecuadamente apareados para los valores de edad, sexo y principales comorbilidades. Este tipo de enfoque integral, que engloba simultáneamente el análisis tisular y celular en los dos tejidos principales de la pared del abdomen, es totalmente nuevo en la literatura de la HI.

Nuestros resultados confirman que, efectivamente, ambos tejidos se encuentran alterados y que (probablemente) se influyen mutuamente, coparticipando en la progresión y tal vez en el mismo inicio del trastorno miofascial descrito para la enfermedad. Destaca que tanto en la fascia como en el músculo esquelético de la HI se observaron alteraciones estructurales y morfológicas, sutiles pero trascendentes, y también cambios cualitativos y cuantitativos en diversos parámetros de la MEC (como por ejemplo en los perfiles de expresión del núcleo proteico de varios proteoglicanos analizados por reacción de RT-PCR, y también al nivel de proteína para versicano en el músculo esquelético). En su conjunto, los datos sugieren un estado más de tipo degenerativo en la fascia, sin presencia de infiltrados inflamatorios, y uno de tipo

degenerativo/regenerativo en el músculo esquelético, con presencia de un leve infiltrado inflamatorio y otras alteraciones compatibles con un estado de inflamación crónica de baja intensidad. Destaca especialmente la presencia en ambos tejidos de indicios de activación de mecanismos de muerte celular por apoptosis y autofagia (ésta analizada solo en las muestras de fascia) hasta ahora desconocidos. También, al nivel del músculo se observaron cambios en la tipificación muscular y en la expresión de varias isoformas de las cadenas pesadas de la miosina (MyHC) que podrían afectar a las propiedades del músculo y, en definitiva a la propia patología, y que tampoco habían sido descritas con anterioridad.

Además, los fibroblastos de pacientes con HI mostraron un fenotipo consistente durante varios pases *in vitro*, caracterizado por unos niveles de proliferación y de migración celulares aumentados, una adhesión disminuida, y alteraciones diversas en el citoesqueleto y las adhesiones focales, en comparación con los fibroblastos control. A su vez, los fibroblastos de HI mostraron alteraciones morfológicas y ultraestructurales compatibles con procesos autofágicos o de disfunción lisosomal (estudiados solo en los FHIs derivados de fascia), junto a una sensibilidad incrementada a estímulos pro-apoptóticos y signos compatibles con fragilidad celular.

Finalmente, destaca también que los fibroblastos de pacientes con HI son más sensibles a cambios en los valores de rigidez/elasticidad de las superficies del sustrato donde se incuban, siendo más proclives a la apoptosis en sustratos de baja rigidez, y mostrando alteraciones diversas que afectan a la morfología, el citoesqueleto y las adhesiones focales y a la proliferación celular, de manera más marcada que los fibroblastos control.

En su conjunto, nuestra investigación pone de manifiesto que las posibles agresiones a la fascia debidas tanto a la incisión y a la técnica quirúrgica, como a las características intrínsecas y comorbilidades del paciente, convergen en el microentorno del tejido y especialmente en el fibroblasto y la MEC local, y avalan la hipótesis de una teórica y potencial biología de la hernia HI. En el caso del músculo esquelético, y especialmente debido a su composición heterogénea celular, si bien también hemos obtenido resultados interesantes y que demuestran alteraciones relevantes, estructurales y moleculares, deberíamos aún profundizar más en la relación fibroblasto del tejido conectivo, célula inflamatoria y miofibras, para poder definir mejor la posible contribución de cada componente a la patología.

A nuestro parecer, el principal valor del trabajo reside en la utilización de muestras humanas (tejidos y cultivos primarios de fibroblastos), en el enfoque integral (tisular, celular en dos tejidos) y en la obtención de resultados no descritos hasta ahora, compatibles con una biología de la hernia y con potencial para ser estudiados en un futuro al nivel mecanicista (ayuda a establecer nuevas bases para una investigación celular y molecular, apuntando a posibles mecanismos biológicos operantes en la enfermedad). Entre las limitaciones principales, las propias de los de tipo observacional y la necesidad de limitar el estudio a un subgrupo de

pacientes, evitando aquellos que presentan excesivas comorbilidades o factores de riesgo (i.e., obesidad, diabetes, o enfermedades inflamatorias intestinales), quedando a la espera de futuras investigaciones que habrán de permitir una nueva sub-clasificación de pacientes. En este sentido, en continuidad con estos resultados y para poder seguir avanzando en esta dirección, actualmente en nuestro laboratorio del GRCG-VHIR, en el marco de un proyecto financiado por el ISCIII (PI13/00301), se está llevando a cabo el proyecto: *“Bases moleculares de la hernia incisional: de la transcriptómica a la clasificación de pacientes para un enfoque personalizado de la enfermedad”*. En un futuro, los posibles resultados que se puedan derivar de este trabajo podrían facilitar nuevas estratificaciones de pacientes para avanzar hacia una medicina de precisión más eficiente.

CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE FASCIA ABDOMINAL DE PACIENTES CON HI Y CONTROL

6.1 Alteraciones degenerativas en la fascia de pacientes con HI

En una primera etapa analizamos los cambios específicos de la fascia de pacientes con HI. Una parte importante de estos resultados ha sido ya publicada [Díaz R et al., doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.044, artículo en portada](294).

Como hallazgos más relevantes, el estudio en muestras de tejido mostró una pérdida de celularidad (fibroblastos) y la presencia de una degradación-desestructuración de la MEC en la fascia de la HI, acompañadas de una ausencia remarcable de infiltrado inflamatorio, y de un perfil específico de la expresión génica del núcleo proteico de algunos proteoglicanos (PGs). Las señales que inducen esta pérdida celular son desconocidas. Estudios previos han demostrado alteraciones en la degradación y también una formación defectuosa de nuevas proteínas sintetizadas (aunque principalmente en muestras de hernia inguinal (2; 9) (28) (236), que pueden influenciar cambios cuantitativos en el microentorno de la fascia. La intensa tinción de azul alcian en la HI apuntaría también a cambios cualitativos, como un incremento en el depósito de GAGs en la MEC, que podrían instigar una señalización pro-inflamatoria prolongada o cambios en la propia actividad degradativa en los tejidos de HI.

6.1.1 Los proteoglicanos como posibles nuevos candidatos a biomarcadores para la HI

El análisis de la expresión génica por reacción de RT-PCR demostró un perfil específico de la expresión del núcleo proteico de los PGs evaluados en la fascia de pacientes con HI. Como hemos podido ver, el análisis posterior de estos resultados mediante análisis de componentes principales (PCA) permitió evidenciar la segregación de los dos grupos de estudio (pacientes con HI y control), lo que sugiere que realmente podrían tener una capacidad potencial para ser utilizados como marcadores biológicos del estado de la fascia, con una eventual aplicación diagnóstica y tal vez con valor pronóstico de la enfermedad.

Es bien conocido que los versicanos (condroitin-sulfatos extracelulares) y sindecanos (heparan-sulfatos de membrana), tienen funciones en la adhesión celular, migración, proliferación, y señalización, las cuales intervienen en los procesos de reparación, morfogénesis, angiogénesis y desarrollo tumoral (325; 311; 297). La intensa tinción de azul alcian y la sobre-expresión génica de diversas isoformas de PGs (i.e., sindecanos -2, -3 y -4, versicanos 0, -2 y -3), sugieren una deposición característica los mismos que en última instancia podría contribuir no solo a modificar las características de la MEC (i.e., modificando sus propiedades mecánicas) sino también el propio fenotipo de los fibroblastos locales. A favor de esta observación, remarcar que los versicanos están relacionados con todo tipo de eventos celulares (i.e., proliferación, migración, apoptosis), procesos inflamatorios, pero también regenerativos y de remodelación en diferentes lesiones, estando asociados a diferentes patologías (cómo el cáncer), cuando se produce una desregulación de su expresión. Cerca de la superficie celular interactúan con diversos componentes de la MEC (incluyendo la fibronectina y la fibrilina) creando un especie de biopolímero mecánicamente activo que regula el fenotipo y función de las células. De forma notable, es capaz de colaborar en la modificación de las características de rigidez de la MEC, e incluso ser un reservorio de citoquinas para regular en el tiempo el fenotipo celular (311) (325) .

Los versicanos sobre-expresados a nivel génico en la fascia de HI fueron la isoformas V0, V2 y V3. El V0 se expresa de forma primordial en tejido embrionario y es menos abundante en tejidos adultos y el V2 es característico del sistema nervioso central, aunque también se ha encontrado en otros tejidos. El más desconocido es el V3, el cual se ha encontrado expresado al nivel de ARNm en diversos tejidos, pero pocos estudios han podido identificar la proteína nativa (sí que ha podido ser identificado en condiciones experimentales al ser sobre-expresado, (311)). Respecto a la implicación en diferentes patologías, el V0 se ha implicado en procesos inflamatorios y tumorales, conjuntamente con V1 (regulando la migración, proliferación y adhesión) (311) (326), y el V2 en procesos de regeneración del sistema nervioso central (y en algún estudio *in vitro* con propiedades anti-proliferativas) (296) . El V3 se diferencia del resto de versicanos por la falta de dominios de unión a GAGs, y se le han atribuido funciones biológicas antagónicas a los V0 y V1, como es el caso de las posibles funciones anti-proliferativas en modelos *in vitro* de células tumorales (296) . En otros estudios *in vitro*, en cambio, se indica que su expresión recupera la proliferación en fibroblastos (327), provocando una menor adherencia y proliferación en las células musculares lisas de las arterias (ASMCs) (328). También se ha descrito en modelos animales e *in vitro* que la expresión tiene un efecto anti-inflamatorio, ya que reduce la adhesión y la invasión de los monocitos. Esto lo consigue modificando la MEC, incrementando la síntesis de fibras elásticas (y la eliminación del hialurano), y la reducción de la molécula de adhesión pro-inflamatoria VCAM1 (311). Otra característica importante del V3 es que puede resistir la acción proteolítica por parte de MMPs y ADAMTS, ejerciendo un efecto dominante sobre el resto de PGs los cuales sí que se ven regulados por su acción (328). Un hecho importante, es que no observamos la sobreexpresión de la isoforma V1 -la más abundante en los tejidos adultos- que está más pronunciadamente regulada en procesos de reparación-remodelación en diferentes lesiones y patologías (311).

Respecto a los sindecanos nuestros resultados muestran un fuerte sobre-expresión génica significativa del núcleo proteico de las isoformas de sindecanos -3 y -4, y una tendencia al alza del sindecano-2. El sindecano-1 se expresa en células endoteliales, monocitos y fibroblastos; el sindecano-2 en células mesenquimales; el sindecano-3 en el SNC y en las células endoteliales y células sinoviales de articulaciones con artritis reumatoide; y el sindecano-4- se encuentra de forma ubicua, pero a niveles bajos (329). Todos ellos están implicados en la respuesta inflamatoria frente a un trauma y actúan de forma secuencial. El sindecano-1, en el que no observamos diferencias, se asocia a la primera fase de infiltración de células inflamatorias coincidente con el inicio de la reparación. Cuando se forma el tejido de granulación y en la fase de remodelación comienzan a co-expresarse el sindecano-2 (330) y el sindecano-4 (331). La actividad de los sindecanos se realiza en parte a través a los heparan-sulfatos conjugados en su dominio extracelular, que interaccionan, entre otros, con la MEC, citoquinas, factores de crecimiento y enzimas. A pesar de carecer de actividad enzimática, su dominio citoplasmático se asocia con fosfolípidos y quinasas, implicados de forma importante en la migración y en la interacción entre la MEC y el citoesqueleto celular (329) (332).

La no sobre-expresión del sindecano-1, característico de heridas agudas, y la sobre-expresión de las isoformas de sindecanos -2 y -4, y especialmente del sindecano-3, relacionado con patologías inflamatoria crónica, conjuntamente con el patrón de expresión génica encontrado para los versicanos podría apuntar a que el desarrollo de la HI es compatible con un estado de inflamación crónica de baja intensidad (*chronic low grade inflammation*).

Finalmente destacar que, interesadamente en una Tesis Doctoral realizada previamente en nuestro grupo [J Guillem: <http://hdl.handle.net/10803/117381>], en la que se validaron análisis de expresión génica por biochips, se encontró que el PG agregano se encontraba infra-expresado tanto al nivel de ARNm como proteico, en cultivos primarios de fibroblastos de fascia y del TCI del músculo esquelético de IH. El agregano, unido al ácido hialurónico, permite la resistencia mecánica a la MEC, a la vez que le otorga flexibilidad y limita su erosión (254). Por lo tanto su infra-expresión sugeriría que podría poner en peligro la estabilidad del tejido *in vivo*. En este análisis de biochip, también se identificaron genes relacionados con la progresión del ciclo celular alterados de forma específica en los fibroblastos de fascia (los resultados están pendientes de publicación).

6.1.2 El estado degenerativo de la fascia podría estar asociado a mecanismos activos implicados en la muerte celular por apoptosis

Un aspecto interesante y novedoso de este estudio ha sido también la identificación de señales sugestivas de apoptosis y de autofagia en las muestras de fascia de HI, las cuales pueden conducir a la auto-destrucción del fibroblasto, sin un incremento compensatorio en los niveles de proliferación celular (207; 333). La observación de unos índices de TUNEL aumentados, conjuntamente con la activación de la caspasa-3 y de su firma asociada de fragmentación de sus sustratos, es compatible con la inducción de muerte celular por apoptosis. Respecto a la proliferación celular, el índice de PCNA (anti-antígeno nuclear de proliferación celular)

fue también más elevado en la fascia de la HI. Sin embargo, los niveles de Ki-67 (un marcador de células que proliferan de manera activa) (334), fueron bajos y similares para ambos grupos. Este aparente desacuerdo entre los dos índices, se podría explicar debido a que el PCNA es necesario, no solo para la replicación del DNA, sino también para su reparación (260). En su conjunto, estos resultados son compatibles con procesos relacionados con el daño celular y del DNA y correlacionarían con los cambios histológicos encontrados. Se necesitan aún más estudios en términos génicos y moleculares para, en un futuro, poder diseccionar estos aspectos.

La fragmentación observada en los componentes del citoesqueleto advierten de un proceso dinámico de desestabilización celular, que finalmente desembocaría en el funcionamiento anómalo de los fibroblastos locales y conduciría a la atrofia de la fascia (335). En particular, destacamos un incremento en la proteólisis de vimentina acompañada de un aumento de su fracción soluble y fosforilada (un indicador del desmantelamiento de los filamentos de vimentina) en los homogeneizados tisulares de la fascia de HI (320). La vimentina es el principal filamento intermedio, característico de los fibroblastos. Cómo tal, sirve de soporte estructural para orgánulos y una miríada de moléculas de señalización, pudiendo modular la respuesta a señales pro-apoptóticas específicas (336). Se ha descrito también *in vitro* en diversos modelos celulares (NIH3T3, hMSC y HUVEC) que el incremento de la rigidez del sustrato de cultivo producía un incremento de la fracción de la vimentina fosforilada hasta una rigidez de 10kPa, a partir de esta rigidez disminuía esta fracción (337). Esta fosforilación estaría mediada en parte por el reclutamiento de las integrinas en las adhesiones focales que activaran las quinasas ROCK (Rho associated protein kinase) y PAK (p-21 activated kinase), que finalmente fosforilarían la vimentina (337). En el caso de la fascia de los pacientes no afectados por la HI, la rigidez teórica se encuentra más allá de los 10kPa (338), de este modo la presencia más abundante de la fracción soluble-fosforilada podría indicar una rigidez inferior patológica, que afectaría a la integridad del citoesqueleto de vimentina y a la capacidad de resistir tensiones externas. En el mismo sentido, y de forma interesante, la caspasa-3 puede actuar sobre la fosforilación de la vimentina directamente, ya que tienen como sustrato la Rho quinasa 1 (ROCK1) que fosforila el dominio head de la vimentina. La caspasa-3 actúa sobre la unidad reguladora de ROCK1, suprimiéndola, haciendo la actividad fosforilativa de la ROCK1 constitutiva, incrementando la fosforilación de los filamentos de vimentina provocando su despolarización, y a su vez ser más accesible a los enzimas proteolíticos (322).

De igual manera la proteólisis de α -fodrina se considera una característica molecular de la apoptosis, desestabilizando la membrana y ocasionando la retracción del perímetro celular (339). Por último PARP-1 es un enzima nuclear que participa, mediante la ADP-ribosilación, en la reparación del DNA y la muerte celular, dependiendo de la intensidad del daño celular, promoviendo la expresión de agentes pro-inflamatorios. PARP-1 actúa como un sistema endógeno que detecta la rotura del ADN, uniéndose al él y formando polímeros de ADP-ribosa unidos a las proteínas asociadas a la cromatina, incluida la misma PARP-1. Esto permite un mejor acceso a los enzimas de reparación del ADN (340). Un hecho a destacar, es que la actividad de PARP-1 necesita como sustrato NAD^+ , que en situaciones extremas, conduce a la depleción del NADP y ATP que participan en las

vías metabólicas de suministro. Una acción para prevenir esta depleción, es la actuación proteolítica de las caspasas sobre el PARP-1. Esta depleción, conjuntamente con la capacidad de inducir la translocación del factor apoptosis-inducing factor (AIF) desde la mitocondria al núcleo (causando la condensación y su fragmentación) determina como el PARP-1 genera la muerte celular. Así, el estado redox-energético de la célula parece jugar un papel importante en el sistema gestionado por PARP (341). Situaciones de estrés metabólico, celular y de inflamación, donde la generación de ROS, depleción energética y secreción de citoquinas promuevan el estado redox-energético desfavorable, y que en la fascia HI se ha indicado como posibles (9) (121) (342), ayudarían a la degeneración del tejido. De forma interesante, este tipo de estrés (redox-energético) se ha sido asociado, entre otros, a procesos autofágicos (303).

6.1.3 La autofagia como posible co-inductor de la muerte celular en la fascia de pacientes con HI

Otro aspecto interesante ha sido encontrar evidencias de que en la fascia de la HI pueden estar también activados mecanismos de autofagia, a juzgar por una relación incrementada de LC3 II/LC3I, y de LC-3-II en la sub-fracción de membranas, coincidente con en el análisis de la ultraestructura de celular de los fibroblastos en cultivo, donde se observaron abundantes vacuolas autofágicas y otras estructuras similares a los autofagolisosomas en los fibroblastos de la HI. Ambos resultados podrían evidenciar procesos autofágicos *in vivo*, pudiendo alterar el fenotipo de los FHIs y las propiedades del tejido. En este sentido, recientemente se ha descrito la relación entre el estrés del retículo endoplasmático (estrés RE), la autofagia, y la muerte celular (303) (343). Dentro del RE se produce el plegado (*folding*), la modificación post-traducciona, y la revisión de las nuevas proteínas sintetizadas. Las proteínas con plegamiento defectuoso (*misfolding*) son ubiquitinizadas y retro-translocadas por chaperonas al citosol donde son degradadas por los proteosomas, la llamada degradación asociada al RE (*endoplasmic reticulum-associated degradation*). Si la capacidad de este sistema se ve sobrepasada, tanto por un exceso de las proteínas que presentan alteraciones en su plegamiento, como por una deficiente eliminación, aparece el estrés del RE. Entre los diferentes causantes se encuentra las alteraciones en el equilibrio redox debidas a la hipoxia, agentes oxidantes (ROS) o agentes reductores, la hipoglucemia (inhibiendo la glicosilación) y las alteraciones en el flujo de Ca^{2+} (inhibición de las chaperonas calcio-dependientes que se encargan del plegamiento de las proteínas). Llegados a este punto se produce la respuesta frente a las proteínas no plegadas o *unfolded protein response* (UPR), que genera una respuesta específica de 3 vías implicadas: la de la *protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), la de la *inositol-requiring transmembrane kinase y endonuclease 1a* (IRE1a); y la activación del factor de transcripción activador 6 (ATF6; *Activating transcription factor 6*). El resultado final es la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas y el incremento de chaperonas del ER, con el objetivo de eliminar las proteínas aberrantes. Si a pesar de la activación de la UPR, a la célula no le es posible superar el estrés RE, la autofagia puede ser activada como mecanismo de supervivencia. Si incluso con este sistema, no es posible resolver el estrés ER, la célula entra en apoptosis mediante la transcripción de factores como ATF4 (*Activating transcription factor 4*) y CHOP (*the transcription factor C/EBP homologous protein*) (303) (343).

El sistema de degradación proteolítica asociada al RE, la respuesta UPR, y por extensión la autofagia, son mecanismos de protección frente a situaciones de estrés que generan un cúmulo de proteínas no funcionales erróneamente plegadas. Observando los resultados en los FHIs y el tejido de la fascia HI, nos podría sugerir que los fibroblastos de la fascia HI han sido sometidos a un estrés continuo que ha podido generar esta respuesta de supervivencia. Este estrés puede haber sido causado por condiciones diversas (i.e., hipoxia, ROS, malnutrición y/o la acción de citoquinas inflamatorias), desde el momento post-quirúrgico, y durante el tiempo posterior, o incluso, de forma más interesante, podríamos elaborar la hipótesis que este estado autofágico fuese previo a la intervención, condicionando y comprometiendo la reparación de la pared abdominal. Uno de estos estímulos podría ser la sobre-expresión proteica del TNF α observado en la fascia HI (28). De hecho en fibroblastos humanos sinoviales provenientes de pacientes de artritis reumatoide se ha observado que la estimulación mediante TNF α in vitro incrementa la respuesta al estrés ER, estimulando la autofagia (344). De este modo, se podría comprender y sintetizar, como gran parte los factores generales asociados a la patología de la HI actuarían en un punto común focalizado en el fibroblasto. Además, esta hipótesis se podría extender aquel subgrupo de pacientes en la que no se explica la aparición de la HI por deficiencias en la técnica quirúrgica o complicaciones asociadas. Evidentemente queda por elucidar el estímulo inicial o factores que desencadena el proceso herniario a nivel molecular. A pesar de esto, la implicación de la autofagia en la degeneración de la fascia, ayudarían a señalar de forma principal el estado inicial del fibroblasto, sometido a un posible estrés RE.

6.1.4 El fibroblasto HI como posible inductor de la degeneración de la fascia HI

Además, los cultivos primarios de los fibroblastos primarios de HI -obtenidos a partir de las biopsias de tejido- presentaban cambios morfológicos y funcionales que no habían sido descritos previamente y que podrían tener implicaciones diagnósticas. Aparte de las diferencias morfológicas (tamaño más pequeño) y funcionales (proliferación y migración aumentadas, un descenso en la fuerza de adhesión, en paralelo con una red citoesquelética alterada, menos fibras de estrés positivas para α -SMA, y unos contactos focales más pequeños) observadas en los FHIs, quizás lo más destacable fue la fragilidad celular, la labilidad superior frente a estímulos pro-apoptóticos y las características compatibles con procesos autofágicos/lisosomales comprometidos, y que ya hemos ido comentando. Los resultados sugieren que la posible degeneración del tejido y el fenotipo del FHIs, estarían alterando las propiedades biomecánicas de la fascia, y en última instancia promoviendo la HI (de hecho, la desestructuración tanto de la fascia como también la del músculo en la HI, quedó de manifiesto de forma indirecta desde el primer momento con la mayor facilidad de obtener cultivos de fibroblastos primarios de las biopsias).

La MEC en la se encuentra inmerso en fibroblasto regula su fenotipo y su actividad. Una excesiva remodelación de la MEC puede resultar en una inflamación crónica. En esta inflamación crónica siempre se había focalizado sobre las células del sistema inmune, espacialmente de la respuesta adaptativa, denostando el papel de los fibroblastos. Esta función secundaria del fibroblasto ha ido cambiando durante esta última década,

recopilándose nuevas evidencias en las que los fibroblastos -representantes de la inmunidad innata- podrían influir en los procesos de remodelación patológicos de cierta forma autónoma. Unos de los mecanismos por el que los fibroblastos serían los actores principales en los procesos inflamatorios sería a través de los receptores toll-like receptors (TLRs).

Los resultados observados en la degeneración de la fascia, indicarían que probablemente existe una generación de fragmentos provenientes de la MEC y de las células del tejido dañado. En este sentido, los TLRs están implicados en el reconocimiento de patrones de moléculas (ej. agentes infeccioso, fragmentos de macromoléculas), y han sido revelados como el punto de conexión entre la remodelación fallida y la MEC (345). La MEC genera una multitud de fragmentos endógenos durante el proceso de trauma de forma específica o DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), procedentes, entre otros, del versicano, biglicano, hialurano y heparan-sulfatos. Estos DAMPs interactúan con receptores TLR2 de los fibroblastos (de diferente origen), induciendo la producción de MMPs, y remarcablemente, de citoquinas pro-inflamatorias que crearían un bucle de retroalimentación positivo, activando a los fibroblastos a remodelar-degradar más MEC, que a vez activarían a otros vía TLRs (345-346; 200; 201).

La inducción de la producción de citoquinas podría a su vez, y por tanto, modificar el fenotipo del fibroblasto. En un estudio en nuestro grupo, en la fascia de pacientes con HI, se describió un aumento de las actividades de MMP-3 y MMP-9 y de la expresión proteica del MMP-1, concomitante con un incremento de la expresión del TNF α soluble y una disminución de TIMP-3 a nivel proteico, inhibidor de ADAM-17 (TACE) (activador de TNF α) (28). La acción de estas MMPs abarca tanto componentes fibrilares, como componentes del estroma, siendo inducida su expresión por el TNF α en los fibroblastos (347). El TNF α a pesar de tener un efecto pro-fibrótico en la activación de los fibroblastos y su reclutamiento en las primeras fases de la repuesta inmune (348), tiene también un efecto anti-fibrótico a través de la supresión de la señal del TGF β , interfiriendo en la señal de los factores de transcripción SMAD, y suprimiendo el fenotipo del miofibroblasto (349). Esto podría ser compatible con la ausencia de una histología fibrótica, ya que el TNF α la estaría inhibiendo. De forma similar, en la tendinosis (tendinopatía degenerativa) se ha observado una degeneración del tejido (muy similar a la histología observada en nuestro estudio), con celularidad reducida y sin componente inflamatorio aparente (123). Además, recientemente se ha podido observar que los tenocitos (modelo celular similar al fibroblasto en el tendón) de tendones con tendinosis ofrecían una expresión proteica incrementada de TNF α , caspasa-3, mostrando un incremento de apoptosis celular, sobre todo en células más redondeadas (350). Esta relación entre la morfología más redondeada y la apoptosis también fue observada en este estudio. Serán necesarios nuevos estudios *in vivo* e *in vitro* para poder confirmar esta hipótesis respecto a los TLRs y su implicación en el papel autónomo de los FHLs en el proceso degenerativo de la fascia, para poder seguir profundizando en los mecanismos moleculares de la patología.

CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE PACIENTES CON HI Y CONTROL

6.2 El estado del músculo de la pared abdominal de los pacientes con HI favorecería el desarrollo de la HI: posible papel del componente inflamatorio

El músculo de la pared abdominal, rodeado e infiltrado por la fascia (el TCI del endomisio, perimisio y epimisio) proporciona la mayor parte de la fuerza de la pared abdominal. Además, un depósito adecuado de MEC es crucial para la reparación eficiente después de una agresión o trauma (9; 66; 41), ya que la MEC que rodea al músculo esquelético juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura y refuerza la función contráctil muscular. Además, la MEC y como ya hemos citado anteriormente, secuestra y presenta factores diversos a las fibras, como HGF, FGF, etc., y otras señales a las fibras diferenciadas a través de complejos de distroglicanos y sarcoglicanos. Diversos mecanismos se han propuesto para la regulación fisiológica de las miofibrillas por parte de la MEC. Entre los posibles mecanismos se han indicado la mecanotransducción, la composición-conformación espacial de la MEC, y como citamos anteriormente la capacidad de regular la función de las citoquinas y factores de crecimiento, mediante la unión-liberación a la MEC (41) (351). Recientemente un trabajo ha recopilado la bibliografía entorno a la disfunción mecánica de los pacientes que han sido sometidos a la reparación de la HI (308). Sin embargo no existen estudios entorno a la estructura-características del músculo, ni del TCI, de los pacientes afectados por la HI a nivel histológico, molecular y/o celular. Teniendo en consideración lo descrito, pensamos que sería crucial analizar las características del músculo HI con el objetivo de observar si su estado afectaría al desarrollo de la patología.

Nuestros resultados indican que en el músculo esquelético de la pared abdominal, se observaron fenómenos compatibles con procesos de degeneración-regeneración, que de forma neta provocaban una desestructuración del tejido. Así, el músculo de la HI mostró de forma aislada focos característicos inflamatorios, con presencia de hiper celularidad, fibrosis endomisial -con deposición de colágeno desorganizada (de colágeno IV de forma significativa), y una tinción incrementada de azul alcian-, con presencia de miofibras necróticas y regenerativas (52), sin observarse la presencia de miofibroblastos.

En el componente inflamatorio se identificaron linfocitos de tipo B y T (tanto CD4 como CD8), macrófagos, y neutrófilos. Estos últimos podrían denotar que el proceso de agresión al músculo es constante, provocando lesiones continuas, ya que son los primeros a acceder al tejido cuando se ocasiona un trauma. La descripción del tejido del músculo coincide con los efectos deletéreos que provocarían la expresión proteica incrementada de TNF α e IL-6 que se observó previamente en el músculo de HI en un estudio de nuestro grupo (28). Así mismo, la descripción degenerativa-regenerativa, coincidiría con una exposición crónica a las dos citoquinas. Ambas citoquinas pueden ser expresadas y secretadas por células inflamatorias, musculares y fibroblastos, con lo que el origen de cada una de ellas debería ser establecido de forma más precisa para poder indicar quien es el mayor productor. En este estudio previo, el músculo de HI tuvo unos niveles de expresión proteica más elevados de TNF α y, sobre todo, de IL-6, respecto a la fascia de la HI. Teniendo en cuenta que el músculo es un

tejido más dinámico respecto a la síntesis proteica y a la capacidad regeneradora, este incremento más elevado en el TNF α e IL6 sería una característica propia del músculo, indicando posiblemente el doble papel de estas dos citoquinas en el metabolismo-regeneración muscular y al mismo tiempo en su atrofia-degeneración.

Esta apariencia de un músculo post-traumático, con fenómenos degenerativos y regenerativos, quedo también reflejado por los indicadores de TUNEL, PCNA y Bcl-2, en donde al igual que la fascia HI, el músculo HI presentaba una apoptosis celular incrementada, intentando ser compensada por mecanismos de reparación del DNA (PCNA), y una leve presencia anti-apoptótica (Bcl-2) (261). Del mismo modo, otros marcadores de regeneración muscular (como los factores de regulación miogénicos MyoD y miogenina) también resultaron estar incrementados (al nivel de expresión proteica) en muestras de músculo de HI. Este aparente proceso dinámico degenerativo-regenerativo, también se puso de manifiesto en la activación de la caspasa-3 y en la fragmentación de sus sustratos (desmina, vimentina, y PARP).

En este caso la interpretación de la acción proteolítica de la caspasa-3 es más compleja que en la fascia, ya que ésta representa un modelo más sencillo de estudio donde el fibroblasto es el tipo celular predominante. En el músculo tendríamos dos tipos celulares predominantes, la célula muscular y los fibroblastos del TCI (41). Si bien, podemos asumir que existe una acción pro-apoptótica en el músculo de forma general, en el músculo también se ha descrito que la acción de la caspasa-3 puede participar en los procesos de reparación y de regeneración muscular (352; 353). La activación de la caspasa-3, con la expresión incrementada en paralelo de los factores de regeneración miogénicos sugiere que participa, en parte, en el proceso regenerativo del músculo. El efecto pro-apoptótico de la caspasa-3 la vemos reflejada en la acción proteolítica sobre los filamentos intermedios de la fibra muscular, desmina, y sobre el del fibroblasto, vimentina. La proteólisis de la vimentina –indicador de la apoptosis de los fibroblastos del TCI-, se corroboró con los índices de TUNEL y PCNA, que al igual que en la fascia HI, fueron más altos que en los HI. Ambos tejidos conectivos, la fascia y el TCI, estarían afectados por el proceso degenerativo de la HI de igual forma.

Una hipótesis que surge de esta posible capacidad de producción de las citoquinas por parte del músculo, es que el músculo actuase como una fuente generadora de citoquinas (354) (355) que afectase por proximidad al TCI (y a la fascia), y que a su vez alterado, afectase en forma de retroalimentación negativa al mismo músculo, perpetuando la patología (58). En esta hipótesis, no queda claro si el primero en dañarse fue el músculo o el tejido conectivo, o los dos al mismo tiempo. Elucidar esto, nos retraería a los primeros momentos post-quirúrgicos. Ambos eventos, la presencia de componente inflamatorio y la secreción de citoquinas, podría ser compatible con una patología crónica de baja intensidad que provocaría el debilitamiento del músculo durante el transcurso de la patología.

6.2.1 El debilitamiento del músculo podría ser debido a la conmutación detectada en los tipos de fibras musculares

A pesar de los defectos, los cambios degenerativos-regenerativos del músculo se presentaron de forma focalizada, no pareciendo provocar un debilitamiento general. Es bien conocido que existe un subgrupo de enfermedades musculares crónicas conocidas como miositis o enfermedades inflamatorias musculares. Al nivel fenotípico, las miositis se caracterizan por una debilidad muscular, poca resistencia a la fatiga, y unos niveles de regeneración muscular mantenidos en el tiempo. También, en el músculo de las muestras con miositis se observa la presencia de infiltrados inflamatorios compuestos principalmente de macrófagos, de células de tipo T y células dendríticas, paralelamente con una pérdida mediada por mecanismos inmunológicos de fibras musculares, hipoxia y una incapacidad para resolver los problemas de regeneración de una manera eficiente (356). Aunque pobremente caracterizado, destaca en estos trastornos la pre-existencia de macrófagos pro-inflamatorios, de tipo M1 y citoquinas asociadas, como el TNF- α , y una incapacidad aparente para cambiar a macrófagos del tipo anti-inflamatorio o M2. Poco conocidas al nivel fundamental y por tanto con dificultades para su tratamiento por la falta y/o presencia de efectos secundarios al ser tratadas con antiinflamatorios, etc., la miositis son un modelo importante a seguir y que puede ayudarnos a comprender el papel complejo de las células inflamatorias y la presencia de citoquinas a la hora de orquestar una reparación muscular normal o aberrante. En el caso de este tipo de patología y en la enfermedad de la obstrucción pulmonar crónica (COPD) se ha observado que existe una disminución de las fibras de tipo I, correlacionada con fenómenos de hipoxia e hipoxemia, respectivamente (356-358). Creemos que estos mecanismos también podrían intervenir en debilitamiento del músculo HI, colaborando con el de la fascia de HI degradada, favoreciendo conjuntamente el proceso de la HI.

Más en concreto, demostramos que en el músculo de la HI se produjo una disminución de la isoformas de tipo I de la MyHC (cadena pesada de la miosina), concomitante con un aumento de las de las isoformas de tipo IIx. Este cambio de isoformas de las MyHC -y por extensión de la proporción de tipos de fibras- altera la composición en el músculo y sus propiedades fisiológicas. En el músculo esquelético encontramos fibras de tipo I, de contracción lenta y oxidativas (pueden mantener la tensión durante un tiempo prolongado y presentan resistencia a la fatiga), fibras de tipo IIa, de contracción rápida y glucolíticas (son más resistentes e irrigadas que las de tipo IIx; pueden mantener niveles de tensión elevados durante bastante tiempo), y fibras de tipo IIx, de contracción rápida y que utilizan P-creatina (generan mucha fuerza pero la pueden mantener durante poco tiempo, fatigándose antes que las otras fibras).

Así pues, la resistencia a la fatiga en contracciones mantenidas (isométricas), es muy superior en las fibras tipo I que en las tipo -II, sobre todo en la de tipo -IIx (51) . Siendo el tipo de contracción que realiza el músculo de la pared abdominal mayoritariamente isométrica de tipo postural y de contención, el cambio de isoforma de MHC que observamos del tipo I hacia el tipo IIx en el músculo HI sugeriría que la capacidad para realizar la funciones de contención y para contrarrestar la presión intra-abdominal, se verían comprometidas colaborando con el

desarrollo del proceso de la HI. Además el cambio de fibras de tipos I a II se asocia también a la inactividad muscular, frecuente en pacientes de miositis, y COPD (357) (358), lo que muy posiblemente ocurra también en los de HI.

Aparte de las posibles causas metabólicas relacionadas con la hipoxia, y de conducta del paciente, que promueven la debilidad del músculo mediante el cambio de tipos de fibras, la presencia del componente inflamatorio observado en el músculo HI, parecería sugerir un papel significativo en el debilitamiento o fatiga crónica, descrito en otras alteraciones patológicas musculares (356), como la caquexia. La caquexia es un complejo síndrome metabólico asociado a patologías crónicas o terminales caracterizadas por la pérdida de masa muscular, con o sin pérdida de tejido adiposo (359). En la caquexia el debilitamiento muscular no es posible atribuirlo totalmente a la pérdida de masa muscular. De hecho experimentos con ratones transgénicos que expresaban de forma cardio-específica TNF α , presentando unos niveles de TNF α moderados, mostraban un fenotipo e histología no diferenciable de los ratones control. Sin embargo, al estudiar la fuerza específica (fuerza/área muscular), estas mostraban una disminución del 40% en las fibras del diafragma. El resultado sugería que antes de aparecer la caquexia y la degeneración del músculo, aparecería el debilitamiento muscular. Estudios en animales de experimentación indican que el efecto mediaría a través del TNFRI, y que no alteraría mecanismos en el tránsito del calcio, si no se localizarían a nivel de las proteínas de las miofibrillas mediante modificaciones post-traduccionales, afectando a la contracción. Este efecto del TNF α parecería mediar por el incremento de la actividad oxidante de los derivados del óxido nítrico (NO) y de los ROS. Se ha sugerido que el TNFRI activa alguna de las isoformas de la esfingomielinasa (SMAase), ayudada con las proteínas adaptadoras FAN (*factor associated with SMAase activation*) y RACK1 (*receptor for activated C kinase*), generando ceramida por la hidrólisis de la esfingomielina membranal que mediaría en el incremento de la actividad oxidativa. La vía por la que la ceramida actuaría no ha sido descrita de forma precisa, pero se sugiere que involucraría la acción de la proteína quinasa C- a la que se une directamente la ceramida- que activaría la vía ERK1/2-fosfolipasa A2, que sintetiza ácido araquidónico, necesario para producción de ROS y NO, a través de la mitocondria y las NO sintasas constitutivas (isoforma neuronal y endotelial). El efecto sobre la fuerza de la contracción de NO y ROS es directo sobre las proteínas de las miofibrillas, pudiendo actuar de forma oxidante sobre los grupos sulfhidrilos de las proteínas o en las proteínas que regulan la actividad contráctil, fosfatasa y quinasas, alterando el estado redox celular (360) (357). Además, el efecto de la hipoxia también induce la expresión del TNF α en el músculo, con lo que a partir de un estado hipóxico se podrían generar ROS y NOS, sumándose otra posible causa al debilitamiento muscular (356).

6.2.2 Los proteoglicanos en el músculo esquelético también se muestran como posibles nuevos candidatos a ser marcadores biológicos en la HI

Mediante el análisis de PCA, al igual que en la fascia de HI, el patrón de expresión génica conjunto del núcleo proteico de los PGs analizados permitió segregar los dos grupos a estudio, a pesar de tratarse de un tejido con composición celular heterogénea. Al igual que en la secreción de citoquinas, la secreción de PGs al

espacio extracelular es la suma de la producción conjunta de todos los tipos de células presentes en el músculo. Por tanto, el análisis de la expresión génica-proteica, sin efectuar un análisis de la localización, es difícil de interpretar. Lo que sí es posible es analizar el resultado total de las diversas expresiones en el medio extracelular. De este modo interpretamos los resultados de la expresión PGs extracelulares del biglicano (génica) y los versicanos (génica y proteica), mientras que inferimos que la expresión génica de PGs de membrana pertenece mayoritariamente a las miofibras, ya son el tipo celular predominante.

De forma notable el biglicano se encontró infra-expresado a nivel de mRNA en la HI. Este resultado es comparable al descrito en el aneurisma aórtico abdominal, enfermedad crónica de carácter inflamatorio, en la que se produce una progresiva degeneración de la pared de la aorta (361). El biglicano (al igual que la decorina) participa en la formación-ensamblaje de las fibras de colágeno y en procesos de reparación, siendo su ausencia un impedimento para la reparación (362). Esto sugiere que su infra-expresión podría contribuir a un debilitamiento de la MEC en el músculo esquelético de la HI.

Respecto a los versicanos y sindecanos, se conoce poco en relación a la regeneración muscular en humanos. De hecho los estudios se han centrado en torno a la miogénesis en modelos in vitro/vivo en animales de experimentación. De los resultados obtenidos en estos estudios, de momento, se han intentado extrapolar a la regeneración muscular en el individuo adulto, ya que en cierta forma se produce una regresión a la organogénesis muscular (363). En nuestro caso, en el músculo de HI observamos la sobre-expresión de la isoforma V3 y una infra-expresión de V2, sin detectarse la expresión de V0 y V1, a nivel génico.

El análisis de la expresión proteica (estudiado solo en el músculo, por tratarse de un estudio posterior al de la fascia) ayudó a clarificar algo el balance neto de la expresión del ARNm, demostrando que en los músculos HI existía un incremento de la expresión proteica de versicano. De forma sorprendente la sobre-expresión proteica se localizó en versicanos de alto peso molecular (V0, V1, V2), no observándose al nivel de V3. Lo que sí se observó, fueron fragmentos inferiores al peso molecular de V3 (74.2 kDa; proteína core sin GAGs). Las divergencias entre la expresión génica y proteica, podrían ser aducidas a un diferente tratamiento del ARNm post-transcripcional, o muy posiblemente a que la producción de los versicanos es mayoritariamente debida a los componentes del TCI. El incremento de versicanos en la MEC podría indicar el desarrollo de un proceso inflamatorio-degenerativo del TCI, como también la posible degeneración-regeneración de las fibras musculares. Los versicanos son importantes para la miogénesis del músculo, ya que proporcionan el lecho óptimo para proliferación y diferenciación de los mioblastos, modulando el proceso (363). Un proceso crucial para esta regulación es la proteólisis de los versicanos mediada por MMPs (1, 2, 3, 7 y 9) y sobre todo por las ADAMTS. Por ejemplo, las ADAMTS rompen el enlace peptídico Glu441-Ala442 en la isoforma V1 generando fragmentos necesarios para el desarrollo muscular. En estudios in vitro con mioblastos se ha revelado determinante la acción de ADAMTS 5 o/y -15 sobre el V1, en la fusión de los mioblastos (que expresan miogenina) para formar miotubos multinucleados (364). Por tanto, el patrón de fragmentos de versicanos

sugiere que la expresión proteica incrementada es compatible con una proteólisis específica por parte de ADAMTS (o con otras MMPs), relacionada con la degeneración-regeneración muscular observada en la histología.

En el caso de los sindecanos, en el músculo HI, se observó la infra-expresión de las isoformas de sindecanos -2 y -3 en la HI, no encontrándose la expresión de sindecano 1, característico de la fase pre-natal a nivel génico (60). Esto coincide con la infra-expresión génica generalizada de los sindecanos descrita en células satélites activadas in vivo en modelos animales, en la miogénesis y en el trauma inducido (60). La regulación de la expresión de los sindecanos es vital para la diferenciación miogénica, ya que se asocian a receptores de factores de crecimiento como el del HGF y FGF, regulando la trans-señalización (58).

Adicionalmente también el colágeno tipo IV exhibió una expresión incrementada en el músculo HI, que coincidió con la inmunohistoquímica del tejido, restringido mayoritariamente a la lámina basal de las miofibras. Las miofibras y los fibroblastos activados, pueden ser inducidos a incrementar la producción de colágeno de tipo IV por la acción del LIF generada por el propio músculo en regeneración, siendo la expresión del LIF inducida, a su vez, por el TNF α (entre otras citoquinas y factores de crecimiento) (58).

En resumen, los resultados obtenidos en el análisis de los PGs, son compatibles con los obtenidos en la histología y en los procesos degenerativos-regenerativos descritos en el músculo HI, en este estudio. Esto habilitaría a los PGs del músculo como posibles marcadores biológicos que podrían ayudar al diagnóstico (y pronóstico de la HI), y que podrían ser potenciados mediante el uso biochips de expresión génica, para su posterior validación y análisis cuantitativo. En este sentido, y como ya ha sido comentado para la fascia, los resultados del biochip de fibroblastos primarios del TCI, presentados en la tesis citada [J Guillem: <http://hdl.handle.net/10803/117381>], indicaron también que los genes encontrados alterados estaban relacionados una función de reguladora de la MEC. Uno de ellos, al igual que en la fascia, fue el *agrecano*, que se encontró infra-expresado (a nivel génico y proteico en el proceso de validación) tanto en los fibroblastos de fascia como de músculo, sugiriendo, que si la expresión era en el mismo sentido en el tejido, podría afectar a la integridad y funcionalidad del TCI y del músculo por extensión.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LOS FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE HI EN RESPUESTA A SUSTRATOS DE DIFERENTE RIGIDEZ

6.3 Estudio de los fibroblastos en presencia de sustratos rígidos. Los FHIs presentan un fenotipo característico y diferencial *in vitro*

Respecto a los experimentos *in vitro*, los resultados indican que tanto los FHIs derivados de la fascia como los del músculo (TCI) habían adquirido un fenotipo *in vivo* en el tejido que se mantuvo de forma constante durante los diferentes pases de los cultivos primarios, alterándose los procesos fundamentales celulares.

Una de las dificultades de trabajar con fibroblastos de los tejidos conectivos es la falta de marcadores génicos específicos. Recientemente se ha identificado al factor de transcripción *Tcf4* (*TCF7L2*) como un importante marcador potencial de fibroblastos de músculo, aunque faltan más estudios que validen su utilidad (365). Durante el proceso de redacción de este manuscrito, hemos tenido la oportunidad de evaluar su expresión (y también la de *Thy1*) en fibroblastos del TCI del músculo esquelético por reacción de RT-PCR, confirmando su presencia y encontrando ligeras diferencias en los valores de *fold-change* (FC) entre FHIs vs no-FHIs para *TCF7L2* (FC: 1.513, $P = 0.032$), sin cambios significativos para *Thy1* (FC: 1.204, $P = 0.164$).

En los estudios iniciales en placa de poliestireno y vidrio (asociados al estudio de la fascia y el músculo esquelético), los FHIs de ambos tejidos mostraron un menor tamaño celular, una proliferación y capacidad de migración mayor, y una menor adhesión al sustrato (posiblemente relacionadas con la menor formación de AFs) respecto a los no-FHIs. Además presentaban un citoesqueleto alterado, con una menor estructuración de los filamentos de vimentina y de los microfilamentos de actina compatible con la fragilidad observada en los estudios de ultraestructura celular. Incluso en un sustrato altamente rígido (placa de poliestireno y vidrio) no eran capaces de producir filamentos de α -SMA, característicos de los miofibroblasto y encargados finalmente de la retracción de los bordes del trauma en el proceso de reparación, con la misma abundancia que los fibroblastos control no-FHIs.

De igual forma los FHIs, en cultivos confluentes, mostraron casi nula capacidad de formar conexiones célula-célula similares a las de tipo *fibronexus*, no formándose la red intercelular de microfilamentos de actina que sí que se observó en los fibroblastos control no-FHIs (ni tampoco la mayor expresión de los filamentos de α -SMA), que refuerza la adhesión global de la capa células del cultivo, haciéndolos más resistentes a esfuerzo mecánicos y a estímulos apoptóticos (317). Esta falta de capacidad de adhesión y de contracción apuntaría a una incapacitación de la función en el proceso de reparación *in vivo*.

6.3.1 Los FHIs son más lábiles a estímulos pro-apoptóticos: posible mediación de la autofagia y de los mecanismos de adhesión a través de las adhesiones focales

De forma relevante también los FHIs de músculo esquelético fueron más sensibles a los estímulos pro-apoptóticos inducidos por la acción combinada del TNF α /cicloheximida (CHX). En concreto en los FHIs del TCI se analizó el grado de fosforilación de la vimentina exhibiendo una mayor fosforilación, proceso en el participa la caspasa-3 a través de la activación constitutiva de ROCK 1, que a su vez fosforila la vimentina promoviendo su despolimerización (322).

En ensayos preliminares en nuestro laboratorio, el estímulo del TNF α por sí solo no fue capaz de inducir la apoptosis en los FHIs. En diversos modelos *in vitro*, el TNF α es capaz de inducir las vías apoptóticas y las anti-apoptóticas, dependiendo del modelo celular y de la situación, gracias en parte a la intersección de las dos vías y el NFK β (366; 367; 368). Cuando aparece un desequilibrio entre ellas, se puede habilitar la inducción de las vías apoptóticas. En concreto, la CHX permite que este desequilibrio se desplace favoreciendo la apoptosis. La CHX actúa inhibiendo la síntesis proteica, bloqueando la elongación en la traducción, uniéndose al ribosoma e inhibiendo la translocación mediada por eEF2 (*eukaryotic translation elongation factor-2*) (369). La inducción combinada del TNF α /CHX da a lugar, por tanto, a la activación de las vías apoptóticas, ya que la síntesis proteica se detiene. La acción del NFK β anti-apoptótica activa la transcripción de genes anti-apoptóticos (ej. A1, A20, c-FLIP, cIAP1, cIAP1) (370) que finalmente requieren la síntesis *de novo* de proteínas para poder ejercer su función. La detención de la síntesis proteica, por tanto, evita la respuesta anti-apoptótica y habilita la apoptótica, activándose finalmente las caspasas (370). En el caso de algunas proteínas anti-apoptóticas parece ser más acentuado este efecto, como en el caso de FLIP (*Caspase 8 and FADD-like apoptosis regulator*). Este proteína anti-apoptótica ve drásticamente reducida su expresión una vez aplicado el tratamiento con CHX, revelándose como un sensor del estado celular (371; 372).

El caso particular de los FHIs de la fascia, en donde se observaron autofágicas, sugiere que la posible autofagia activada previamente en el tejido, suponga un esfuerzo no superable para los FHIs en cultivo cuando se aplica la CHX. Debido al mecanismo de acción de la CHX, este esfuerzo no superable podría actuar a través de una mayor sobrecarga en el sistema de eliminación de proteínas defectuosas (que inducirían la transcripción de genes pro-apoptóticos) y/o a la inhibición suplementaria de la traducción de genes anti-apoptóticos, que al final induciría la apoptosis (303). Un signo de la predisposición a la apoptosis, se podría inferir es que los FHIs del TCI, sin estímulo pro-apoptótico, presentaban una fosforilación de la vimentina superior. Esta fosforilación podría provenir de una actividad basal de caspasa-3 mínima debido al estrés ER (que nosotros no fuimos capaces de detectar), que despolimerizaría el citoesqueleto de vimentina. La vimentina tiene un papel importante en la estabilización de la superficie celular, teniendo la capacidad de soportar mayores grados de estrés mecánico que los microtúbulos y los microfilamentos. Además el citoesqueleto de vimentina es capaz de enfrentarse al estrés de cizallamiento (*shear stress*), incrementando su rigidez. Una mayor fosforilación-disociación de la vimentina ha sido asociada, también, a la motilidad celular (medida por Rac), y a la entrada en

la mitosis en el ciclo celular mediada por CDK1 (318). Por tanto la desestructuración del citoesqueleto de vimentina conllevaría una fragilidad más acentuada del FHIs, que fue observada remarcablemente en la preparación de los FHIs de fascia para el análisis de la ultraestructura celular. Esta fragilidad podría tener efectos perniciosos en la estructura y funcionalidad de la fascia in vivo.

Aparte de las hipótesis sobre la autofagia y su implicación en la labilidad de los FHIs frente a estímulos apoptóticos, los FHIs presentaron una adherencia inferior a los sustratos rígidos y un área de AFs/célula inferior, lo que probablemente limita las señales de supervivencia que genera la propia rigidez del sustrato mediante mecanismos de mecanotransducción (316). Y es que, de forma general el aumento de rigidez del sustrato comporta un aumento de la adhesión al sustrato, que incrementa la supervivencia y resistencia a estímulos pro-apoptóticos, además de la proliferación, y el área de la superficie celular. En este proceso de adhesión, diversos heterodímeros de integrinas de la membrana citoplasmática contactan con al sustrato en forma de mecano-sensores, reclutando en las adhesiones focales (AFs) de forma directa (ej. vinculina, talina), o indirecta (ej. paxilina, FAK), proteínas, las que a su vez se asocian con los *Rho guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) y *Rho GTPase-activating proteins* (GAPs) que regulan la actividad de las Rho-GTPasas (ej. Rac, Rho and CDC42). La actividad de las Rho-GTPasas regula el ensamblaje y el desmontaje de las adhesiones, activando vías que comportan la contracción y la polimerización de la actina, formándose pequeños filamentos y fibras de estrés. Esta contracción se realiza entre los microfilamentos de actina y la miosina II (complejos actomiosina), que necesita la fosforilación de ROCK inducida por las Rho-GTPasas (242). El sistema de adhesión celular funciona en forma de bucle, de tal manera que una célula que intenta migrar o contactar sobre un sustrato forma AFs, transmitiendo las fuerzas de tracción a través de los microfilamentos de actina asociados. La propia tensión creada y la formación de filamentos de actina, hace que su vez se formen más AFs aumentando la adhesión al sustrato, el tamaño y su diversidad en proteínas. La maduración final de la AFs finaliza en estructuras especializadas como las adhesiones supermaduras y fibrilares, estas últimas típicas de células no motiles (315; 316).

La falta de adhesión de los FHIs observada en sustratos rígidos (no funcionalizados con FN) conllevaría una disminución de las señales de supervivencia, que estaría en concordancia con la susceptibilidad incrementada a estímulos apoptóticos (TNF α /CHX), conjuntamente con la sugerida autofagia, que sería un nuevo factor pro-apoptótico a sumar. Esta falta de adhesión operaría a través de la ineficiente estructuración de AFs que pueden activar vías anti-apoptóticas, reclutando integrinas y la FAK. La asociación de la FAK con las integrinas induce la auto-fosforilación en su Tyr397 (FAK-p), que permite la asociación con la familia de las quinasas Src, y la fosforilación de residuos de tirosinas adicionales de la FAK que regulan su actividad biológica. La activación de la FAK promueve la supervivencia y el crecimiento celular a través de vías quinasa dependiente y quinasa independiente. Las vía quinasa independiente implican la cascada de señalización PI3K–AKT, PI3K–AKT/mTOR que finalmente activan factores de transcripción con acción anti-apoptótica como el NFK β y el YBX1 (*Nuclease-sensitive element-binding protein 1*). FAK-p protege delante de la apoptosis de diversos tipos, incluyendo por la

pérdida de adherencia al sustrato (*Anoikis*), y en algunos tipos de carcinoma puede promover la supervivencia independiente de adhesión al sustrato vía SRC (302; 373). FAK-p también facilita el progreso del ciclo celular, vía SCR/JNK incrementando la expresión de la ciclina D1, o mediante los incrementos de la rigidez de la MEC a través de FAK-p, p130CAS (*Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1*), Rac y RAPH (*the actin binding protein lamellipodin*), que reorganizan el citoesqueleto. De hecho Rac participa en la formación del anillo contráctil de división en las células en la mitosis, ayudando en la formación de AFs y la tensión necesaria modulando la miosina II (374). La vía quinasa independiente se activa después del estrés oxidativo (in vitro), translocándose la FAK hacia el núcleo uniéndose a MDM2-ligasa que ubiquitina p53 para su posterior degradación proteasomal, lo que hace reducir los niveles p21, inhibidor del ciclo celular, promoviendo la proliferación (375).

La capacidad de migrar superior de los FHIs también nos indicaría una posible desregulación entre la adhesión y la señal mediada por FAK-p ya que la auto-fosforilación Tyr397, independiente de la adhesión al sustrato, está elevada en otras situaciones, como por ejemplo en células cancerosas con alta motilidad e invasivas. La auto-fosforilación Tyr397 altera la dinámica del reciclaje de las integrinas facilitando la migración. En las AFs, Src se une a FAK-p Tyr397, fosforilándose el residuo de FAK-p Tyr861 que media la unión a talina y a paxilina, incrementando su actividad quinasa. Asimismo, se fosforila el residuo Tyr925 necesario para la unión con Grb2, que recluta la dinamina en las AFs. El complejo formado FAK/Grb2/dinamina activa la endocitosis de las integrinas de la AFS, facilitando el reciclaje y la migración. La defosforilación de FAK-p Tyr397 se produce después contactar con los microtúbulos con las AFs desmantelándolas. El balance de auto/de-fosforilación rige la estabilidad de las AFs. Si el reciclaje de las AFs es superior a la formación, encontramos de células de tamaño reducido. Por contra, si la formación es superior al reciclaje se desarrollan células de mayor tamaño, no motiles, como los fibroblastos control no-FHIs, y si existe un balance adecuado, más polarizado, facilita la migración (376; 245) como parece que ocurriría en los FHIs de pacientes con HI.

6.3.2 La proliferación de los FHIs es superior con una menor adhesión en sustratos rígidos

A pesar de ser más sensibles al estímulo pro-apoptótico del TNF α /CHX, una vez los FHIs fueron liberados del tejido (fascia y músculo esquelético) al cultivo celular, presentaron una proliferación muy superior a los no-FHIs. Una primera impresión, podría indicar que se trata con una contradicción con lo observado y sugerido en el tejido, respecto a los eventos de autofagia y a las características apoptóticas de la fascia HI. Siguiendo nuestra hipótesis en la que los FHIs se encuentran sometidos a un estímulo deletéreo, una vez fuera del tejido pueden verse liberados de su microentorno tisular fatal, pero todavía mantener una respuesta incrementada anti-apoptótica de supervivencia, que les permitiría proliferar de forma incrementada respecto a los fibroblastos control no-HIFs. De hecho los cultivos de FHIs no presentaban apoptosis si no se aplicaba el estímulo pro-apoptótico, al igual que los no-FHIs. Además no se encontró un incremento evidente de la actividad autofágica en los FHIs de la fascia en cultivo (si bien tenían existía una sobre-expresión de LC3- I), contraponiéndose a lo observado en el tejido, indicando una posible disminución del estrés RE en cultivo.

Resultados previos de nuestro grupo [J Guillem: <http://hdl.handle.net/10803/117381>], mediante biochips de expresión génica, mostraron que los cultivos de FHS de fascia presentaban genes diferencialmente expresados relacionados con el ciclo celular (ej. CDK1, CHI3L1). En la validación del biochip se observó que los FHS expresaban (al nivel génico y proteico) y secretaban de forma incrementada la proteína *chitinase 3-like protein* (CHI3L1). La CHI3L1 está asociada a procesos inflamatorios crónicos y de remodelación del tejido, incrementando la proliferación en los fibroblasto, con un efecto anti-apoptótico asociado. Su expresión está regulada por diversas citoquinas y factores de crecimiento, haciendo que a su vez la CHI3L1 induzca la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (377-379). Las vías señalización son poco conocidas, pero recientemente se ha asociado su acción inflamatoria a través de los receptores TLR (380), que como mencionamos anteriormente estarían relacionados con el posible papel del fibroblasto como inductor autónomo en la respuesta inflamatoria. Esto podría indicar, además, que posiblemente la acción de la CHI3L1 estarían promoviendo la proliferación de forma independiente de la adhesión al sustrato *in vitro* (remarcado por la menor área de AFs/célula), muy similar a lo observado por mediación de citoquinas en los fibroblastos sinoviales de sinovitis crónicas (381) y en células cancerosas (382). Se debería profundizar en la regulación del ciclo celular en el tejido de los fibroblastos estudiados para poder interpretar mejor los resultados obtenidos *in vitro* (si aún no lo hemos hecho es debido por una parte a las dificultades encontradas para obtener un número de células suficiente para el análisis por citometría de flujo, a partir exclusivamente de fibroblastos primarios; y por otra parte, al resultado infructuoso de utilizar un kit -Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor (*Life Technologies*)- para el estudio de la progresión del ciclo celular *in vivo* mediante técnicas inmunocitoquímicas. A pesar de que este sistema ha demostrado ser útil en diversas líneas celulares (en nuestro caso, lo hemos utilizado en fibroblastos murinos NIH-3T3), ha mostrado efectos nocivos sobre las líneas primarias de fibroblastos humanos, especialmente sobre proliferación y viabilidad celular, en las diversas concentraciones de reactivos que se han ensayado.

El estímulo deletéreo dentro del tejido, podría ser la combinación de diversos factores que se retro-alimentan entre sí. Entre ellos entre ellos la acción de las citoquinas de forma directa, y las propiedades de la MEC. La acción de las citoquinas es evitado en los fibroblastos en cultivo, al menos aparentemente (para una conclusión fehaciente se debería estudiar la acción paracrina en cultivo de las citoquinas y de la MEC producidas). En referencia a las propiedades de la MEC, en las que se podrían incluir la desestructuración de la matriz de colágeno, el patrón característico de los PGs expresado a nivel génico, y la posible pérdida de rigidez, estas podrían ser revertidas al pasar las células a un sustrato altamente rígido (1 GPa de rigidez) como la placa de cultivo/vidrio, permitiendo la supervivencia del fibroblasto.

6.4 Estudio de los fibroblastos en sustratos blandos (PDMS) in vitro

6.4.1 La rigidez del sustrato modifica el fenotipo de los fibroblastos del TCI de forma diferencial en los FHIs

Los resultados obtenidos en la fascia y el músculo de los HI en torno a la desestructuración del tejido, la posible alteración en la deposición de la ME (y de ciertos PGs), y el fenotipo diferencial de los cultivos primarios de fibroblastos en sustratos rígidos, sugería una posible alteración de la rigidez de la MEC de ambos tejidos. Por otro lado, la rigidez de la MEC es uno de los factores que puede modular el comportamiento celular (383). De este modo, como primer paso para el estudio de la mecanotransducción en estas células, decidimos estudiar el efecto de la rigidez del sustrato en los fibroblastos del TCI en cultivo mediante el uso de sustratos comercializados de PDMS regulados para diferentes valores de rigidez con el fin de comprender mejor la interrelación existente entre el entorno físico de estas células y la señalización intracelular, y así avanzar en revelar los mecanismos que rigen el desarrollo de la HI. Valoramos la estructura del citoesqueleto, los valores de proliferación y la potencial inducción de muerte celular por mecanismos de apoptosis o necrosis a baja rigidez.

En el estudio del comportamiento de los fibroblastos derivados del TCI de músculo esquelético en sustratos de PDMS a diferentes rigideces funcionalizados con fibronectina (FN), se pudo observar que el incremento en los valores de rigidez provocaba un aumento de la superficie celular, del área de las AFs/célula (y también su área individual). La proliferación de los fibroblastos control no-FHIs fue superior o igual en todas las rigideces, invirtiendo lo que previamente se había observado en las placas de poliestireno y de vidrio. En los no-FHIs la introducción de la FN en el material de referencia de vidrio (Glass) incremento el índice de proliferación casi 2 veces, en cambio en los FHIs no se apreció ningún incremento. De hecho, a pesar de que los FHIs mostraron un incremento mayor del área de AFs/célula (y su área individual), de fibras de estrés y geodomas, ni el efecto pro-proliferativo de la FN (384) ni las diferentes incrementos en los valores de rigidez (375), aumentaron la proliferación de los FHIs observada en vidrio (glass). Esto sugiere un posible desacoplamiento entre la adhesión al sustrato y la señal de proliferación en los FHIs, ya sugerida previamente en los estudios realizados en presencia de sustratos rígidos.

La capacidad de formar más AFs y todo el sistema contráctil de actina asociado, en presencia de fibronectina en los sustratos, sugería que en los FHIs los receptores de membrana que reconocen a la FN e integran su señal (385), podrían estar sobre-expresados. En este sentido, no en los FHIs del músculo, pero si en el tejido de la fascia se observó un incremento en la expresión génica del sindecano-4, muy probablemente de los fibroblastos debido a que es la célula mayoritaria en la fascia. El sindecano-4 y el dímero $\alpha 5\beta 1$ de integrinas se unen conjuntamente a la FN, mediando la expansión del área celular, la proliferación, y la capacidad de contracción de la MEC, a través de FAK y la Rho GTPasa (384). Una de las funciones del sindecano-4 (que carece de actividad enzimática) es facilitar la interacción de la FN con las integrinas, además de reclutar proteínas adaptadoras y con actividad enzimática para la señalización (384). Asimismo en condiciones inflamatorias los

fibroblastos incrementan la expresión de integrinas de diferente tipo mediada por citoquinas (386). Si extendemos la sobre-expresión del sindecano-4, a los FHIs de músculo, podemos realizar la hipótesis que la sobre-expresión de sindecano 4 y las integrinas $\alpha 5\beta 1$ en los fibroblastos del tejido, se mantendría in vivo. Esta hipótesis podría ayudar a explicar el incremento del área de AFs/célula y la estructuración superior de la actina. Para confirmar esta hipótesis, necesitaríamos estudiar la expresión proteica de las integrinas y de sindecanos y su localización en el tejido e in vitro.

6.4.2 Los FHIs no incrementan la proliferación con el aumento de la rigidez

El hecho de que a pesar que los FHIs tengan aparentemente las vías de supervivencia activadas -sugerido a través de la formación de AF-, y esto no se refleje una proliferación comparable a los no-FHIs, podría indicar algún tipo de mecanismo que este interfiriendo. En los FHIs de fascia se observaron eventos de autofagia con formación de autofagolisosomas, probablemente causada por el estrés ER, indicando ser uno de los posibles candidatos para frenar la proliferación, también en los FHIs del TCI.

La autofagia constitutiva (no patológica) participa en la regulación del ciclo celular, y en la estabilidad genómica. En situaciones de privación de nutrientes, estrés oxidativo e hipoxia causa el enlentecimiento del ciclo celular, y finalmente la parada en G1 (para entrar G0), y G2/M. En el caso de la privación, la autofagia ayuda a superar esta privación suministrando los aminoácidos (del procesamiento de orgánulos y proteínas) necesarios para la síntesis proteica en la división celular y citoquinesis, permitiendo la progresión del ciclo celular. Si la autofagia no realiza esta función de forma adecuada, causa un retraso permanente del ciclo celular, provocando divisiones nucleares aberrantes, con crecimiento celular disminuido, y un crítico aumento de la frecuencia de aneuploidías afectando a la viabilidad celular (387).

En células de glioma, mediante la inducción de un agente anti-tumoral (resveratrol), la autofagia se halló involucrada en el arresto en S-G2/M del ciclo celular, y en la apoptosis. De forma directa la autofagia era capaz de modular el ciclo celular regulando los niveles de las ciclinas A y B. A pesar de que el resveratrol inducía la apoptosis incrementando Bax (Apoptosis regulator BAX; agente pro-apoptótico) y la activación de la caspasa-3, lo hacía de forma residual, debido al efecto protector anti-apoptótico dominante mediado por la autofagia. Los autores argumentaban que los efectos en el ciclo celular, la apoptosis y la autofagia, estarían relacionados entre sí por el daño mitocondrial, ya que la autofagia de las mitocondrias dañadas (mitofagia) frenaría la apoptosis, pero al mismo tiempo, la reducción de las mitocondrias (debido al déficit energético y el incremento de p21, mediado por el aumento del estrés oxidativo) retrasaría la progresión del ciclo celular (388). De este modo, cualquier impedimento del desarrollo adecuado de la autofagia condenaría a la célula a la muerte. Esta función anti-apoptótica de la autofagia está limitada en el tiempo y por la magnitud, ya que si se mantiene, y/o es de gran intensidad provoca la muerte celular autofagocítica (389), y mediante la transcripción de los factores ATF4 y CHOP induce la apoptosis (303) (343). Esta descripción podría coincidir con lo observado en los FHIs del

tejido de la fascia, en donde la proliferación celular podría estar inhibida y al mismo tiempo la apoptosis-autofagia incrementada.

De forma remarcable, un análisis en proceso en nuestro grupo muestra que un cierto porcentaje de los FHIs sufren enlentecimiento en la mitosis, con una segregación aberrante cromosómica en la anafase, en placa de poliestireno, que podría afectar a la estabilidad genómica. Esta inestabilidad genómica tienen el potencial de afectar globalmente a los cromosomas con aneuploidías, y también facilitando la adquisición de mutaciones que promuevan el crecimiento descontrolado. La mitosis prolongada provoca la activación de las vías de apoptóticas mediante la permeabilización del citocromo c desde las mitocondrias, que activa la cascada de las caspasas, a su vez activando la ADNasa CAD (mediante la proteólisis de su inhibidor ICAD), degradando el ADN cromosómico. En ciertos casos de mitosis levemente prolongadas, se ha descrito leves liberaciones de citocromo c (sin activar de forma total las caspasas), provocando algunas roturas en el ADN, dañándolo sin proceder la muerte celular. Este evento podría llevar a la transformación celular, una vez reparado el ADN, que podrían escapar de los controles del ciclo celular (390). Por el contrario, las células hijas no-transformadas de células que no han sufrido transformaciones, pero si daño cromosómico, son arrestadas en G1. En otros eventos de la mitosis como la formación de los cromosomas merotéticos (i.e cuando un único cinetocoro de un cromosoma está unido a microtúbulos proveniente de más de polo) y la citoquinesis, también se han postulado como mecanismos de generación de daño en el ADN, por la tensión que ejerce sobre él (390).

En nuestro caso, la mitosis prolongada en los FHIs, en la que podría participar la autofagia, los haría más lábiles a estímulos pro-apoptóticos en el cultivo primario, ya que posiblemente existiese alguna liberación basal de citocromo c. Además la posible inestabilidad genómica generada, podría ayudar a explicar la proliferación independiente de la adhesión al sustrato, y por extensión, los eventos de reparación del DNA (indicados por el PCNA) y apoptosis encontrada en la fascia y el TCI del músculo esquelético.

6.4.3 Los FHIs son más lábiles a la apoptosis en sustratos de baja rigidez

Los FHIs también fueron más lábiles frente al estímulo apoptótico que supone la disminución de la rigidez en sustratos de PDMS-FN. Los FHIs a pesar de presentar un mayor área de AFs/célula y un citoesqueleto (vimentina y actina) más estructurado en el rango de rigidez de 5 kPa-100 kPa, el cambio a una rigidez de 2 kPa produjo un brusco cambio fenotípico pro-apoptótico en los FHIs. El área AF/célula (y el área de las AFs individual), disminuyó de forma dramática equiparándose a los no-FHIs. De hecho los FHIs a la rigidez de 2 kPa, mostraron menos fibras de estrés, más células sin ningún tipo de filamento de actina, y sobre todo la presencia de microfilamentos periféricos poco definidos (peripheral actin bundling) y células con aparente pérdida de adherencia. Al igual que cuando aplicamos el estímulo pro-apoptótico con el TNF α /CHX, unos de los factores que podría colaborar sería la posible autofagia presente en los FHIs, dificultando o excediendo los mecanismos de supervivencia en un sustrato poco rígido que genera pocas señales de supervivencia a la célula.

Las señales de supervivencia proporcionadas mediante las AFs, disminuyen al disminuir la rigidez del sustrato con lo que llegaríamos al lindar en donde los estímulos pro-apoptóticos superarían a los anti-apoptóticos habilitando la apoptosis. La disminución de la rigidez puede disminuir la auto-fosforilación de la FAK (menos formación de AFs y de fibras de estrés) inhibiendo las vías de supervivencia mediadas por ERK1/2, la actividad transcripcional y la condensación de la cromatina, conduciendo a la célula a la apoptosis (245). En el caso de los FHIs sería posiblemente más crítico, debido a la actuación de la posible autofagia y de sus mecanismos pro-apoptóticos ya activados, descritos anteriormente. Además la falta de rigidez del sustrato podría afectar más críticamente a la segregación de los cromosomas de los FHIs, como ya se observó en sustratos rígidos, disminuyendo la actividad GTPasa de Rac-1, implicada en la citoquinesis celular (244), activando las vías apoptóticas de los puntos de control del ciclo celular.

La mayor sensibilidad de los FHIs al estímulo apoptótico de la baja rigidez del sustrato, fue acompañado de una disminución de la proliferación, más acentuada que en FHIs que en los no-FHIs, y que podría inferirse de la falta de adhesión al sustrato (y de presencia de AFs) que genera la respuesta de supervivencia. Adicionalmente, se ha evidenciado también recientemente que el núcleo puede integrar las señales mecánicas de rigidez del sustrato a través del citoesqueleto de los filamentos intermedios del citoplasma (ej. vimentina) y del núcleo (lamina). A baja rigidez, mediante este mecanismo, se ha descrito que se mantiene la cromatina condensada (eucromatina) inhibiendo la actividad deacetilasa y protegiendo el DNA. Esto permite a la célula sobrevivir en un sustrato que no permite una buena adhesión, pero sin proliferar (o incluso entrando en quiescencia) (247), que podría otro mecanismo que ayudaría a explicar la disminución más dramática de la proliferación en los FHIs.

6.4.4 La actividad MMP 2 y -9 es regulada por la rigidez del sustrato de forma diferencial en los FHIs

Los resultados obtenidos indicarían que los FHIs respondían de forma proporcional al incremento de la rigidez del sustrato con el aumento de la actividad gelatinasa secretada MMP-2 y MMP-9 en los medios condicionados. Esto fue sobre todo muy evidente para la actividad MMP-9 en los FHIs, la cual mostró actividades incrementadas en todos los sustratos en comparación con los valores observados a partir de los medios condicionados por los fibroblastos control no-FHIs. El incremento de la actividad MMPs es característico de fibroblastos de diferente origen cuando se ven estimulados mediante TNF α y otras citoquinas in vitro. De hecho la MMP9 se ha descrito que la actividad MMP9 se puede incrementar hasta 100 veces, mientras que la actividad MMP2 lo hace modestamente (347).

La sobre-expresión (y la actividad) de las MMPs en fibroblastos está asociada a condiciones patologías inflamatorias (200; 201), y en procesos cancerosos, en los fibroblastos asociados al área tumoral (cancer-associated fibroblast o CAF) (391), en donde la remodelación tisular y la fibrosis son procesos continuos sin fin. Así también la rigidez puede mediar la síntesis y actividad MMP-9 y MMP-2. Un estudio in vitro demostró que fibroblastos cardiacos de pollo aumentaba la actividad secretada de MMP-2 y MMP-9 a rigideces altas-

extremas crecientes entre 46-1000 kPa, en sustratos 2D de PDMS sin funcionalizar con FN (392). Por otro lado estudios in vitro con fibroblastos sinoviales humanos a muy baja rigidez entre 0.1-6.4 kPa demostraban, también un incremento de la actividad secretada MMP-2 y MMP-9 (393). En el primer estudio se asociaba a este incremento a fenómenos fibróticos, y en el segundo a fenómenos de invasividad de fibroblastos en heridas o células tumorales. Ambos estudios a pesar de parecer contradictorios serían complementarios, ya que muy posiblemente existan mecanismos de regulación que a rigideces extremas –bajas y altas- respondan a las necesidades del tejido. Nuestro estudio abarca de 2 kPa-100 kPa (rango entorno al teórico del músculo de 10-30 kPa) (323) con lo que nuestros resultados estarían, en concordancia con el primer estudio.

Por otro lado, de forma interesante, la unión a la FN incrementa la secreción de la MMP-2 y MMP-9 en células normales y tumorales, mediada por FAK. El mecanismo mejor estudiado es el de la MMP-9, que en estudios recientes in vitro en una línea celular de cáncer de mama, implicaba la vía de señalización $\alpha 5\beta 1$ integrina/FAK-PI3K-ERK (394). Por tanto, el incremento de la actividad secretada de MMP-9 en los FHIs, podría ser el resultado del incremento de rigidez y de la presencia de FN en el sustrato. Además, al tener los FHIs una mayor área de AFs/célula sugeriría que la causa primordial que hace que tengan una actividad incrementada sería la unión a la FN, y la trans-señalización posterior mediada por las integrinas/FAK-p. En el caso de la MMP2 parece mediar algún otro factor adicional, ya que si bien la FN incrementa la actividad, esta lo hace prácticamente por igual en los dos grupos a estudio. Lo que si se observa es que existe un incremento de la actividad MMP-2 secretada, con un incremento de la rigidez. Se deberían realizar estudios del mecanismo del incremento de secreción-activación de la dos MMPs para poder comprender mejor la causa de estas diferencias entre las 2 MMPs.

La capacidad que tiene el sustrato de modificar el fenotipo de los fibroblastos es una oportunidad de mejora en el diseño de biomateriales y prótesis, tanto el caso de la HI como en el caso de otras patologías. En nuestro estudio se pone de manifiesto que mediante la rigidez del sustrato y su funcionalización, podemos pasar de un fibroblasto apoptótico a uno con características (patológicamente) de remodelación aumentada sobre-expresando MMPs. El diseño adecuado de las prótesis podría modular el fenotipo con el objetivo de rescatar aquellos fibroblastos afectados y al mismo tiempo proteger a aquellos que no lo están, permitiendo la correcta función reparadora y mejorando el pronóstico de la patología. Por extensión, los resultados in vitro podrían reflejar los observados in vivo, con una rigidez disminuida que incrementase la apoptosis y disminuyese la proliferación de los FHIs, y con una actividad MMP-9 incrementada. Esta actividad incrementada podría ser debida también a una extrema baja rigidez y/o a la estimulación por citoquinas. Esta falta de estrés mecánico también se ha visto in vitro que puede disminuir la proliferación en fibroblasto de la línea alba de rata, así como también afectar a la orientación y la capacidad de contracción de las fibras de colágeno por parte de los fibroblasto (252).

La reveladoras evidencias sobre la HI remarcan que su reparación tendría que tener en consideración el estado inicial celular del tejido, para el éxito de esta. Si no es así, la aparición de la HI sería una cuestión de tiempo, dependiendo de la magnitud de la afectación. Las recidivas (ejemplo del continuo fracaso de la reparación) sería el claro ejemplo de cómo el estímulo deletéreo activado en la primera intervención, y que se repitió diversas veces, empeoró el estado del tejido y agravó la patología. La hipótesis de la autofagia como posible nuevo mecanismo desencadenante y amplificador después del primer estímulo generado por la laparotomía, permitiría observar si el resto de comorbilidades asociadas a la HI (ej. obesidad, diabetes, enolismo, malnutrición), activan o utilizan este mecanismo para colaborar con el desarrollo de la HI. De forma interesante, en fases preliminares de nuestro estudio se realizaron cultivos primarios de fibroblastos obtenidos de pacientes no afectados por la HI, pero si afectados por diabetes, COPD y patologías auto-inmunes, y estos presentaban un fenotipo equiparable al observado a los FHIs: más proliferantes, menor área celular y adhesión al sustrato, y más actividad MMPs. Esto indicaría que las comorbilidades podrían actuar sensibilizando el tejido frente a la laparotomía, de forma que el fibroblasto por falta de capacidad de respuesta o por vías de señalización deletéreas que afectaron al fibroblasto previamente a la cirugía, no podría realizar su función adecuadamente (Figura 57).

Por otro, lado las alteraciones estructurales y moleculares (cambio de isoforma de la MyHC) en el músculo IH, acompañado del componente inflamatorio, nos indicarían un nuevo papel del músculo en el desarrollo de la HI. Él músculo podría actuar como instigador de una patología inflamatoria de baja intensidad crónica afectando al propio musculo, y muy probablemente también a la fascia. Las características contráctiles de miofibras podrían ser adquiridas a partir de la laparotomía, o al igual que en la hipótesis de la autofagia, ya presentes en los pacientes de forma silente. El estudio de los dos tejidos en los IH sugiere una acción conjunta que favorecería la HI, apuntado posibles mecanismos celulares y moleculares que deberían ser detallados para la mayor comprensión de la patología y mejora del tratamiento.

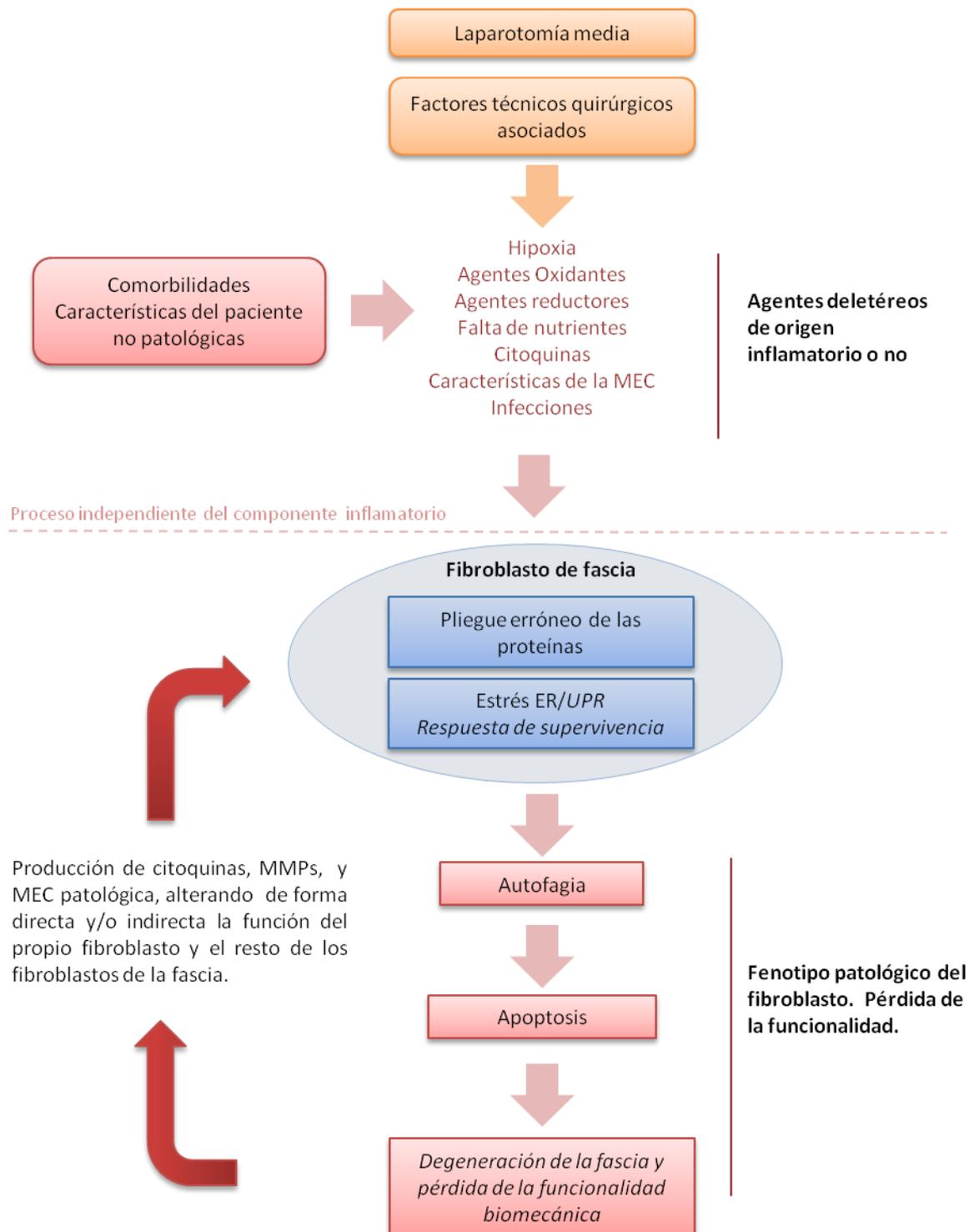


Figura 57. Esquema de la hipótesis sobre el papel de la autofagia en el fibroblasto como mecanismo inductor del inicio y desarrollo de la hernia incisional. En una primera fase los estímulos deletéreos de los factores de riesgo técnicos, comorbilidades y característica intrínsecas del paciente, cursarían a través de mecanismos celulares y moleculares, comunes algunos de ellos, induciendo al fibroblasto a la respuesta de estrés RE y UPR (*unfolded protein response*). En una segunda fase, sin la presencia del componente inflamatorio (de forma diferida en el tiempo respecto al momento de la cirugía), una vez superada las capacidades de la UPR y la autofagia, se produciría la inducción del fenotipo patológico del fibroblasto, y finalmente la muerte por apoptosis de estos. Este fenotipo patológico del fibroblasto, conduciría a la degeneración del tejido, de forma autónoma sin la presencia de componente inflamatorio, debilitando la pared abdominal.

7 Conclusiones

A partir del presente estudio, centrado en el nicho conectivo local con la perspectiva de una biología de la hernia, en el que hemos comparado muestras peroperatorias humanas derivadas de tejidos de la pared abdominal (fascia y músculo esquelético) de pacientes con historia de HI y pacientes control, y de acuerdo con los objetivos planteados en este proyecto de Tesis Doctoral, podemos concluir lo siguiente:

1. Bajo un **PRIMER OBJETIVO DE CARACTERIZACIÓN TISULAR**, y teniendo en cuenta los pacientes estudiados y las técnicas empleadas, concluimos que:
 - 1.1. Son cambios comunes a la fascia y al músculo esquelético de la HI, la presentación de alteraciones de tipo degenerativo con pérdida de estructura y morfología, acompañados de cambios cuantitativos y cualitativos en diversos componentes de la MEC, que en última instancia podrían ser responsables de la pérdida funcional y biomecánica de la pared abdominal y su eventual ruptura.
 - 1.2. Son cambios comunes a la fascia y al músculo esquelético de la HI, una mayor deposición de PGs/GAGs, a juzgar por la tinción con azul alcian, asociada a alteraciones en la expresión génica de diferentes (isoformas de) PGs, de acuerdo con un perfil específico para cada tejido. Los cambios son compatibles con los observados en procesos de inflamación (crónica). El análisis de los resultados mediante el método estadístico de PCA segrega los pacientes afectados por HI de los que no lo están, señalando que el perfil de expresión del núcleo proteico de los PGs podría ser considerado como un potencial y nuevo marcador biológico útil para el diagnóstico o el pronóstico de la patología.
 - 1.3. Son cambios comunes a la fascia y al músculo esquelético de la HI, la observación de índices de TUNEL aumentados, asociados a un aumento de la caspasa-3 activada (así como de su firma de procesamiento), compatibles con la inducción *in situ* de mecanismos de apoptosis (en el caso del músculo, estos procesos apoptóticos se encuentran asociados tanto a las miofibras como al tejido conectivo intramuscular). La fragmentación observada de los componentes del citoesqueleto informa de un proceso dinámico de disrupción celular. Destaca la elevada proteólisis de la vimentina junto a unos niveles altos de vimentina soluble y fosforilada en la HI.
 - 1.4. Son cambios comunes a la fascia y al músculo esquelético de la HI, los niveles aumentados de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) sin un aumento paralelo de Ki-67⁺, lo que hace pensar en la activación de mecanismos de reparación del ADN sin compensación eficaz al nivel de la proliferación celular. En músculo se observaron también unos índices ligeramente elevados de Bcl-2.
 - 1.5. Son cambios propios de la fascia de la HI, una disminución de la densidad de células del estroma (fibroblastos), la ausencia de infiltrados inflamatorios, y niveles elevados de LC3-II asociado a membranas y un aumento de la relación LC3-II/LC3-I, compatible con la activación de procesos de

autofagia (desconocemos si estos cambios relacionados con la autofagia se producen también en el músculo esquelético, ya que no han sido aquí investigados).

- 1.6. Son cambios propios del músculo esquelético de la HI, la presentación simultánea de alteraciones degenerativas/regenerativas, la hiper celularidad en el TCI, la presencia de pequeños cúmulos de infiltrados inflamatorios discretos y localizados, y la conmutación del tipo de fibras musculares asociado a cambios en el patrón de diferentes isoformas de las cadenas pesadas de la miosina.
2. Bajo un **SEGUNDO OBJETIVO DE CARACTERIZACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS PRIMARIOS**, y teniendo en cuenta los pacientes estudiados y las técnicas empleadas, concluimos que:
 - 2.1. Son cambios comunes a los fibroblastos primarios de fascia y de músculo esquelético de la HI, la adquisición *in vivo* de un fenotipo diferencial que se mantiene en condiciones de cultivo a lo largo de diferentes pases, y que afecta a procesos celulares fundamentales. Destaca la reducción del tamaño celular, el aumento de las tasas de proliferación y migración celular, la disminución de la fuerza de adhesión, paralelos a una red citoesquelética alterada, una disminución de fibras de estrés positivas para alfa-actina de músculo liso (α -SMA), y la presencia de contactos focales pequeños.
 - 2.2. Son cambios comunes a los fibroblastos primarios de fascia y de músculo esquelético de la HI, una sensibilidad incrementada a estímulos pro-apoptóticos. Estos cambios pueden ser debidos a una desorganización del citoesqueleto celular que induciría la fragilidad celular, y a otros factores propios del propio microentorno tisular (i.e., activación extrema de enzimas de degradación como las MMPs u otras alteraciones de la MEC).
 - 2.3. Son cambios propios de los fibroblastos primarios de fascia de la HI, la presencia de cambios ultra-estructurales, y otras características compatibles con procesos autofágicos y lisosomales comprometidos (desconocemos si estos cambios relacionados con la ultraestructura y la autofagia se producen también en los fibroblastos primarios del músculo esquelético, ya que no han sido aquí investigados).
 - 2.4. Son cambios propios de los fibroblastos primarios del TCI del músculo esquelético, la manifestación de respuestas diferenciales en función de si han sido cultivados en condiciones de confluencia o de no confluencia. Los cambios difieren entre los fibroblastos con HI y control.
 - 2.5. La autofagia es un aspecto nuevo en el campo de la HI. Podría contribuir a la muerte celular observada, y/o representar una ventaja para la supervivencia celular durante la pérdida de contacto con la MEC. La susceptibilidad aumentada a los estímulos apoptóticos (consistente con los hallazgos encontrados

al nivel tisular *ex vivo*, lo que sugiere que puede ser un fenómeno relevante *in vivo*) puede ser indicativa de un daño inicial al ADN superior en la HI respecto al control, o bien a alteraciones en su capacidad de reparación o de hacer frente mecanismos lesivos.

2.6. Estos cambios podrían estar ya activados antes de la cirugía (i.e., a causa de las comorbilidades asociadas), y/o ser debidos a una característica intrínseca, silente, del paciente, sensibilizando frente a la cirugía, lo que podría ayudar a explicar el grupo de pacientes que desarrollan la patología al cabo de diversos años después de la laparotomía. El estado inicial del tejido, por tanto, sería un factor significativo a considerar tanto en la primera cirugía aplicada como en las recidivas, para poder aplicar posibles tratamientos preventivos, incluido el uso de prótesis.

3. Finalmente, bajo un **TERCER OBJETIVO DE CARACTERIZACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO** en presencia de sustratos de rigideces controladas, y teniendo en cuenta los pacientes estudiados y las técnicas empleadas, concluimos que:

3.1. Cambios en la en la rigidez del sustrato son suficientes para provocar alteraciones fenotípicas y funcionales en los fibroblastos primarios estudiados, confirmando que la modulación de la rigidez del sustrato permite una aproximación *in vitro* al estudio de determinados aspectos de la fisiología de fibroblasto (como por ejemplo, el estudio de mecanismos de mecanotransducción) al simular, al menos en parte, los cambios de rigidez del microentorno tisular afectado.

3.2. La respuesta a los cambios de rigidez del sustrato difiere entre fibroblastos primarios derivados de pacientes con HI y fibroblastos primarios derivados de pacientes control, traducándose en un cambio de fenotipo en la morfología celular, en las características de las adhesiones focales (AFs) y del citoesqueleto de actina y vimentina, y en los patrones de secreción de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). A su vez, se observan cambios en los niveles de proliferación celular (en general, el aumento de rigidez tiende a incrementar la proliferación celular; los cambios discretos en los valores de rigidez afectan especialmente a los fibroblastos control). Finalmente, los fibroblastos de HI resisten peor la exposición a valores de baja rigidez del sustrato respondiendo con signos de un incremento en los valores de muerte celular por necrosis y apoptosis.

3.3. Esta modulación del fenotipo por la acción de sustratos con valores de rigidez controlados es interesante, ya que potencialmente podría ayudar a rescatar a los fibroblastos con un fenotipo patológico, mediante el diseño de prótesis con rigideces (y funcionalizaciones) adecuadas, y así contribuir a mejorar la reparación del defecto y la prestación funcional de la pared abdominal en su conjunto.

En resumen, nuestros datos aportan evidencias indirectas pero convincentes de que el microentorno de la MEC local puede influenciar el desarrollo de la HI. La atrofia y la dismorfología pueden ser un agente activo, al mediar señales de transducción que afecten la supervivencia celular, el fenotipo funcional y (probablemente) la expresión génica. También identifican a los fibroblastos y la fragilidad celular como agentes activos en la HI. El daño a los fibroblastos puede ocasionar la muerte celular patológica en forma de apoptosis o autofagia, que provoca la auto-digestión celular. El cúmulo de fibroblastos proclives a la muerte celular dificulta el mantenimiento de la estructura y función normales del tejido y aumenta la destrucción tisular en contextos de baja proliferación celular. A nuestro parecer, estos hallazgos pueden ser relevantes ya que ayudan a identificar nuevos actores en el proceso HI, tal y como sucederían in vivo, y aportan información para poder definir nuevas dianas que podrían ayudar a diferentes niveles, como: a.- una (nueva) mejor identificación y estratificación de pacientes; b.- mejorar los resultados clínicos actuales incidiendo en el diagnóstico precoz, la prevención y el tratamiento; y también c.- contribuir a adaptar el diseño de biomateriales para mejorar el rendimiento clínico, basándose en la investigación translacional y la innovación, para que coincidan con los tipos de tejidos y estados de enfermedad específicos.

8 Bibliografía

1. *Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia.* **Burger JW, Luijendijk RW, Hop WC, Halm JA, Verdaasdonk EG, Jeekel J.** Ann Surg. 2004 Oct;240(4):578-83; discussion 583-5.
2. *Abdominal wall hernia.* **Park AE, Roth JS and Kavic SM.** 2006, Curr Probl Surg, pp. 43: 326-375.
3. *Open surgical procedures for incisional hernias.* **Den Hartog D, Dur AHM, Tuinebreijer WE, Kreis RW.** Issue 3, 2008, Cochrane Database of Systematic Reviews.
4. *Incisional hernia – How do I do it? Standard surgical approach.* **Conze J, Binnebösel M, Junge K. Schumpelick V.** 2010, Chirurg , pp. 81:192–200.
5. *Incisional hernia after upper abdominal surgery: a randomised controlled trial of midline versus transverse incision.* **Halm J A, Lip H, Schmitz P I, Jeekel J.** Hernia. 2009; 13:275–280.
6. *Have outcomes of incisional hernia repair improved with time? A population-based analysis.* **Flum DR, Horvath K, Koepsell T.** 2003, Ann Surg 237:129-135.
7. *Progressive preoperative pneumoperitoneum in patients with giant hernias of the abdominal wall.* **López Sanclemente MC, Robres J, López Cano M, Barri J, Lozoya R, López S, Vasco MA, Buqueras MC, Subirana H, Jorba R.** Cir Esp. 2013 Aug-Sep;91(7):444-9. doi: 10.1016/j.ciresp.2012.08.004. Epub 2013 Mar 6.
8. **Gomez A, del Villar JL, Pérez García A.** Balibrea Cantero JL. Tratado de Cirugía. Hernias. Primera edición. s.l. : Ediciones Toray, S.A, 1989, Vol. II, Capítulo XVI, p. 1854.
9. *The Biology of Hernia Formation.* **Franz, M G.** Surg Clin North Am.2008; 88(1): 1–vii.
10. *Classification of primary and incisional abdominal wall hernias.* **F. E. Muysoms, M. Miserez, F. Berrevoet, G. Campanelli, G. G. Champault, E. Chelala y U. A. Dietz, H. H. Eker, I. El Nakadi, P. Hauters, M. Hidalgo Pascual, A. Hoferlin, U. Klinge, A. Montgomery, R. K. J. Simmermacher, M. P. Simons, M. Smietanski, C. Sommel.** Hernia (2009); 13:407–414.
11. *Factors influencing the development of incisional hernia. A retrospective study of 2,983 laparotomy patients over a period of 10 years.* **Höer J, Lawong G, Klinge U, Schumpelick V.** 2002 May, Chirurg, pp. 73(5):474-80.
12. *Burst abdomen and incisional hernia: a prospective study of 1129 major laparotomies.* **Bucknall T E, Cox P J, Ellis H.** 1982, British medical journal , p. Vol. 284 27 March .
13. *Incisional Hernia. Pathogenesis, Presentation and Treatment.* **Schumpelick V, Junge K, Klinge U, Conze J.** Dtsch Arztebl 2006; 103(39): A 2553–8.
14. *Hernia: Is It a Work-Related Condition?* **Kang S, Burnett C A, Freund E, Sestito J.** 1999, American Journal of Industrial Medicine , pp. 36:638-644.
15. *Enfermedad herniaria en el ámbito sociolaboral marítimo.* **Pacheco García JM, Mayo Ossorio MA , Lazuén Alcón A, Ortiz Acero I.** 2000, Cir Esp, pp. 67:358-62.
16. *Normal intraabdominal pressure in healthy adults.* **Cobb WS, Burns JM, Kercher KW, Mathews BD, Norton HJ, Heniford BT.** 2005, J Surg Res, pp. 129:231-5.

17. *An alternative classification of incisional hernias enlisting morphology, body type and risk factors in the assesment of prognosis and tailoring of surgical technique.* **Dietz UA, Hamelmann W et al.** 2007, J Plast Reconstruct Aesthet Surg, pp. 60: 383-388.
18. *Demographics and socioeconomic aspects of hernia repair in the United States in 2003.* **Rutkow, IM.** Surg Clin North Am, pp. 83: 1045-51.
19. *Cost-Effectiveness of Primary Abdominal Wall Hernia Repair in a 364-bed Provincial Hospital of Spain.* **De Miguel Ibañez R et al.** 2009, Departamento de Análisis Económico y Finanzas. Universidad Castilla-La Mancha. ISSN: 1989-4856.
20. *Cirugía Ambulatoria: impacto potencial en los hospitales.* **Casas M.** Barcelona 1992 : Cirugia ambulatoria, pp. 67-72.
21. *Aspectos clínicos y organizativos de la Cirugía Mayor Ambulatoria.* **Jiménez A.** 2000, El Médico , pp. 64-70.
22. **Alvarez J, Porrero J L, Dávila D.** Impacto asistencial, económico y social de la cirugía sin ingreso de las hernias parietales. [aut. libro] Sierra Gil E. *Guías clínicas de la sociedad española de cirujanos.* s.l. : Ed. Arán, 2002, 27.
23. *Ahorro económico por disminución de la incapacidad temporal con programas de Cirugía Mayor Ambulatoria. Estudio multicéntrico.* **Revuelta Álvarez et al.** 1997, Cir Esp, pp. 61:167-170.
24. *Cirugía de la pared abdominal.* S Morales Conde, SA (2ªEd). Ediciones Aran 2013. ISBN 2ªed. 978-84-92977-44-4.
25. **MINISTERIO DE SANIDAD CONSUMO.** *Manual. Unidad de Cirugía Mayor Ambulatoria. Estándares y recomendaciones.* 2005.
26. *The biology of hernias and the abdominal wall.* **Franz MG.** Hernia. 2006; 10:462-471.
27. *Interactive relationship between basement-membrane development and sarcomerogenesis in single cardiomyocytes.* **Yang H, Borg TK, Liu H, Gao BZ.** Exp Cell Res. 2015 Jan 1;330(1):222-32. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.020. Epub 2014 Aug 21.
28. *MMPs/TIMPs and inflammatory signalling de-regulation in human incisional hernia tissues.* **Guillen-Marti J, Diaz R, Quiles MT, Lopez-Cano M, Vilallonga R, Huguet P, Ramon-y-Cajal S, Sanchez-Niubo A, Reventós J, Armengol M, Arbos MA.** J Cell Mol Med. 2009 Nov-Dec;13(11-12):4432-43. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00637.x. Epub 2008 Dec 29.
29. **Lindner HH.** Clinical anatomy. 1989, pp. 283-295.
30. **Thomas CL, Taber CW.** *Taber's cyclopedic medical dictionary.* s.l. : Philadelphia: F.A. Davis Co., 1985.
31. *Skin structure and surgical anatomy.* **Robinson JK, Hanke WC, Sengelmann R, Siegel D.** [ed.] Mosby. s.l. : Elsevier, 2005, p. 4.
32. *Fascia research--a narrative review.* **Findley T, Chaudhry H, Stecco A, Roman M.** J Bodyw Mov Ther. 2012 Jan;16(1):67-75. doi: 10.1016/j.jbmt.2011.09.004.
33. *Fascia Research Congress evidence from the 100 year perspective of Andrew Taylor Still.* **Findley TW, Shalwala M.** J Bodyw Mov Ther. 2013 Jul;17(3):356-64.
34. *The fascia of the limbs and back--a review.* **Benjamin M.** J Anat. 2009 Jan;214(1):1-18.

35. *Ultrasound evidence of altered lumbar connective tissue structure in human subjects with chronic low back pain.* **Langevin HM, Stevens-Tuttle D, Fox JR, Badger GJ, Bouffard NA, Krag MH, Wu J, Henry SM.** BMC Musculoskelet Disord. 2009 Dec 3;10:151. doi: 10.1186/1471-2474-10-151.
36. *Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems.* **Ingber DE, Wang N, Stamenovic D.** Rep Prog Phys. 2014 Apr;77(4):046603.
37. *What is 'fascia'? A review of different nomenclatures.* **Schleip R, Jäger H, Klingler W.** J Bodyw Mov Ther. 2012 Oct;16(4):496-502. doi: 10.1016/j.jbmt.2012.08.001. Epub 2012 Aug 22.
38. *Tensegrity and mechanoregulation: from skeleton to cytoskeleton.* **Chen CS, Ingber DE.** Osteoarthritis Cartilage. 1999 Jan;7(1):81-94.
39. *Detail microscopic analysis of deep fascia of lower limb and its surgical implication.* **Bhattacharya V, Barooah PS, Nag TC, Chaudhuri GR, Bhattacharya S.** Indian J Plast Surg. 2010 Jul;43(2):135-40. doi: 10.4103/0970-0358.73424. PubMed PMID: 21217969.
40. *Sensory innervation of the thoracolumbar fascia in rats and humans.* **Tesarz J, Hoheisel U, Wiedenhöfer B, Mense S.** Neuroscience. 2011 Oct 27;194:302-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.07.066. Epub 2011 Aug 2.
41. *The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle.* **Purslow P.** Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2002; Dec;133(4):947-66.
42. *The extracellular matrix of muscle-implications for manipulation of the craniofacial musculature.* **Lewis MP, Machell JRA, Hunt NP, Sinanan ACM, Tippett HL.** 2001, Eur J Oral Sci , pp. 109: 209-221.
43. *Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix.* **Allison R, Gillies BS, Lieber RL.** Muscle Nerve.2011; 44: 318–331.
44. *The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle.* **Hinds S, Bian W, Dennis RG, Bursac N.** Biomaterials. 2011 May;32(14):3575-83. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.062. Epub 2011 Feb 13
45. *Role of extracellular matrix in adaption of tendon and skeletal muscle to mechanical loading.* **Kjaer, M.** 2004, Physiol Rev.2004.84: 649-698.
46. *The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading.* **Magnusson SP, Langberg H, Kjaer M.** Nat Rev Rheumatol. 2010 May;6(5):262-8. doi: 10.1038/nrrheum.2010.43. Epub 2010 Mar 23..
47. *The fascia: the forgotten structure.* **Stecco C, Macchi V, Porzionato A, Duparc F, De Caro R.** Ital J Anat Embryol. 2011;116(3):127-38.
48. *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players.* **Davies KE, Nowak KJ.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Oct;7(10):762-73. Epub 2006 Sep 13.
49. *The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way.* **Sparrow JC, Schöck F.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Apr;10(4):293-8. doi: 10.1038/nrm2634. Epub 2009 Feb 4.
50. **Boron W, Boulpaep E.** *Medical Physiology.* 2012. Elsevier.
51. *Fiber types in mammalian skeletal muscles.* **Schiaffino S, Reggiani C.** Physiol Rev. 2011 Oct;91(4):1447-531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010.
52. **Dubowitz V, Sewry C A, Oldfors A.** *Muscle Biopsy: A Practical Approach.*4th.2013. Saunders Ltd.

53. *Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease.* **Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM.** Eur Respir J. 2003 Aug;22(2):280-5.
54. *Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli.* **Matsakas A, Patel K.** Histol Histopathol. 2009 May;24(5):611-29.
55. *Fibre types in human abdominal muscles.* **Häggmark T, Thorstensson A.** Acta Physiol Scand. 1979 Dec;107(4):319-25.
56. *The myogenic transcriptional network.* **Yokoyama S, Ashara H.** 2011, Cell Mol Life Sci, pp. 68: 1843-1849.
57. *Differential binding of quadruplex structures of muscle-specific genes regulatory sequences by MyoD, MRF4 and myogenin.* **Yafe A, Shklover J, Weisman-Shomer P, Bengal E, Fry M.** 2008, Nucleic Acids Research, Vol. 36, No. 12 3916–3925.
58. *Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events.* **Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M.** In Vivo. 2009 Sep-Oct;23(5):779-96.
59. *Role of skeletal muscle proteoglycans during myogenesis.* **Brandan E, Gutierrez J.** Matrix Biol. 2013 Aug 8;32(6):289-97.
60. *Syndecans in skeletal muscle development, regeneration and homeostasis.* **Pisconti A, Bernet JD, Olwin BB.** Muscles Ligaments Tendons J. 2012 Jun 17;2(1):1-9.
61. *Guía Clínica de la AEC: Cirugía de la Pared Abdominal.* 2ª Edición. 2013. Editorial Arán.
62. **Caperochip, J. Álvarez.** *La pared abdominal. Cap 2. Cierre de la laparotomía.* s.l. : AEC, 2004.
63. *Current Developments in Hernia Repair; Meshes, Adhesives, and Tacking.* **Powell BS, Voeller GR.** 2010 Oct, Surg Technol Int, pp. XX:175-185.
64. *A comparasion of suture repair with mesh repair for incisional hernia.* **Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP, de Lange DC, Braaksmma MM, IjzermansJN, Boelhouwer RU, de Vries BC, Salu MK, Wereldsma JC, Bruijninx CM, Jeekel J.** 2000, The New England Journal of Medicine 343 (6): 392-398.
65. *Prosthetic material in ventral hernia repair: how do I choose? .* **Bachman S, Ramshaw B.** 2008 Feb, Surg Clin North Am, pp. 88(1):101-12, ix.
66. *Skeletal muscle tissue engineering approaches to abdominal wall hernia repair.* **Falco EE, Roth JS , Fisher JP.** Birth Defects Research (Part C).2008; 84:315-321.
67. *In vitro comparison of three different mesh constructions.* **Weyhe D, Belyaev O, Buettner G, Mros K, Mueller C, Meurer K, Papapostolou G, Uhl W.** ANZ J Surg. 2008 Jan-Feb;78(1-2):55-60.
68. *Hernia fibroblasts lack beta-estradiol-induced alterations of collagen gene expression.* **Lynen Jansen P, Rosch R, Rezvani M, Mertens PR, Junge K, Jansen M, Klinge U.** BMC Cell Biol. 2006; Sep 29;7:36.
69. *Fascial fibroblast kinetic activity is increased during abdominal wall repair compared to dermal fibroblasts.* **Dubay DA, Wang X, Kirk S, Adamson B, Robson MC, Franz MG.** Wound Rep Reg. 2004;12:539–545.
70. *Cultured pressure ulcer fibroblasts show replicative senescence with elevated production of plasmin, plasminogen activator inhibitor-1, and transforming growth factor-beta1.* **Vande Berg JS, Rose MA, Haywood-Reid PL, Rudolph R, Payne WG, Robson MC.** Wound Repair Regen. 2005; Jan-Feb;13(1):76-83.

71. *Preventive midline laparotomy closure with a new bioabsorbable mesh: an experimental study.* **López-Cano M, Armengol M, Quiles MT, Biel A, Velasco J, Huguet P, Mestre A, Delgado LM, Gil FX, Arbós MA.** J Surg Res. 2013; May 1;181(1):160-9.
72. *The Use of Amnion-Derived Cellular Cytokine Solution to Improve Healing in Acute and Chronic Wound Models.* **Franz MG et al.** 2008, Eplasty, p. 8: e21.
73. *Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration.* **Arbos MA, Ferrando JM, Quiles MT, Vidal J, López-Cano M, Gil J, Manero JM, Peña J, Huguet P, Schwartz-Riera S, Reventós J, Armengol M.** 2006, Biomaterials, pp. 27: 758–68.
74. *Incisional Herniation Induces Decreased Abdominal Wall Compliance via Oblique Muscle Atrophy and Fibrosis.* **Derek A. DuBay et al.** 2007, Ann Surg, pp. 245: 140–146.
75. *Effect of cytokine growth factors on the prevention of wound failure.* **Robson MC, Dubay DA, Wang X, Franz MG.** Wound Repair Regen. 2004; Jan-Feb;12(1):38-43.
76. *Factores biológicos implicados en la génesis de la hernia incisional.* **Bellón Juan M, Durán Hipólito J.** 01, 2008, Cir Esp. , Vol. 83, pp. 83:3-7.
77. *Factors affecting wound healing.* **Guo S and DiPietro LA.** 2010 March, J Dent Res.
78. *Transverse abdominal incisions compared with with midline incisions for elective infrarenal aortic reconstruction: predisposition to incisional hernia in patients with increased intraoperative blood loss.* **Lord SA, Crozier JA, Snell J, Meek AC.** 1994, J Vasc Surg, pp. 20:27-33.
79. *Greater risk of incisional hernia with morbidly obese than steroid-dependent patients and low recurrence with prefascial polypropylene mesh.* **Sugerman HJ, Kellum JM Jr, Reines HD, DeMaria EJ, Newsome HH, Lowry JW.** 1996, Am J Surg, pp. 171:80-4.
80. *Management of Patients with Hernia or Incisional Hernia Undergoing Surgery for Morbid Obesity.* **Vilallonga R, Fort JM, Gonzalez O, Baena J A, Lecube A and Armengol M.** 2011, Journal of Obesity, pp. Volume 2011, Article ID 860942, 5 pages.
81. *An evaluation of risk factors in incisional hernia recurrence.* **Hesselink VJ, Luijendijk RW, deWilt JH.** 1993, Surg Gynecol Obstet , pp. 176:228-34.
82. **Falagas ME, Athanasoulia AP, Peppas G, Karageorgopoulos DE.** Obesity Reviews . *Effect of body mass index on the outcome of infections: a systematic review .* May 2009, Vol. 10, 3, pp. 280–289,.
83. *Does the extraction-site location in laparoscopic colorectal surgery have an impact on incisional hernia rates?* **Singh R, Omiccioli A, Hegge S, McKinley C.** 2008, Surg Endosc. , pp. (12):2596-600 .
84. *Prosthetic infection after hernioplasty. Five years experience.* **Lledó JB et al.** 2009, Cir Esp, pp. 85(3):158-164.
85. *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes .* **Brem H and Tomic-Canic M.** 2007, J. Clin. Invest, pp. 117:1219–1222.
86. *Incisional hernia in gynecologic oncology patients: a 10-year study .* **Franchi M et al.** 2001 May, Obstet Gynecol, pp. 97(5 Pt 1): 696-700.
87. *Postoperative Incision Hernia in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm and Aortoiliac Occlusive Disease: A Systematic Review.* **Takagi H, Sugimoto M, Kato T, Matsuno Y and Umemoto T.** 2007, Eur J Vasc Endovasc Surg , pp. 33, 177e18.

88. *Recent Advances in Molecular Mechanisms of Abdominal Aortic Molecular Mechanisms of Abdominal Aortic*. **Annambhotla S**. 2008 June, *World J Surg*, págs. 32(6): 976–986.
89. *Smoking Is a Risk Factor for Incisional Hernia*. **Sørensen L T, Hemmingsen B U, Kirkeby L T, Kallehave F**. 2005, *Arch Surg*, pp. 140:119-123.
90. *Chemotherapy and patient co-morbidity in ventral site hernia development*. **Rettenmaier MA, Abaid LN, Brown III JV, Micha JP, Goldstein BH**. 2009, *J Gynecol Oncol*, Vol. 20, pp. 4:246-250.
91. *Quality of life in long-term survivors of nonseminomatous germ cell testicular tumors*. **Douchez J, Droz JP, Desclaux B, Allain Y, Fargeot P, Caty A, Charrot P**. 1993 Mar, *Urol*, pp. 149(3):498-501.
92. *Wound dehiscence: is still a problem in the 21th century: a retrospective study*. **Spiliotis J et al**. 2009, *World Journal of Emergency Surgery*, pág. 4:12.
93. *Neuroendocrine interactions in the immune system*. **Taub DD**. 2008, *Cell Immunol*, pp. 252(1-2): 1-6.
94. *A review of metabolic staging in severely injured patients*. **Aller et al**. 2010, *Scandinavian Journal of Trauma*, p. 18:27.
95. *Systemic inflammation after trauma*. **Lenz A, Franklin G A, Cheadle W G**. *Injury, Int. J. Care Injured* (2007) 38, 1336—1345.
96. *Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy*. **Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D**. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862-74.
97. *Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression?* **Menger DM, Vollmar B**. *Langenbecks Arch Surg*.2004; 389: 475-484.
98. *Interleukin-6 and chronic inflammation*. **Gabay C**. 2006, *Arthritis Research & Therapy* , p. 8(Suppl 2):S3.
99. *The role of proinflammatory cytokines in inflammatory and metabolic responses*. **Tompkins RG**. 1997, *Ann. Surg.*, pp. Vol. 225, No. 3, 243-245.
100. *Cytokines, Acute-Phase Proteins and hormones*. **Burger D, Dayer J M**. 2002, *Ann. N.Y. Acad. Sci*, pp. 966: 464-473.
101. *Acute-phase proteins: As diagnostic tool*. **Jain S, Gautam V, Naseem S**. *J. Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(1):118-127.
102. *Chronic Low-Grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms*. **Lasselin J, Capuron L**. *Neuroimmunomodulation* 2014;21:95–101.
103. **Barber Ana M.ª, Ponz F**. *Fisiología animal: funciones vegetativas*. Madrid : Síntesis, 2000.
104. **Ponz F, Barber Ana M.ª**. *Neurofisiología*. Madrid : Síntesis, 2000.
105. *The role of anabolic hormones for wound healing in catabolic stress*. **RH, Demling**. 2005, *J Burns Wounds*, p. 4: e2.
106. *The use of metabolic agents in catabolic states*. **Demling RH**. 2007, *J Burns Wounds*, p. 6: e2.
107. *Glucorticoids: exemplars of multitasking*. **Buckingham JC**. 2006, *Br J Pharmacol* , pp. 147 Suppl 1:S258-68.
108. *Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview*. **RH, Demling**. 2009, *Eplasty*, p. 9:e9.

109. *Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms.* **Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Rossignol P, Michel JB.** Cardiovascular Research (2009); 82, 532–541.
110. *Abdominal aortic aneurysm and abdominal wall hernia as manifestations of a connective tissue disorder.* **Cambria R P.** J Vasc Surg. 2011;54:1175-81.
111. *Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression.* **Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE.** Circulation. 2008 December 2; 118(23): 2382–2392.
112. *Suppression of Activation and Costimulatory Signaling in Splenic CD4+ T Cells after Trauma-Hemorrhage Reduces T-Cell Function: A Mechanism of Post-Traumatic Immune Suppression.* **Hsieh C, Hsu J, Hsieh Y, Frink M, Raju R, Hubbard W J, Bland I K and Chaudry I H.** Am J Pathol. 2009; 175:1504–1514.
113. *Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches.* **Angele MK, Chaudry IH.** Langenbecks Arch Surg (2005) 390: 333–341.
114. *Immunosuppression following surgical and traumatic injury.* **Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M.** Surg Today. 2010 Sep;40(9):793-808. doi: 10.1007/s00595-010-4323-z. Epub 2010 Aug 26.
115. *Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology.* **Dhabhar, Firdaus S.** Neuroimmunomodulation 2009;16:300–317.
116. *Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function.* **Josefowicz SZ, Li-Fan Lu, Rudensky AY.** Annu. Rev. Immunol. 2012. 30:531–64.
117. *Regulatory T cell populations in sepsis and trauma.* **Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, Ayala A.** J Leukoc Biol. 2008 Mar;83(3):523-35. Epub 2007 Oct 3.
118. *Acute inflammatory response after inguinal and incisional hernia repair with implantation of polypropylene mesh of different size.* **al, Di vita G et.** Arch Surg.2005;390: 306-11.
119. *Endoscopic vs conventional hernia repair from an immunologic point of view.* **Decker D, Lindemann C, Springer W, Low A, Hirner A, von Ruecker A.** Surg Endosc. 1999; Apr;13(4):335-9.
120. *The Potential Pattern of Circulating Lymphocytes TH1/TH2 Is Not Altered After Multiple Injuries.* **Wick M, Kollig E, Muhr G, Köller M.** Arch Surg. 2000 Nov;135(11):1309-14.
121. *Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair.* **Di Vita G, Patti R, D'Agostino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, Bonventre S, Ferlazzo V, Arcoleo F, Cillari E.** Wound Repair Regen. 2006 May-Jun;14(3):259-64.
122. *Serum analyses for protein, albumin and IL-1-RA serve as reliable predictors for seroma formation after incisional hernia repair.* **Klink CD, Binnebösel M, Lucas AH, Schachtrupp A, Grommes J, Conze J, Klinge U, Neumann U, Junge K.** Hernia. 2011 Feb;15(1):69-73. doi: 10.1007/s10029-010-0746-0.
123. *Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration?* **Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli R.** Arthritis Res Ther. 2009;11(3):235. doi: 10.1186/ar2723. Epub 2009 Jun 30.
124. *Tendinopathy: a review of the pathophysiology and evidence for treatment.* **Goldin M, Malanga GA.** Phys Sportsmed. 2013; Sep;41(3):36-49. doi: 10.3810/psm.2013.09.2019.

125. *Common overuse tendon problems: A review and recommendations for treatment.* **Wilson JJ, Best TM.** Am Fam Physician. 2005; Sep 1;72(5):811-8.
126. *Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management.* **Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M.** Sports Med. 1999 Jun;27(6):393-408.
127. *Types and epidemiology of tendinopathy.* **Maffulli N, Wong J, Almekinders LC.** Clin Sports Med 2003, 22:675-692.
128. *Ueber den Verschluss von Bauchwunden und Bruchpforten durch versenkte Silberdrahtnetze (Einheilung von Filigranpelotten).* **Witzel O.** 1900; Centralbl. F Chir Leipz 27: 257.
129. *The repair of incisional and inguinal hernias.* **Usher FC.** 1970, Surg Gyn Obst, pp. 131: 525-530.
130. *The cause, prevention and treatment of recurrent groin hernia.* **Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK.** 1993, Surg Clin Am, pp. 73(3): 529-544.
131. *Análisis histórico del tratamiento de la hernia incisional compleja: hacia una comprensión de la técnica de doble reparación protésica.* **Moreno-Egea A, Aguayo-Albasini JL.** 2010, Cir Esp, pp. 88(5):292-298.
132. *Polypropylene mesh in 450 hernia repairs: evaluation of wound infections.* **Martin RE, Sureik S, Clossen JN.** 1982, Contemp Surg , pp. 20:46-49.
133. *Which mesh for hernia repair?* **Brown CN, Finch JG.** 2010, Ann R Coll Surg Eng, pp. 92:272-278.
134. *Meta-analysis of randomized clinical trials comparing open and laparoscopic inguinal hernia repair.* **Memon MA, Cooper NJ, Memon B, Memon MI, Abrams KR.** 2003, Br J Surg, pp. 90:(12):1472-1492.
135. *Incisional ventral hernias: review of the literature and recommendations regarding the grading and technique of repair.* **Ventral Hernia Working Group, Breuing K, Butler CE, Ferzoco S, Franz M, Hultman CS, Kilbridge JF, Rosen M, Silverman RP, Vargo D.** Surgery. 2010 Sep;148(3):544-58. doi: 10.1016/j.surg.2010.01.008. Epub 2010 Mar 20.
136. *Cirugía AEC 2ª edición.* Parrilla P, Landa Garcia JL. Cap 20. Eventración posoperatoria. Evisceración y cierres difíciles. **Bellón Caneiro J.** Ed. Médica Panamericana. 2009.
137. *Abdominal wall closure by incisional hernia and herniation after laparostoma.* **Mischinger HJ, Kornprat P, Werkgartner G, El Shabrawi A, Spendel S.** 2010, Chirurg., pp. Mar;81(3):201-10.
138. *Incisional hernia.* **Santora TA, Roslyn JJ.** 1993, Surg Clin North Am, pp. 77:651-9.
139. *Incisional ventral hernia: Review of the literature and recommendations regarding the grading and technique of repair.* **The Ventral Hernia Working Group: Breuing K et al.** September 2010, Surgery, Vols. 148, nº3, pp. 544-558.
140. *The management of incisional hernia.* **Kingsnorth A.** 2006, Ann R Coll Surg Engl, pp. 88: 252-260.
141. *Antibiotic prophylaxis in incisional hernia repair using a prosthesis.* **Rios A, Rodriguez JM, Munitz V, Alcaraz P, Perez D.,** 2001, Hernia, pp. 148-52.
142. *Prophylactic prosthetic reinforcement of midline abdominal incisions in high-risk patients.* **El-Khadrawy OH, Moussa G, Mansour O, Hashish MS.** 2009 Jun, Hernia, págs. 13(3):267-74.
143. *Prevention of Incisional Hernia after Aortic Aneurysm Repair.* **Rogers M, McCarthy R and Earnshaw JJ.** 2003, Eur J Vasc Endovasc Surg , pp. 26, 519–522.

144. *Hernia incisional*. **Schulz M, Uherek F, Mejías P**. 2003, Cuad. Cir., pp. 17:103-111.
145. *Preliminary report on the use of tantalum mesh in the repair of ventral hernias*. **Koontz AR**. 1948, Ann Surg 127: 1079-1085.
146. *Tantalum gauze in the repair of hernias complicated by tissue deficiency*. **Throckmorton TD**. 1948; Surgery 23: 32-46.
147. *Repair of large hernia with tantalum gauze*. **Douglas DM**. 1948, Lancet 1: 936.
148. *Large abdominal incisional hernias: Repair by fascial approximation reinforced with a stainless steel mesh*. **Validere J, Imbaud P, Dutet D, Duron YY**. 1986, Br J Surg 73: 8-10.
149. *Repair of abdominal wall defects with Fortisan fabric*. **Narat JK, Khedroo LG**. 1952, Ann Surg 136: 272-275.
150. *A further experimental work on prostheses for hernia repair*. **Koontz AR, Kimberly RC**. 1959, Surg Gynecol Obstet, pp. 109: 321-7.
151. *Use of a porous synthetic sponge (Ivalon) in surgery: II Studies of tensile strength*. **Adler RH, Darby C**. 1960, U.S. Armed Forces Med J 11:1349-1349.
152. *The use of polyvinyl sponge in the repair of abdominal wall hernias*. **Abrahams JL, Jonassen OT**. 1957, Contemporary Surg 42: 336-340.
153. *Use of temporary prostheses to repair difficult hernias*. **Linn BS, Vargas A**. 1973, Southern Med J 66:925.
154. *Use of commercial Dacron fabric in the repair of inguinal hernias and abdominal wall defects*. **JT, Wolstenholme**. Arch Surg. 1956; 73: 1004-1008.
155. *Unstitched Dacron prosthesis in groin hernias*. **Stoppa RE, Petit J, Henry X**. 60: 411-412, Int Surg , p. 1975.
156. *Incisional hernioplasty with M*. **Wantz GE**. 1991, Surg Gynecol Obstet, pp. 172: 129-137.
157. *The use of Marlex mesh in repair of incisional hernias*. **Usher FC, Oschsner J, Tuttle LLD**. 1958, Am Surg 24: 969-974.
158. *Tissue reaction to plastic- a comparison of Nylon, Orlon, Dacron, Teflon and Marlex*. **Usher FC, Wallace S**. 1958, Arch Surg , pp. 76: 997-999.
159. *A new technique for the repair of inguinal and incisional hernias*. **Usher FC, Cogan JE, Lowry TI**. Arch Surg : s.n., 1960, p. 81: 847.
160. *Hernia repair with Marlex mesh*. **Usher FC**. 1962, Arch Surg, pp. 84: 325-328.
161. *Here we are: Behind again*. **Peacock EE**. Am J Surg, pág. 157:187.
162. *The tension-free hernioplasty*. **Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK, Montllor MM**. 1989, Am J Surg, pp. 188-193.
163. *Massive incisional hernia: Abdominal wall replacement with Marlex mesh*. **Molloy RG, Moran KT, Waldron RP, Brady MP, Kirwan WO**. 1991, Br J Surg, pp. 78: 242-244.
164. *A new technique of "Marlex-Peritoneal Sandwich" in the repair of large incisional hernias*. **Matapurkar BG, Gupta AK, Agarwal AK**. 1991, World J Surg, pp. 15: 768-770.

165. *Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia.* **Liakakos T, Karanikas I, Panagiotidis H, Dendrinis S.** 1994, Br J Surg , pp. 81: 248-249.
166. *Japanese Patent No (67/13560).* **Oshige S.** 1967, pp. 42-13560.
167. *US Patent 3.953566.* **Gore RW.** 1976, p. April 27.
168. *A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects.* **Jenkins SD, Klamer TW, Parteka JJ, Condon RE.** 1983, Surgery, p. 94:392: 398.
169. *Replacement of an abdominal wall defect using expanded PTFE sheet (Gore-Tex).* **Hamer-Hodges DW, Scott NB.** 1985, J Roy Coll Surg, pp. 30: 65-67.
170. *Repair of large abdominal wall defects with expanded polytetrafluoroethylene (PTFE).* **Bauer JJ, Salky BA, Gelernt IM, Kreel I.** 1987, Ann Surg, págs. 206: 65-69.
171. *Comparison of prothetic materials for abdominal wall reconstruction in the presence of contamination and infection.* **Brown GL, Richarson JD, Malangoni MA, Tobin GR, Ackerman D, Polk HC.** 1985, Ann Surg , pp. 201:705-711.
172. *Thoracic wall defects: Surgical management of 205 consecutive patients.* **Pairolero PC, Arnold PG.** 1986, Clin Proc, pp. Mayo 61: 557-560.
173. *Repair of large ventral incisional hernias with expanded polytetrafluoroethylene prosthetic patches.* **DeBord JR, Wyffels PL, Marshall S, Miller G, Marshall WH.** 1992, Postgrad Gen Surg, pp. 4: 156-160.
174. *Interface formed betweenvisceral peritoneum and experimental polypropylene or polytetrafluoroethylene abdominal wall implants.* **Bellón JM, Buján J, Contreras L, Hernando A.** 1996, J Mat Sci (Mat Med), pp. 7: 331-336.
175. *Similarity in behavior of polytetrafluoroethylene (ePTFE) prostheses implanted into different interfaces.* **Bellón JM, Buján J, Contreras L, Hernando A, Jurado F.** 1997, J Biomed Mat Res, pp. 31: 1-9.
176. *Management of Soft Tissue Ridge Deformities with Acellular Dermal Matrix: Clinical Approach and Outcome After Six Months of Treatment.* **Batista et al.** 2001, J. Periodontol, pp. 72:1118-1124.
177. *Scars and collagen implantation.* **Oliver RF.** 1987, Burns Incl Therm Inj. , pp. Oct;13 suppl:s49-55.
178. *Collagen synthesis in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse.* **Makinen J, Kahari VM, Soderstrom KO, Vuorio E, Hirvonen T.** 1987, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, pp. Apr; 24(4):319-25.
179. *Hernia repair: the search for ideal meshes.* **Bringman S et al.** 2010, Hernia, pp. 14:81-87.
180. *Concise Encyclopedia of Medical and Dental Materials.* **Williams DF.** 1990, Pegamon Press, pp. 51-69.
181. *Eventraciones. Actualizaciones en técnica quirúrgica, integración de biomateriales y problemática jurídica.* Barcelona: Víctor Pozanco; Biblioteca CyH.-Medicina. **Vidal Sans J et al.** 2004, Barcelona: Víctor Pozanco; Biblioteca CyH.-Medicina.
182. *A preliminary report on the use of prefabricated nylon weave in the repair of ventral hernia.* **Cumberland VH.** 1952, Med J Austr, pp. 1:143-144.
183. *Hernias of the abdominal wall.* **Ponka JL.** En. W.B. Saunders Filadelfia : s.n., 1980, pp. 339-392.

184. *The experimental evaluation of a carbonpolylactic acid mesh for a ventral herniorrhaphy.* **Greenstein SM, Murphy TF, Rush BF, Alexander H.** 1984, *Curr Surg* , pp. 41: 358-362.
185. *Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair.* **Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V.** *Biomaterials.*1998;19(24):2235-2246.
186. *Introduction of polyethylene terephthalate mesh(KoSa hochfest) for abdominal hernia repair: an animal experimental study.* **Zieren J, Neuss H, Paul M, Müller J.** 2004, *Biom Mat Eng* , pp. 2: 127–32.
187. *Biological response to mesh.* **Klosterhalfen B, Hermanns B, Rosch R.** 2003, *Eur Surg*, pp. 35: 16–20.
188. *The lightweight and large porous mesh concept for hernia repair.* **Klosterhalfen B, Junge K, Klinge U.** 2005, *Expert Rev Med Devices*, pp. 2: 103–17.
189. *Decreased collagen type I/III ration in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prosthesis.* **Junge K, Klinge U, Rosch R, Mertens PR, Kirch J, Klosterhalfen B et al.** 2004, *Langenbecks Arch Surg* , pp. 389: 17–22.
190. *Biocompatibility of prosthetic meshes in abdominal surgery.* **Binnebösel M et al.** 2011, *Semin Immunopathol*, pp. DOI 10.1007/s00281-010-0237-5.
191. *Degradation of mesh coatings and intraperitoneal adhesion formation in an experimental model.* **Schreinemacher MHF, Emans PJ, Gijbels MJ, Greve JW, Beets GL, Bouvy ND.** 2009, *Br J Surg* , pp. 96: 305–313.
192. *A review of chronic pain after inguinal herniorrhaphy .* **Poobalan AS, Bruce J, Smith WC, King PM, Krukowski ZH, Chambers WA.** 2003, *Clin J Pain* , pp. 19: 48–54.
193. *Early laparotomy wound failure as the mechanism for incisional hernia formation.* **Xing L, Culbertson EJ, Wen Y, Franz MG.** *J Surg Res.* 2013 Jun 1;182(1):e35-42. doi: 10.1016/j.jss.2012.09.009. Epub 2012 Sep 23.
194. *Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration.* **Arbos MA, Ferrando JM, Quiles MT et al.** 2006, *Biomaterials* 27:758-768.
195. *Hernia recurrence as a problem of biology and collagen.* **Klinge U, Binnebösel M, Rosch R, and Mertens P,.** 2006 September, *J Minim Access Surg*, pp. 2(3): 151–154.
196. *Roles of focal adhesions and fibronectin-mediated cohesion in proliferation of confluent fibroblasts.* **Tanaka M, Abe T, Hara Y.** 2009 Apr, *J Cell Physiol*, pp. 219(1):194-201.
197. *Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions.* **Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ.** *Mol Biol Cell.*2004. Sep15(9):4310-20. Epub 2004 Jul 7.
198. *Cadherin-11 induces rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes to form lining layers in vitro.* **Kiener HP, Lee DM, Agarwal SK, Brenner MB.** 2006 May, *Am J Pathol.*, págs. 168(5):1486-99.
199. *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease.* **RJ, McAnulty.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(4): 666-71.
200. *Induction of metalloproteinases expression by TLR ligands in human fibroblast like synoviocytes from juvenile idiopathic arthritis patients.* **Agarwal S, Misra R, Aggarwal A.** *Indian J Med Res.* 2010 Jun;131:771-9.
201. *Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis.* **Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T.** *Rheumatology (Oxford).* 2006 Jun;45(6):669-75. Epub 2006 Mar 27.

202. *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity.* **O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG.** Nat Rev Immunol. 2013 Jun;13(6):453-60.
203. *Signaling pathways that control cell proliferation.* **Duronio RJ, Xiong Y.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Mar 1;5(3):a008904. doi: 10.1101/cshperspect.a008904.
204. *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.* **Malumbres M, Barbacid M.** Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):153-66. doi: 10.1038/nrc2602.
205. *The role of senescent cells in ageing.* **van Deursen JM.** Nature. 2014 May 22;509(7501):439-46. doi: 10.1038/nature13193.
206. *Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments.* **Inoue H, Tani K.** Cell Death Differ. 2014 Jan;21(1):39-49. doi: 10.1038/cdd.2013.84. Epub 2013 Jul 5.
207. *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.* **Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Mar;9(3):231-41.
208. *Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells.* **Fuchs Y, Steller H.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2015 Jun;16(6):329-44. doi: 10.1038/nrm3999. Epub 2015 May 20.
209. *Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential.* **Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS.** Nat Rev Immunol. 2014 Mar;14(3):166-80. doi: 10.1038/nri3607. Epub 2014 Jan 31.
210. *Basic science of wound healing.* **Enoch S, Leaper DJ.** 2005, Surgery, Vol. 23, pp. Issue 2, 37-42.
211. *Wound healing.* **Williamson D, Harding K.** Medicine Dermatology 1. 2004: Issue 12, 4-7, Vol. 32.
212. **Baranoski S, Ayello E.A.** *Wound Care Essentials: Practice Principles.* Philadelphia : Lippincott, Wilkins and Williams, 2008.
213. *Platelets and the immune continuum.* **Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J.** Nat Rev Immunol. 2011 Apr;11(4):264-74.
214. *Complement--tapping into new sites and effector systems.* **Kolev M, Le Friec G, Kemper C.** Nat Rev Immunol. 2014 Dec;14(12):811-20.
215. *Complement driven by conformational changes.* **Gros P, Milder FJ, Janssen BJ.** Nat Rev Immunol. 2008 Jan;8(1):48-58.
216. *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview.* **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** J Interferon Cytokine Res. 2009 Jun;29(6):313-26.
217. *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.* **Eming SA, Krieg T, Davidson JM.** 2007, J Invest Dermatol, pp. 127(3):514-25.
218. *Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodelling.* **Tomasek JJ et al.** Nature reviews. Molecular cell biology.2002;349-363,3.
219. *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.* **Wynn T A.** 2007, J. Clin. Invest, pp. 117:524-529 .
220. *Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts.* **Van den Borne, S. W. M. et al.,.** Nat. Rev. Cardiol.2010;30-37,7.

221. *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. **Wynn TA**. J Pathol. 2008;214: 199–210.
222. *Collagen I/III and matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 13 in the fascia of patients with incisional hernias*. **Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B**. J Invest Surg. 2001;14: 47-54.
223. *The Treg/Th17 Cell Balance: A New Paradigm for Autoimmunity*. **Eisenstein EM, Williams CB**. Pediatr Res. 2009 May;65(5 Pt 2):26R-31R.
224. *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. **Biswas SK, Mantovani A**. Nat Immunol. 2010 Oct;11(10):889-96.
225. *The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells*. **Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ**. Feb, Immunology. 2013; 138(2):105-15.
226. **F.P. Nijkamp, Michael J. Parnham (eds.)**. Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition, DOI 10.1007/978-3-0346-0136-8_2, © Springer Basel AG 2011.
227. *Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration*. **Chargé SB, Rudnicki MA**. 2004, Physiol Rev 84: 209–238, pp. Jan;84(1):209-38.
228. *Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury*. **Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM**. 2009 Nov-Dec, Nitric Oxide, pp. 21(3-4):157-63. Epub 2009 Aug 12.
229. *Attenuation of the rectus sheath in inguinal herniation*. **RC., Read**. 1970, Am J Surg, pp. 120: 610–614.
230. *Defective collagen synthesis in inguinal herniation*. **Wagh PV, Read RC**. 1972, Am J Surg, pp. 124: 819–822.
231. *Direct inguinal herniation in men: a disease of collagen*. **Wagh PV, Leverich AP, Sun CN, White HJ, Read RC**. 1974, J Surg Res , págs. 17: 425–433.
232. *Preliminary study on the content of Type I and Type III collagen in posterior rectus sheath in patients with inguinal hernia*. **Zhang R, Che X, Liu H, Fan L, Zhao W, Wang G**. 2007, J Xi'an Jiatong University, pp. 28: 308–310.
233. *Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia*. **Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B**. 2000, Eur Surg Res, págs. 32: 43–48.
234. *Skeletal muscle tissue engineering approaches to abdominal wall hernia repair*. **Erin E. Falco, J. Scott Roth, John P. Fisher**. 2008, Birth Defects Research (Part C), págs. 84:315-321.
235. *Connective tissue alteration in abdominal wall hernia*. **Henriksen N A, Yadete D H, Sorensen L T, AGren MS, Jorgensen LN**. British journal of Surgery. 2011; 98:210-219.
236. *Fibrillin-1 in incisional hernias: an immunohistochemical study in scar and non-scar regions of human skin and muscle fasciae*. **Fricke M, Langer C, Brunner E, et al**. 2008, J Anat, pp. 212:674-685.
237. *Histologic and immunohistochemical studies of rectus sheath in obese patients*. **Szczesny W, Bodnar M, Dabrowiecki S, Szmytkowski J, Marszałek A**. J Surg Res. 2012; May 24.[Epub ahead of print].
238. *The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of abdominal wall hernias*. **Antoniou S A, Granderath F A and Simopoulos C**. Eur J Clin Invest. 2009; 39 (11): 953–959.
239. *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*. **Page-McCaw A, J. Ewald A, Werb Z**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 March; 8(3).

240. *Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity.* **Khokha R, Murthy A, Weiss A.** *Nat Rev Immunol.* 2013 Sep;13(9):649-65.
241. *Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis.* **Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Dec;15(12):802-12. doi: 10.1038/nrm3896. Epub 2014 Oct 22.
242. *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.* **Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Sep; 11(9):633-43.
243. *Environmental sensing through focal adhesions.* **Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jan;10(1):21-33. doi: 10.1038/nrm2593.
244. *The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity.* **Kocgozlu L, Rabineau M, Koenig G, Haikel Y, Schaaf P, Freund JN, Voegel JC, Lavallo P, Vautier D.** *Biomaterials.* 2012 Jan;33(3):798-809. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.024. Epub 2011 Oct 29.
245. *Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells.* **Kocgozlu L, Lavallo P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Tenenbaum H, Vautier D.** *J Cell Sci.* 2010 Jan 1;123(Pt 1):29-39. doi: 10.1242/jcs.053520.
246. *Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease.* **Isermann P, Lammerding J.** *Curr Biol.* 2013 Dec 16;23(24):R1113-21. doi: 10.1016/j.cub.2013.11.009.
247. *Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate.* **Rabineau M, Flick F, Mathieu E, Tu A, Senger B, Voegel JC, Lavallo P, Schaaf P, Freund JN, Haikel Y, Vautier D.** *Biomaterials.* 2015 Jan;37:144-55. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.023. Epub 2014 Oct 29.
248. *Mechanotransduction gone awry.* **Jaalouk DE, Lammerding J.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jan;10(1):63-73. doi: 10.1038/nrm2597.
249. *Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options.* **James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB.** *J Hand Surg.* 2008; 33A: 102–112.
250. *Integrins in mechanotransduction.* **Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA.** *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12001-4. Epub 2004 Feb 11.
251. *Mechanobiology of tendon.* **Wang JH.** *J Biomech.* 2006;39(9):1563-82. Epub 2005 Jul 5.
252. *Loss of mechanical strain impairs abdominal wall fibroblast proliferation, orientation, and collagen contraction function.* **Culbertson EJ, Xing L, Wen Y, Franz MG.** *Surgery.* 2011; Sep;150(3):410-7.
253. *Progressive fascial wound failure impairs subsequent abdominal wall repairs: a new animal model of incisional hernia formation.* **DuBay DA, Wang X, Adamson B, Kuzon WM Jr, Dennis RG, Franz MG.** *Surgery.* 2005; Apr;137(4):463-71.
254. *The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage.* **Roughley PJ, S Mort J.** *J Exp Orthop.* December 2014, 1:8.
255. *Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer.* **Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, Kawada K, Sakai Y, Mizoguchi E, Chiba T.** *Oncogene.* 2012 Jun 28;31(26):3111-23. doi: 10.1038/onc.2011.498. Epub 2011 Nov 7.
256. *Reelin induces EphB activation.* **Bouché E, Romero-Ortega MI, Henkemeyer M, Catchpole T, Leemhuis J, Frotscher M, May P, Herz J, Bock HH.** *Cell Res.* 2013 Apr;23(4):473-90. doi: 10.1038/cr.2013.7. Epub 2013 Jan 15.

257. *Incisional hernia recurrence through genomic profiling: a pilot study.* **Calaluce R, Davis JW, Bachman SL, Gubin MM, Brown JA, Magee JD, Loy TS, Ramshaw BJ, Atasoy U.** *Hernia.* 2013 Apr;17(2):193-202. doi: 10.1007/s10029-012-0923-4. Epub 2012 May 31.
258. *Muscle, nerve, and skin biopsy.* **Jaradeh S.S, Ho H.** 2004, *Neurol Clin* 22 (2004) 539–561, pp. 22 539–56.
259. *Apoptosis and proliferation of acinar and islet cells in chronic pancreatitis: evidence for differential cell loss mediating preservation of islet function.* **Bateman AC, Turner SM, Thomas KS, et al.** 2002, *Gut*, pp. 50:542-548.
260. *Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair.* **Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W.** *Mol Cell Biol.* 2005; 25:9350-9359.
261. **Lloyd R. Kelland, Philip J. Beale.** *Bcl-2 Family Immunohistochemistry.* [ed.] Uta Böger-Brown Robert Brown. *Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms.* Volume 28 of the series *Methods in Molecular Medicine™* pp 201-208.1999.Springer.
262. *Increased cell proliferation and associated expression of PDGFRbeta causing hypercellularity in patellar tendinosis.* **Rolf CG, Fu BS, Pau A, Wang W, Chan B.** *Rheumatology (Oxford).* 2001 Mar;40(3):256-61.
263. *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.* **Liang CC, Park AY, Guan JL.** *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
264. *Transwell(®) invasion assays.* **Marshall J.** *Methods Mol Biol.* 2011;769:97-110.
265. *Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs.* **Saotome K, Morita H, Umeda M.** *Toxicol In Vitro.* 1989;3(4):317-21.
266. *Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts.* **Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C.** *Mol Biol Cell* 2003, 14:2508 –2519.
267. *Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma.* **Simpson KJ, Dugan AS, Mercurio AM.** *Cancer Res* 2004, 64:8694 – 8701.
268. *Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms.* **Belmokhtar CA, Hillion J, Segal-Bendirdjian E.** *Oncogene* 2001, 20:3354 –3362.
269. *Interrelated effects of tumor necrosis factor and interleukin 1 on cell viability.* **Holtmann H, Hahn T, Wallach D.** *Immunobiology* 1988, 177:7–22.
270. **Walker, J. M.** *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. The Protein Protocols Handbook.* Third Edition. s.l. : © Humana Press, a Part of Springer Science + Business Media, LLC, 2009, 21.
271. **Kurien BT, R. Hal Scofield R.** *Methods in Molecular Biology. Western Blotting. Methods and Protocols.* s.l. : © Springer Science+Business Media New York, 2015.
272. *Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis.* **Abdolzade-Bavil A, Hayes S, Goretzki L, et al.** 2004, *Proteomics*, pp. 4:1397-1405.
273. *Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms.* **Talmadge RJ, Roy RR.** *J Appl Physiol* 1993; 75:2337-2340.
274. *Enhanced protein electrophoresis technique for separating human skeletal muscle myosin heavy chain isoforms.* **Bamman MM, Clarke MSF, Talmadge RJ, Feedback DL.** *Electrophoresis* 1999; 20: 466-468.

275. *Electrophoretic Separation of Human Skeletal Muscle Myosin Heavy Chain Isoforms: The Importance of Reducing Agents*. **Kohn TA, Myburgh KH**. *J Physiol Sci* 2006; 56 (5): 355–360.
276. *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels*. **Chevallet M, Luche S, Rabilloud T**. *Nature Protocols*. 2006;1(4):1852-1858. doi:10.1038/nprot.2006.288.
277. *Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay*. **Haddad F, Baldwin KM**. *Methods Mol Biol*. 2010;630:261-70. doi: 10.1007/978-1-60761-629-0_17.
278. *Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)*. **Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW**. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010 Jun;2010(6):pdb.prot5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439.
279. *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. **Chomczynski P**. *Biotechniques*. 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7.
280. *Human housekeeping genes, revisited*. **Eisenberg E, Levanon EY**. *Trends Genet*. 2013 Oct;29(10):569-74. doi: 10.1016/j.tig.2013.05.010. Epub 2013 Jun 27.
281. *Novel tumor-specific isoforms of BEHAB/brevican identified in human malignant gliomas*. **Viapiano, M. S., Bi, W. L., Piepmeier, J., Hockfield, S., & Matthews, R. T**. *Cancer research*.2005; 65(15), 6726-6733.
282. *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. **Wight, T. N**. *Current opinion in cell biology*.2002; 14(5), 617-623.
283. *Principal Component Analysis*. **Jolliffe, I.T**. 2002.Springer-Verlag New York.
284. *On lines and planes of closest fit to systems of points in space*. **Pearson K**. *Philosophical Magazine*.1901; Series 6, vol. 2, no. 11, pp. 559-572.
285. *Analysis of a Complex of Statistical Variables Into Principal Components*. **Hotelling H**. *Journal of Educational Psychology*. 1933; volume 24, pages 417-441 and 498-520.
286. *pcaMethods: a Bioconductor package providing PCA methods for incomplete data*. **Stacklies W., Redestig H., Scholz M., and Walther D., and Selbig J**. *Bioinformatics*. 2007, 23, 1164-1167.
287. *The impact of substrate stiffness and mechanical loading on fibroblast-induced scaffold remodeling*. **Petersen A, Joly P, Bergmann C, Korus G, Duda GN**. *Tissue Eng Part A*. 2012 Sep;18(17-18):1804-17.
288. *Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity*. **Ross AM, Jiang Z, Bastmeyer M, Lahann J**. *Small*. 2012 Feb 6;8(3):336-55. doi: 10.1002/smll.201100934. Epub 2011 Dec 9.
289. *Protein-engineered biomaterials: nanoscale mimics of the extracellular matrix*. **Romano NH, Sengupta D, Chung C, Heilshorn SC**. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Mar;1810(3):339-49. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.07.005. Epub 2010 Jul 18.
290. *Design of Artificial Human Joints & Organs. Chapter:Mechanical Properties of Biological Materials*. **Subrata Pal**. 2014, Springer Science+Business Media New York.
291. *Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells*. **Logue SE, Elgendy M, Martin SJ**. *Nat Protoc* 2009; 4: 1383-1395.
292. *Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions*. **Horzum U, Ozdil B, Pesen-Okvur D**. *MethodsX*. 2014 Jul 7;1:56-9. doi: 10.1016/j.mex.2014.06.004. eCollection 2014.

293. *Radar plots: a useful way for presenting multivariate health care data.* **MJ, Saary.** J Clin Epidemiol. 2008 Apr;61(4):311-7. doi: 10.1016/j.jclinepi.2007.04.021.
294. *Apoptosis-like cell death induction and aberrant fibroblast properties in human incisional hernia fascia.* **Diaz R, Quiles MT, Guillem-Marti J, Lopez-Cano M, Huguet P, Ramon-Y-Cajal S, Reventos J, Armengol M, Arbos MA.** Am J Pathol. 2011 Jun;178(6):2641-53. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.044.
295. *Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in vimentin cytoskeleton signaling.* **Li QF, Spinelli AM, Wang R, Anfinogenova Y, Singer HA, Tang DD.** J Biol Chem 2006, 281:34716–34724.
296. *V3 versican isoform alters the behavior of human melanoma cells by interfering with CD44/ErbB-dependent signaling.* **Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Marco-Ramell A, Cabrera J, Fabra A, Bassols A.** J Biol Chem. 2011 Jan 14;286(2):1475-85. doi: 10.1074/jbc.M110.127522. Epub 2010 Nov 15.
297. *Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans.* **Iozzo RV, Schaefer L.** Matrix Biol. 2015 Mar;42:11-55. doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.003. Epub 2015 Feb 18.
298. *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk.* **Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2001; Nov;2(11):793-805.
299. *Autophagy: principles and significance in health and disease. Biochim Biophys Acta 2009, 1792:3–13.* **Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ.** Biochim Biophys Acta 2009, 1792:3–13.
300. *Autophagosome and phagosome.* **Deretic V.** Methods Mol Biol. 2008;445:1-10. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_1.
301. *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.* **Klionsky DJ et al.** Autophagy. 2012 Apr;8(4):445-544.
302. *Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases.* **Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P.** J Pathol. 2012 Jan;226(2):380-93. doi: 10.1002/path.3000.
303. *Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities.* **Kim I, Xu W, Reed JC.** Nat Rev Drug Discov. 2008 Dec;7(12):1013-30. doi: 10.1038/nrd2755.
304. *A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure.* **Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, Mathivanan S, Collins C, Liem M, Goodall KJ, Ravichandran KS, Hulett MD, Poon IK.** Nat Commun. 2015 Jun 15;6:7439. doi: 10.1038/ncomms8439.
305. *Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs.* **Wickman GR, Julian L, Mardilovich K, Schumacher S, Munro J, Rath N, Zander SA, Mleczak A, Sumpton D, Morrice N, Bienvenut WV, Olson MF.** Cell Death Differ. 2013 Oct;20(10):1293-305. doi: 10.1038/cdd.2013.69. Epub 2013 Jun 21.
306. *Structural and functional anatomy of the abdominal wall.* **Grevious MA, Cohen M, Shah SR, Rodriguez P.** Apr, Clin Plast Surg. 2006; 33(2):169-79, v.
307. *Natural tissue microenvironmental conditions modulate adhesive material performance.* **Oliva N, Shitreet S, Abraham E, Stanley B, Edelman ER, Artzi N.** Langmuir. 2012 Oct 30;28(43):15402-9. doi: 10.1021/la303155p. Epub 2012 Oct 18.
308. *Abdominal muscle function and incisional hernia: a systematic review.* **Jensen KK, Kjaer M, Jorgensen LN.** Hernia. 2014 Aug;18(4):481-6.

309. *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis.* **Lieber RL, Ward SR.** Am J Physiol Cell Physiol. 2013 Aug 1;305(3):C241-52. doi: 10.1152/ajpcell.00173.2013. Epub 2013 Jun 12.
310. *Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting.* **Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S, De Pauw E, Castronovo V.** Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting : s.n., Int J Cancer. 2010 Feb 1;126(3):640-50. doi: 10.1002/ijc.24812.
311. *Versican and the control of inflammation.* **Wight TN, Kang I, Merrilees MJ.** Matrix Biol. 2014 Apr;35:152-61. doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.015. Epub 2014 Feb 7.
312. *Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration.* **Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM.** Annu Rev Cell Dev Biol. 2010;26:315-33. doi: 10.1146/annurev.cellbio.011209.122036.
313. *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.* **Hinz B.** J Invest Dermatol. 2007 Mar;127(3):526-37.
314. *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement.* **Li B, Wang JH.** J Tissue Viability. 2011 Nov;20(4):108-20. Epub 2009 Dec 7.
315. *Stress fibers guide focal adhesions to maturity.* **Short B.** J Cell Biol. 2012 Feb 6; 196(3): 301.
316. *Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring.* **Ciobanasu C, Faivre B, Le Clairche C.** Nat Commun. 2014;5:3095. doi: 10.1038/ncomms4095.
317. *Cell sheet integrity and nanomechanical breakdown during programmed cell death.* **Wang J, Pelling AE.** Med Biol Eng Comput. 2010 Oct;48(10):1015-22. doi: 10.1007/s11517-010-0640-z. Epub 2010 Jun 10.
318. *Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia.* **Helfand BT, Mendez MG, Murthy SN, Shumaker DK, Grin B, Mahammad S, Aebi U, Wedig T, Wu YI, Hahn KM, Inagaki M, Herrmann H, Goldman RD.** Mol Biol Cell. 2011 Apr 15;22(8):1274-89. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0699. Epub 2011 Feb 23.
319. *Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments.* **Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD.** 2004, J Cell Sci. , pp. Feb 29;117(Pt 6):919-32.
320. *“Heads and tails” of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights.* **Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J.** Trends Biochem Sci. 2006; 31:383–394.
321. *Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments.* **Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC.** 2007 Jun 10, Exp Cell Res, pp. 313(10):2098-109.
322. *Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton.* **Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K.** Cytoskeleton (Hoboken). 2010 Sep;67(9):545-54. doi: 10.1002/cm.20472.
323. *Mechanical properties of the human abdominal wall measured in vivo during insufflation for laparoscopic surgery.* **Song C, Alijani A, Frank T, Hanna GB, Cuschieri A.** Surg Endosc 2006 Jun;20(6):987-90. Epub 2006 May 12.
324. *Effect of suture technique on the occurrence of incisional hernia after elective midline abdominal wall closure: study protocol for a randomized controlled trial.* **Fortelny RH, Baumann P, Thasler WE, Albertsmeier M, Riedl S, Steurer W, Kewer JL, Shamiyeh A.** Trials. 2015 Feb 15;16:52. doi: 10.1186/s13063-015-0572-x.

325. *Versican and the regulation of cell phenotype in disease.* **Wight TN, Kinsella MG, Evanko SP, Potter-Perigo S, Merrilees MJ.** *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1840(8):2441-51. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.12.028. Epub 2014 Jan 5.
326. *Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior.* **Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Marco-Ramell A, Bassols A.** *Int J Mol Med.* 2011 Feb;27(2):269-75. doi: 10.3892/ijmm.2010.577. Epub 2010 Dec 6. Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Marco-Ramell A, Bassols A.
327. *Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients.* **Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y, Wight TN.** *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):119-31.
328. *Expression of versican V3 by arterial smooth muscle cells alters tumor growth factor β (TGF β)-, epidermal growth factor (EGF)-, and nuclear factor κ B (NF κ B)-dependent signaling pathways, creating a microenvironment that resists monocyte adhesion.* **Kang I, Yoon DW, Braun KR, Wight TN.** *J Biol Chem.* 2014 May 30;289(22):15393-404. doi: 10.1074/jbc.M113.544338. Epub 2014 Apr 9.
329. *Novel insight into the biological functions of syndecan ectodomain core proteins.* **De Rossi G, Whiteford JR.** *Biofactors.* 2013 Jul-Aug;39(4):374-82. doi: 10.1002/biof.1104. Epub 2013 Apr 5.
330. *Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in periodontal wound healing of syndecan-1 and -2 in periodontal wound healing of the rat.* **Worapamorn W, Xiao Y, Li H, Young WG, Bartold PM.** *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):293-9.
331. *Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4.* **Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P.** *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(2):R9-R14.
332. *Structure and functions of syndecans in vertebrates.* **Leonova EI, Galzitskaya OV.** *Biochemistry (Mosc).* 2013 Oct;78(10):1071-85. doi: 10.1134/S0006297913100015.
333. *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.* **Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G.** *Cell Death Differ* 2007, 14:1237–1243.
334. *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in micro- wave-processed formalin-fixed paraffin sections.* **Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J.** *J Pathol.* 1992; 168: 357-363.
335. *Cytoskeleton and apoptosis.* **Ndozangue-Touriguine O, Hamelin J, Bréard J.** *Biochem Pharmacol* 2008, 76:11–18.
336. *Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis.* **Blain EJ, Gilbert SJ, Hayes AJ, Duance VC.** *Matrix Biol* 2006, 25:398 – 408.
337. *Substrate stiffness regulates solubility of cellular vimentin.* **Murray ME, Mendez MG, Janmey PA.** *Mol Biol Cell.* 2014 Jan;25(1):87-94. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0326. Epub 2013 Oct 30.
338. *Mechanical properties of mesh materials used for hernia repair and soft tissue augmentation.* **Pott PP, Schwarz ML, Gundling R, Nowak K, Hohenberger P, Roessner ED.** *PLoS One.* 2012;7(10):e46978. doi: 10.1371/journal.pone.0046978. Epub 2012 Oct 12.
339. *Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis.* **Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG.** *J Biol Chem* 1998, 273:15540 –15545.

340. *Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells.* **Scovassi IA, Diederich M.** *Biochem Pharmacol* 2004, 68:1041–1047.
341. *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging.* **Altmeyer M, Hottiger MO.** *Aging (Albany NY)*. 2009 May 20;1(5):458-69.
342. *Production of cytokines at the operation site.* **Di Vita G, Patti R, Vetri G, Macchiarella B, D'Agostino P, Caruso G, Ferlazzo V, Arcoleo F, Sammartano S, Angileri M, Cillari E.** *G Chir.* 2005 Jun-Jul;26(6-7):241-5.
343. *UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response.* **Senft D, Ronai ZA.** *Trends Biochem Sci.* 2015 Mar;40(3):141-8. doi: 10.1016/j.tibs.2015.01.002. Epub 2015 Feb 2.
344. *TNF α modulates protein degradation pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.* **Connor AM, Mahomed N, Gandhi R, Keystone EC, Berger SA.** *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(2): R62.
345. *Versican in inflammation and tissue remodeling: the impact on lung disorders.* **Andersson-Sjöland A, Hallgren O, Rolandsson S, Weitoft M, Tykesson E, Larsson-Callert AK, Rydell-Törmänen K, Bjermer L, Malmström A, Karlsson JC5, Westergren-Thorsson G.** *Glycobiology.* 2015 Mar;25(3):243-51. doi: 10.1093/glycob/cwu120. Epub 2014 Nov 3.
346. *Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells.* **Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C.** *Cardiovasc Res.* 2014; May 1;102(2):258-69. doi: 10.1093/cvr/cvu062. Epub 2014 Apr 11.
347. *Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins.* **Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Schulze K, Schultheiss HP.** *Biochemistry Research International.* 2012. Volume 2012, Article ID 875742.
348. *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease.* **Wynn TA, Ramalingam TR.** *Nat Med.* 2012 Jul 6;18(7):1028-40. doi: 10.1038/nm.2807.
349. *TNF- α suppresses α -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing.* **Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL.** *J Invest Dermatol.* 2007 Nov;127(11):2645-55. Epub 2007 May 31.
350. *Evidence of the TNF- α system in the human Achilles tendon: expression of TNF- α and TNF receptor at both protein and mRNA levels in the tenocytes.* **Gaida JE, Bagge J, Purdam C, Cook J, Alfredson H, Forsgren S.** *Cells Tissues Organs.* 2012;196(4):339-52. Epub 2012 May 8.
351. *Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading.* **Kjaer M.** 2004, *Physiol. Rev.*, págs. 84: 649-698.
352. *Turning terminally differentiated skeletal muscle cells into regenerative progenitors.* **Wang H, Lööf S, Borg P, Nader GA, Blau HM, Simon A.** *Nat Commun.* 2015 Aug 5;6:7916. doi: 10.1038/ncomms8916.
353. *Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation.* **Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11025-30. Epub 2002 Aug 12.
354. *Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ.* **Pedersen BK, Febbraio MA.** *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Apr 3;8(8):457-65.
355. *Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?* **Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL.** *FEBS J.* 2013 Sep;280(17):4131-48.

356. *Can muscle regeneration fail in chronic inflammation: a weakness in inflammatory myopathies?* **Loell I, Lundberg IE.** J Intern Med. 2011 Mar;269(3):243-57.
357. *In the idiopathic inflammatory myopathies (IIM), do reactive oxygen species (ROS) contribute to muscle weakness?* **Lightfoot AP, McArdle A, Jackson MJ, Cooper RG.** Ann Rheum Dis. 2015 Jul;74(7):1340-6. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207172. Epub 2015 Apr 28.
358. *Structural alterations of skeletal muscle in copd.* **Mathur S, Brooks D, Carvalho CR.** Front Physiol. 2014 Mar 19;5:104. doi: 10.3389/fphys.2014.00104. eCollection 2014.
359. *Cancer cachexia.* **Tisdale MJ.** Curr Opin Gastroenterol. 2010 Mar;26(2):146-51.
360. *Beyond atrophy: redox mechanisms of muscle dysfunction in chronic inflammatory disease.* **Reid M B, Moylan S J.** J Physiol 589.9 (2011) pp 2171–2179 2171.
361. *Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms.* **Theocharis AD, Karamanos NK.** Atherosclerosis. 2002 Dec;165(2):221-30.
362. *The injury response of aged tendons in the absence of biglycan and decorin.* **Dunkman AA, Buckley MR, Mienaltowski MJ, Adams SM, Thomas SJ, Kumar A, Beason D, Iozzo RV, Birk DE, Soslowsky LJ.** Matrix Biol. 2014 Apr;35:232-8.
363. *The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis.* **Nandadasa S, Foulcer S, Apte SS.** Matrix Biol. 2014 Apr;35:34-41. doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.005. Epub 2014 Jan 18.
364. *Versican processing by a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats proteinases-5 and -15 facilitates myoblast fusion.* **Stupka N, Kintakas C, White JD, Fraser FW, Hanciu M, Aramaki-Hattori N, Martin S, Coles C, Collier F, Ward AC, Apte SS, McCulloch DR.** J Biol Chem. 2013 Jan 18;288(3):1907-17. doi: 10.1074/jbc.M112.429647. Epub 2012 Dec 11.
365. *Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis.* **Mathew SJ, Hansen JM, Merrell AJ, Murphy MM, Lawson JA, Hutcheson DA, Hansen MS, Angus-Hill M, Kardon G.** Development. 2011 Jan;138(2):371-84. doi: 10.1242/dev.057463.
366. *Tumour necrosis factor and cancer.* **Waters JP, Pober JS, Bradley JR.** J Pathol. 2013 Jul;230(3):241-8. doi: 10.1002/path.4188.
367. —. **Balkwill F.** Nat Rev Cancer. 2009 May;9(5):361-71. doi: 10.1038/nrc2628. Epub 2009 Apr 3.
368. *TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases.* **Faustman D, Davis M.** Nat Rev Drug Discov. 2010 Jun;9(6):482-93. doi: 10.1038/nrd3030. Epub 2010 May 21.
369. *Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin.* **Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO.** Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):209-217. Epub 2010 Jan 31.
370. *Tumor necrosis factor: an apoptosis JunKie?* **Varfolomeev EE, Ashkenazi A.** Cell. 2004 Feb 20;116(4):491-7.
371. *Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis.* **Bannerman DD, Goldblum SE.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Jun;284(6): L899-914.

372. *Cycloheximide-mediated sensitization to TNF-alpha-induced apoptosis in human colorectal cancer cell line COLO 205; role of FLIP and metabolic inhibitors.* **Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A.** *J Physiol Pharmacol.* 2005 Jun;56 Suppl 3:101-18.
373. *FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications.* **Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD.** *Nat Rev Cancer.* 2014 Sep;14(9):598-610. doi: 10.1038/nrc3792. Epub 2014 Aug 7.
374. *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions.* **Schaller MD.** *J Cell Sci.* 2010 Apr 1;123(Pt 7):1007-13. doi: 10.1242/jcs.045112.
375. *Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation.* **Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D.** *Mol Cell.* 2008 Jan 18;29(1):9-22. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.031.
376. *Turnover of focal adhesions and cancer cell migration.* **Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M.** *Int J Cell Biol.* 2012;2012:310616. doi: 10.1155/2012/310616. Epub 2012 Jan 26.
377. *Increased expression and possible role of chitinase 3-like-1 in a colitis-associated carcinoma model.* **Ma JY, Li RH, Huang K, Tan G, Li C, Zhi FC.** *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 14;20(42):15736-44. doi: 10.3748/wjg.v20.i42.15736.
378. *Chitinase 3-like 1 suppresses injury and promotes fibroproliferative responses in Mammalian lung fibrosis.* **Zhou Y, Peng H, Sun H, Peng X, Tang C, Gan Y, Chen X, Mathur A, Hu B, Slade MD, Montgomery RR, Shaw AC, Homer RJ, White ES, Lee CM, Moore MW, Gulati M, Geun Lee C, Elias JA, Herzog EL.** *Sci Transl Med.* 2014 Jun 11;6(240):240ra76. doi: 10.1126/scitranslmed.3007096.
379. *YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression.* **Libreros S, Iragavarapu-Charyulu V.** *J Leukoc Biol.* 2015 Aug 26. pii: jlb.3VMR0415-142R.
380. *Potential association between TLR4 and chitinase 3-like 1 (CHI3L1/YKL-40) signaling on colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer.* **Kamba A, Lee IA, Mizoguchi E.** *Curr Mol Med.* 2013 Aug;13(7):1110-21.
381. *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* **McInnes IB, Schett G.** *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):429-42.
382. *Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells.* **Wang Y, Li L, Guo X, Jin X, Sun W, Zhang X, Xu RC.** *Cytokine.* 2012 Aug;59(2):228-36. doi: 10.1016/j.cyto.2012.04.020. Epub 2012 May 15.
383. *The role of matrix stiffness in regulating cell behavior.* **RG, Wells.** *Hepatology.* 2008 Apr;47(4):1394-400. doi: 10.1002/hep.22193.
384. *Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair.* **Midwood KS, Mao Y, Hsia HC, Valenick LV, Schwarzbauer JE.** *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2006 Sep;11(1):73-8.
385. *Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors.* **Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M.** *Cancers.* 2013;5(1):27-47. doi:10.3390/cancers5010027.
386. *Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis.* **Lowin T, Straub RH.** *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):244. doi: 10.1186/ar3464. Epub 2011 Oct 28.

387. *The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation.* **Matsui A, Kamada Y, Matsuura A.** PLoS Genet. 2013;9(1):e1003245. doi: 10.1371/journal.pgen.1003245. Epub 2013 Jan 31.

388. *Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells.* **Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL, Lenz G.** PLoS One. 2011;6(6):e20849. doi: 10.1371/journal.pone.0020849. Epub 2011 Jun 13.

389. *Autophagy in cell death: an innocent convict?* **Levine B, Yuan J.** J Clin Invest. 2006 Dec;116(12):3293.

390. *Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage.* **Ganem NJ, Pellman D.** J Cell Biol. 2012 Dec 10;199(6):871-81. doi: 10.1083/jcb.201210040.

391. *Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue.* **Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP.** Mol Cancer Res. 2012 Nov;10(11):1403-18. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0307. Epub 2012 Sep 28.

392. *Substrate stiffness-regulated matrix metalloproteinase output in myocardial cells and cardiac fibroblasts: implications for myocardial fibrosis.* **Xie J, Zhang Q, Zhu T, Zhang Y, Liu B, Xu J, Zhao H.** Acta Biomater. 2014 Jun;10(6):2463-72. doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.031. Epub 2014 Feb 6.

393. *Soft matrix is a natural stimulator for cellular invasiveness.* **Gu Z, Liu F, Tonkova EA, Lee SY, Tschumperlin DJ, Brenner MB.** Mol Biol Cell. 2014 Feb;25(4):457-69. doi: 10.1091/mbc.E13-05-0260. Epub 2013 Dec 11.

394. *Studies on Focal Adhesion Kinase in human breast cancer cell MDA-MB-231 on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity.* **Maity G, Choudhury PR, Sen T, Ganguly KK, Sil H, Chatterjee A.** Tumour Biol. 2011 Feb;32(1):129-38. doi: 10.1007/s13277-010-0106-9. Epub 2010 Sep 7.

9 Anexo

Artículos publicados

- *Apoptosis-like cell death induction and aberrant fibroblast properties in human incisional hernia fascia. Am J Pathol* 2011; 178(6):2641-2653. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.044 (COVER ARTICLE). PMID: 21641387; PubMed Central PMCID: PMC3124017
Autores: Diaz R, Quiles MT, Guillem-Martí J, Lopez-Cano M, Huguet P, Ramon-Y-Cajal S, Reventos J, Armengol M, Arbos MA

- *MMPs/TIMPs and inflammatory signalling de-regulation in human incisional hernia tissues. J Cell Mol Med* 2009; 13(11-12):4432-4443. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00637.x.PMID: 19397782
Autores: Guillen-Martí J, Diaz R, Quiles MT, Lopez-Cano M, Vilallonga R, Huguet P, Ramon-y-Cajal S, Sanchez-Niubo A, Reventós J, Armengol M, Arbos

Comunicaciones en congresos

- Autores: MA Arbós Via, MT Quiles, J Guillen, R Díaz, MI Armengol, MI López-Cano.
Título: *Clues to incisional hernia disease from human primary fibroblasts gene expression profiling.*
Tipo de contribución: Póster
Congreso: 32nd International Congress of European Hernia Society
Publicación: *Hernia* (2010) 14 (Suppl 1):S55–S100
Lugar: Estambul, 6-9 de octubre de 2010
Organismo/institución organizadora: European Hernia Society (www.europeanherniasociety.eu)

- Autores: M Lopez Cano, R Díaz Peña, MT Quiles Pérez, J Guillen Martí, J Reventós Puigjaner, M Armengol Carrasco, MA Arbós Via
Título: *An in vitro comparison of the interaction between polypropylene meshes and fascial primary fibroblasts from incisional-hernia and control patients*
Congreso: Joint Meeting of the AHS and EHS
Publicación: *Hernia* (2009) 13 (Suppl 1):S73–S104
Lugar: Berlín, 9-12 setiembre de 2009
Organismo/institución organizadora: European Hernia Society (www.europeanherniasociety.eu)

Becas

- Título: Bases moleculares de la hernia incisional: de la transcriptómica a la clasificación de pacientes para un enfoque personalizado de la enfermedad.
Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria - ISCIII.
Nº DE PROYECTO: PI13/00301
DURACIÓN: 2014-2016
IP: Armengol Carrasco, Manel
I Cols.: Arbós Via, M^a Antònia; Quiles Pérez, M^a Teresa; López Cano, Manuel

- Título: Cambios en las características del tejido conectivo abdominal de pacientes con hernia incisional. Activación de fibroblastos. Integración a biomateriales blandos
Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria - ISCIII.
Nº DE PROYECTO: PI07/0507
DURACIÓN: 2008-2010
IP: Armengol Carrasco, Manel
I Cols.: Arbós Via, M^a Antònia; López Cano, Manuel, Quiles Pérez, M^a Teresa

- Título: Identificación de marcadores diagnósticos y pronósticos en la hernia incisional. Establecimiento y caracterización de perfiles fenotípicos y de mecano-señalización en tejido conectivo y muscular
Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria - ISCIII.
Nº DE PROYECTO: PI03/0290
DURACIÓN: 2004-2006
IP: Armengol Carrasco, Manel
I Cols.: Arbós Via, M^a Antònia; López Cano, Manuel, Quiles Pérez, M^a Teresa