

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departamento de Cirugía



Uso de matrices biodegradables enriquecidas con PRP, para restitución inmediata de volumen y regeneración tisular.

Autor: Eugenio José Peluffo

Dirigido por: Dr. Joan Francesc Julián

Dr. Antonio Vázquez

Dr. Jaume Fernández Llamazares

Trabajo de Investigación.

Convocatoria de Septiembre de 2012

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abreviaturas.....	2
1- Introducción.....	3
2- Hipótesis de trabajo.....	9
3- Objetivos.....	10
4- Material y Métodos.....	11
4.1 Primera Fase. Ensayos in vitro.....	11
4.1.1 Evaluación preliminar.....	11
4.1.2 Ensayos físico-químicos.....	11
4.1.3 Estudio de las propiedades biológicas in vitro.....	12
4.2 Segunda Fase: Estudio experimental in vivo.....	12
4.2.1. Lugar y personal.....	12
4.2.2 Animales de experimentación y condiciones de estabulación....	12
4.2.3 Quirófanos.....	13
4.2.4 Fibrina.....	13
4.2.5 PRP.....	13
4.2.6 Justificación del proyecto.....	14
4.2.7 Procedimiento quirúrgico.....	14
4.2.8 Seguimiento postoperatorio.....	15
4.2.9 Reintervención quirúrgica y eutanasia.....	15
5- PLAN DE TRABAJO.....	15
5.1 Estudio in vivo preliminar.....	15
5.2 Desarrollo del Estudio experimental in vivo completo.....	16
6- RECOGIDA DE DATOS.....	17
6.1 Datos clínicos.....	17
6.2 Datos analíticos.....	18
6.2.1 Fluorescencia.....	19
6.2.2 Bioluminiscencia.....	19
6.2.3 TAC.....	20
6.3 DATOS HISTOLÓGICOS.....	20
7- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	21

8- RESULTADOS PRELIMINARES.....	22
9- BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESÚMEN

Introducción

Diferentes biopolímeros, especialmente aquellos presentados en forma de hidrogel han sido estudiados en el campo de la ciencia biomédica por su aplicabilidad como agentes para restitución inmediata de volumen tras exéresis de tejidos, vehículos para entrega de moléculas bioactivas y como estructura tridimensional promotora de la regeneración tisular.

Se plantea este ensayo clínico a fin de determinar la utilidad de la matriz estructural biodegradable (ME, en trámite de licencia de patente) enriquecida con fibrina y/o PRP para restitución de volumen y regeneración tisular.

Material y Métodos

El estudio se desarrollará en dos fases relacionadas entre sí. La primera, in vitro, consistirá en la evaluación y la elección de la ME cuyas propiedades físico-químicas mejor se adapten al objetivo del estudio.

La segunda fase, in vivo, consiste en un estudio experimental con un total de 27 ratas, que se dividirán en tres grupos. Un grupo recibirá un implante de PRP solo, otro de ME + PRP y el último de ME + fibrina. Estudio a los 7, 14, 21 y 90 días mediante TAC con angiografía para observar angiogénesis periprotésica; fluorescencia y luminiscencia para monitorizar la biodistribución del implante y la inflamación respectivamente. Asimismo estudio histológico a los 90 días de la zona de implantación del material.

Resultados Preliminares

Tras evaluación macroscópica se opta por una matriz porosa liofilizada con alto potencial de absorción y la facilidad por simple imbibición.

En 20 minutos la esponja se consigue la rehidratación tanto en PRP como en agua; se observa una textura gelatinosa, adoptando en el caso del PRP el color amarillo característico.

Abreviaturas

- **ME:** Matriz estructural.
- **PRP:** Plasma rico en plaquetas.
- **PVA:** alcohol polivinílico.
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- **GAG:** glicosaminoglicanos.
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno.

1. INTRODUCCIÓN

La cirugía Plástica y Reparadora se ocupa de la corrección quirúrgica de todo proceso congénito, adquirido, tumoral o simplemente involutivo que requiera reparación o reposición de estructuras superficiales que afecten a la forma y función corporal¹.

Para tal fin se utilizan diferentes técnicas quirúrgicas basadas en la movilización y transplantes de tejidos y la utilización de implantes de material inerte. Entre las más utilizadas se destacan los injertos de piel y grasa, la expansión tisular, los colgajos locales y libres y el uso de prótesis biocompatibles.²

El uso de tejidos propios del paciente descarta la posibilidad de rechazos por incompatibilidad y reacciones a cuerpo extraño, pero, en menor o mayor medida, producirán un defecto o déficit secundario en la zona de obtención de dicho tejido.

Los avances quirúrgicos en las últimas décadas han sido capaces de minimizar estos defectos secundarios, pero no de eliminarlos, por lo que el sueño de todo cirujano reconstructivo continúa siendo el desarrollo de tejidos o materiales biocompatibles, capaces de sustituir o reparar las estructuras primarias afectadas.

La posibilidad de reparar o reemplazar tejidos dañados, mediante la formación de sustitutos biológicos (ingeniería de tejidos), es un campo relativamente nuevo y en continua expansión.³

La ingeniería de tejidos aplica los conocimientos de la bioingeniería, química, física y biología, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos. Se basa en el uso de células vivas, o de sus componentes extracelulares, combinado con el desarrollo de matrices estructurales que permitan y estimulen o favorezcan la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado.⁴

La gran mayoría de las estructuras de soporte desarrolladas para aplicaciones médicas en el campo de la Ingeniería de Tejidos están constituidas a partir de materiales poliméricos (biopolímeros).

Los biopolímeros, según su origen, pueden ser naturales o sintéticos y de acuerdo a su funcionalidad pueden clasificarse en permanentes o degradables.⁵

El desarrollo de estas matrices estructurales, que van a utilizarse como soporte para conseguir un crecimiento celular tridimensional y aprovechar los productos que las propias células generan para ir recomponiendo un entramado celular, debe ajustarse a una serie de características físicas y químicas, de tal manera que se adapten a unas propiedades comunes: ser biocompatibles, biodegradables, carecer de potencial carcinogénico, no ser tóxicos para el organismo y presentar tolerancia a la esterilización previa a su uso.^{6,7}

Deben contar con unas propiedades mecánicas en cuanto a permeabilidad, elasticidad, plasticidad, estabilidad que permitan su producción en diferentes formas y se adapten a distintas estructuras.^{6,7,8}

Durante los años 60 y 70, tuvo lugar la primera generación de biomateriales. En este período de tiempo, la meta era obtener materiales cuyas propiedades físicas se adaptaran lo mejor posible a las del tejido a reemplazar, y que reaccionaran mínimamente con el tejido circundante, es decir, materiales inertes. A partir de los años 80, surge una segunda generación de biomateriales. Esta vez, el objetivo era crear materiales que indujeran una reacción controlada por parte del tejido vivo, es decir, materiales bioactivos como los vidrios bioactivos de silicio y la hidroxiapatita. Durante esta segunda generación, también tienen lugar los materiales bioabsorbibles, como los polímeros biodegradables principalmente.^{9,10,11,12}

Actualmente nos encontramos en la tercera generación de biomateriales. Los materiales diseñados en esta generación, buscan interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, y combinan las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material.^{9,10,11,12}

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales, biocompatibles, capaces de absorber líquidos (agua o fluidos corporales) sin disolverse y liberarlos con el tiempo. Debido a sus características constituyen materiales con interesantes aplicaciones en medicina, tales como restitución de volumen en pérdida o exéresis de tejidos, vehículo para la liberación de moléculas

bioactivas o redes tridimensionales estructurales que pueden albergar células y estimular la formación de un tejido de interés.^{13,14,15,16,17}

Los hidrogeles se pueden obtener a partir de polímeros naturales, por ejemplo, colágeno, quitosán, fibrina y sintéticos, óxido de polietileno, ácido poliacrílico, polivinil pirrolidona, alcohol polivinílico, por medio de procesos físicos y químicos.¹⁸

Las propiedades biológicas determinan que el material sea diseñado para no producir citotoxicidad ni daño a los tejidos adyacentes. Además las estructuras naturales que ya existen previamente en el organismo pueden promover funciones celulares como adherencia, proliferación, diferenciación y el desarrollo de tejido.^{16,18,19}

Las propiedades físico-químicas incluyen el mecanismo de formación del gel, el comportamiento de degradación y las características mecánicas como elasticidad, compresión, viscosidad, relajación y tensión. Estas características están determinadas por las propiedades intrínsecas de la cadena polimérica y de polimerización o gelificación conocido como “cross-linking”.^{15,20}

Los hidrogeles se están utilizando ampliamente en medicina como sistemas de suministro de medicamentos, apósticos húmedos, matrices para el cultivo de células, lentes de contacto.^{21,22}

Además existen muchos ensayos clínicos con alentadores resultados donde se utilizan en combinación con proteínas y células madre en terapias de regeneración de tendones, piel, ligamentos y cartílago, regeneración de nervios del SNC, regeneración de cuerdas vocales.²³⁻²⁶

El alcohol polivinílico o polivinil alcohol (PVA) es un polímero hidrofílico, estable durante largos períodos en diferentes condiciones de temperatura y pH.²⁷

Puede obtenerse por entrecruzamiento físico, mediante ciclos de congelamiento/descongelamiento o químico, acetalización con dialdehidos, para así, de una manera sencilla, obtener hidrogeles con propiedades adecuadas para su aplicación en el área médica. Las características del alcohol polivinílico, su concentración, la temperatura y los ciclos de congelamiento/descongelamiento determinan las propiedades del hidrogel obtenido.^{16,17}

El fibrinógeno y la fibrina juegan un papel importante en la coagulación sanguínea, la fibrinólisis, interacciones con la matriz celular, curación de heridas, inflamación y angiogénesis. La contribución de la fibrina para estos procesos depende no sólo de sus propias características, sino también de las interacciones específicas entre los sitios de unión de la fibrina con proenzimas, factores de coagulación, enzimas inhibidoras y las células receptoras.³⁰

La fibrina ha sido aprobada por la FDA para su uso clínico como agente hemostático y adhesivo.

La utilización como sellante se encuentra indicada en casi todas las especialidades quirúrgicas donde se requiera actividad hemostática, sellado de cavidades y adhesión de tejidos.

La primera utilidad como adhesivo fue para reparación de nervios periféricos. Desde entonces su empleo se ha extendido a múltiples campos de la cirugía. Muchos estudios describen su utilización en reparación de defectos osteocondrales, para fijación de injertos y como potenciador óseo actuando como agente osteoconductor y osteoinductor.^{29,31}

Los adhesivos de fibrina se han utilizado en una variedad de entornos clínicos para promover la cicatrización de una herida. Al igual que con los modelos animales, la utilidad de estos adhesivos varía con el contexto clínico. En algunas situaciones, tales como exéresis de linfangioma quístico, cirugía endoscópica de los senos maxilares o reparación de desgarros meniscales los adhesivos de fibrina parecen promover una mejora sustancial sobre los procedimientos quirúrgicos tradicionales.³² Sin embargo, no se obtienen buenos resultados en reducción de producción de seroma después de una mastectomía radical y / o disección de los ganglios linfáticos, en comparación con los resultados en modelos animales.^{33,34}

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) o Plasma Rico en Factores de Crecimiento, es una suspensión concentrada de la sangre centrifugada que contiene elevados niveles de trombocitos, los que a su vez contienen cierto

número de factores de crecimiento. Éstos son proteínas que desempeñan un papel esencial en la migración, diferenciación y proliferación celular.

Los factores de crecimiento tienen un elevado coste económico y son necesarias dosis repetidas para conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente.³⁵ Por este motivo, la hipótesis de trabajo que ha conducido al desarrollo del PRP es que en un producto con mayor concentración de plaquetas, los niveles de factor de crecimiento aumentarían en relación lineal con el número de plaquetas.³⁶

A partir de un concentrado de plaquetas (PRP) que se activa por la adición de un activador de la cascada de coagulación, como ser el exceso del ión calcio (cloruro cálcico), la trombina, o la baxotrombina, entre otros, se obtiene como resultado la formación de una substancia gelatinosa conocida como gel de plaquetas.

De este modo se utilizan las plaquetas como fuente exógena de factores de crecimiento que, en algunos casos, refuerzan las concentraciones ya existentes en el tejido a aplicar y en otros actúan en concierto con éstos, estimulando la actividad celular.

Actualmente el gel de plaquetas se utiliza ampliamente en cirugía dental y oral-maxilo-facial, sobre todo en implantología y regeneración ósea.³⁷⁻³⁹ También se ha aplicado para favorecer la granulación y epitelización heridas crónicas, úlceras y tejidos blandos.⁴⁰ Se ha descrito también su utilidad en cirugía plástica facial como adyuvante en el proceso de cicatrización, incremento de los procesos de reparación tisular de tejidos blandos y óseos, disminución de las tasas de infección postoperatoria, del dolor y de las pérdidas hemáticas.⁴¹⁻⁴⁴

En los últimos años se puso en marcha en el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (HUGTiP) una línea de investigación sobre el uso del gel de plaquetas para restitución inmediata de volumen y regeneración de tejido tras tumorectomía en cirugía de cáncer de mama. Los resultados iniciales son alentadores, sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes presentan una marcada pérdida del volumen inicial conseguido debido a la reabsorción del gel de plaquetas.

Teniendo en cuenta las características de soporte estructural y liberación progresiva y gradual de sustancias por parte de los hidrogeles, la acción de la fibrina en el proceso de hemostasia y activador del proceso de cicatrización y la capacidad del gel de plaquetas para la restitución de volumen y regeneración tisular, se diseñó un ensayo clínico a fin de determinar la utilidad de la combinación de una matriz estructural con fibrina y/o PRP para la restitución de volumen y regeneración tisular subcutánea en animales de experimentación.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El uso de una matriz estructural (ME) biocompatible enriquecida con una molécula bioactiva (fibrina o PRP), permitiría una restitución inmediata de volumen en caso de exéresis de tejidos subcutáneos e iniciaría el proceso de regeneración tisular en la zona aplicada.

3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

3.1. OBJETIVO PRIMARIO

Comprobar si la utilización de una matriz estructural enriquecida con PRP o fibrina permite una restitución de volumen inmediata y estable en el tiempo, así como la regeneración tisular en la zona aplicada.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Selección del implante adecuado a partir de los resultados obtenidos in vitro para a posteriori evaluar su comportamiento in vivo.
- Evaluar mediante pruebas físico-químicas la ME candidata a implante.
- Evaluar mediante cultivo celular el comportamiento y la interacción entre célula-ME.
- Monitorización de la inflamación aguda y crónica desencadenada por la ME.
- Evaluación de la biodistribución del implante, así como la posible toxicidad del producto.
- Evaluación de angiogénesis periprotésica.
- Comprobar la evolución temporal y estructural del volumen restituido.
- Determinar la presencia y grado de regeneración tisular en la zona aplicada.
- Evaluación macroscópica del implante postextracción.
- Determinar el nivel de reabsorción de la ME – Fibrina./ ME-PRP

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se desarrollará en dos fases relacionadas entre sí.

La primera fase, *in vitro*, consistirá en la evaluación y la elección de la ME cuyas propiedades físico-químicas mejor se adapten al objetivo del estudio.

La ME será proporcionada por el laboratorio BB y actualmente se encuentra en trámite de licencia de patente, por lo que no está permitido aportar mayores datos sobre su composición.

La segunda fase, *in vivo*, se dividirá de la siguiente manera:

- Estudio experimental preliminar con un reducido número de animales a fin de obtener resultados macroscópicos e histológicos que justifiquen la continuidad del estudio a mayor escala.
- Estudio experimental *in vivo* al completo, siguiendo los objetivos planteados para el mismo.

4.1 Primera Fase. Ensayos *in vitro*

4.1.1 Evaluación preliminar

Estudio y análisis macroscópico de la ME que difieren en su concentración, presentación o combinación con otros biopolímeros. El grupo de investigación implicado en el estudio las evaluará y decidirá las matrices que por su idoneidad como implante merecen ser estudiadas *in vitro* para evaluar en más profundidad sus propiedades.

4.1.2 Ensayos físico-químicos

- A) Porosidad de la matriz. La porosidad de la matriz será medida con microscopía electrónica de barrido. Dependiendo del tipo de matriz, será de interés estudiar sus propiedades como conductor tisular. Para permitir la migración de células (fibroblastos, células endoteliales, etc.) a través de ella, los poros deben ser sustancialmente más grandes que el tamaño medio de las células que participan activamente en la regeneración del tejido.

- B) Degradación de la matriz. Se mide la degradación física de la matriz en un buffer fisiológico a 37°C en agitación. Asimismo, si aplica, se ensayará la biodegradación in vitro y ex vivo.

4.1.3 Estudio de las propiedades biológicas in vitro

- A) Absorción de proteínas séricas a la matriz. Análisis de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)
- B) Cultivo celular: Cultivo de fibroblastos NIH3T3 sobre la matriz y análisis de la proliferación, viabilidad, adhesión e invasión celular así como histología (hematoxilina/ eosina) y análisis bioquímico de la producción de colágeno y glicosaminoglicanos (GAG).

4.2 Segunda Fase: Estudio experimental in vivo.

4.2.1. Lugar y personal.

Se realizará en el estabulario del Centro de experimentación animal de la Fundación Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias I Pujol por parte del equipo de investigación que realiza este ensayo. Se cuenta con la colaboración de los técnicos del estabulario expertos en mantenimiento y trato de los animales de experimentación y de la unidad de imagen in vivo del CEA.

. 4.2.2 Animales de experimentación y condiciones de estabulación

Para el estudio in vivo se utilizarán ratas de la cepa hembras desnudas atímicas obtenidas de Charles River Laboratorios, machos, adultos de 6 semanas de edad y con un peso corporal medio de 215-225 g.

Durante el estudio los animales se mantendrán bajo condiciones de estabulación convencional cumpliendo criterios de bienestar animal. A temperatura ambiental de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ con humedad relativa del 70% y ciclo de luz/oscuridad de 12h. Las ratas se alimentarán ad libitum con una dieta especial libre alfalfa Teklad Global Rodent Diet de Harlan, para eliminar el

background presentado por este ingrediente al realizar imagen de fluorescencia.

Los animales permanecerán estabulados entre 5-7 días posteriores a su llegada para acondicionarlos al nuevo ambiente antes de su utilización en el estudio.

4.2.3 Quirófanos

El quirófano donde se realizarán las intervenciones quirúrgicas siguen las normas higiénicas adecuadas antes y durante las intervenciones. Consta de los aparatos de inducción anestésica, respirador y material fungible que será utilizado durante las cirugías.

4.2.4 Fibrina

Se utilizará un adhesivo de fibrina de dos componentes. Se presenta en dos soluciones (proteína sellante y trombina) congeladas en jeringas precargadas y puede quedar listo para su uso en 20 -30 minutos si se descongela a una temperatura no superior a 37°C. Al mezclar la Solución de Proteína Sellante (Humana) y la Solución de Trombina (Humana) el fibrinógeno soluble se transforma en fibrina, formando una masa parecida a la silicona.

Dicha mezcla se realizará en un recipiente de porcelana que contenga una muestra de la ME de manera tal que se produzca una imbibición de la ME con la fibrina para su posterior implantación

4.2.5 PRP

Se obtendrá una dosis de plaquetas mediante un proceso de plaquetoféresis, que será suministrado por el servicio de hematología del HUGTiP. Para la realización de la plaquetoféresis se utilizará el separador celular MCS+ de Haemonetics™. La preparación del gel plaquetas se realizará en quirófano, agregando cloruro cálcico al concentrado de plaquetas, en una proporción del 10%. Dicha preparación se efectuará en un recipiente de porcelana que contenga en su interior una muestra de la ME, de manera tal que se produzca una imbibición del PRP en ME para su posterior implantación.

4.2.6 Justificación del proyecto

El estudio animal está justificado debido a la necesidad de constatar el comportamiento estructural y los cambios tisulares producidos tras la implantación del biomaterial en un organismo vivo para *a posteriori* poder realizar translación a la práctica clínica con pacientes.

Siguiendo los criterios de las tres “R” de Russell y Burch utilizaremos el mínimo número de animales gracias a los estudios de seguimiento por imagen que nos permitirán reducir el número de sacrificios y realizar un estudio longitudinal

4.2.7 Procedimiento quirúrgico

La intervención quirúrgica se realiza bajo anestesia general con sistema de anestesia de isoflurano en combinación con oxígeno y tiene una duración de aproximadamente 20 minutos.

Se induce la anestesia al 4% de isoflurano y 1,5L/min oxígeno mediante cámara de inducción.

Una vez adormecida la rata se traspasa al respirador y se mantiene entre el 1,5-2% de isoflurano y 1,5L/min de oxígeno. No se empezara ningún procedimiento hasta asegurar que el animal se encuentra sin reflejo, totalmente dormido y que no siente dolor.

Lograda la anestesia del animal y en condiciones de correcta higiene del espacio, material y personal, se coloca en decúbito supino, se depila el animal y se esteriliza el área donde se practicará la cirugía.

Se realizará una incisión mediana a nivel abdominal, disección subcutánea paramediana a fin de crear un bolsillo y colocación de implante. Se procede al Cierre cutáneo con seda 3/0 y a la administración de analgesia Meloxicam 5 mg/mL mediante inyección intraperitoneal antes de despertar al animal y devolverlo a una jaula individualizada con suficiente agua y comida .Se monitorizará la vuelta a la conciencia del animal.

4.2.8 Seguimiento postoperatorio

El postoperatorio será diario donde se monitorizarán signos de estres o desconfort, observación del sitio de incisión en busca de infección, inflamación o

dehiscencia de los puntos. Se tomarán acciones al respecto si se encuentra alguno de estos casos, se valorará el sufrimiento y si se considera necesario se procederá a la eutanasia del animal (Tabla 2)

4.2.9 Reintervención quirúrgica y eutanasia.

El día de la reintervención se procederá a la extracción de una biopsia de tejido en la zona del implante, bajo anestesia general y en las mismas condiciones descritas en el protocolo quirúrgico.

Para finalizar se practicará la eutanasia a punto final mediante anestesia inhalada (isoflurano 5%+ Oxígeno 1L/min) y una vez el animal está bien adormecido se procederá a la decapitación por guillotina.

Se procederá como primer medida al análisis macroscópico de las características del implante post- extracción conjuntamente con su degradación ex vivo.

Se tomará muestras de biopsias de tejido las cuales serán analizadas por el servicio de anatomía patológica del hospital para evaluar la regeneración tisular.

5. PLAN DE TRABAJO

5.1 Estudio in vivo preliminar.

En esta fase se procederá a la implantación de la muestra de PVA seleccionada en la fase in-vitro, en tres animales de experimentación. Estos se mantendrán bajo seguimiento de tres semanas, posterior sacrificio y evaluación de los resultados macroscópicos e histológicos.

De esta manera si los resultados no son los esperados se dará por finalizado el proyecto y se evitará el sacrificio innecesario de más animales de experimentación. En caso de obtener resultados satisfactorios, se procederá a la continuación del estudio, extendiendo el mismo según se detalla a continuación.

Criterios finalización del estudio:

- Reabsorción completa de la ME + PRP y ausencia de neiformación de tejido.

- Complicaciones que involucren el bienestar de la rata: sufrimiento, intoxicación, muerte.

5.2 Desarrollo del Estudio experimental *in vivo* completo.

La duración total del estudio será de 3 meses para comprobar la estabilidad del biomaterial durante largos periodos de implantación. El estudio piloto más el estudio experimental comportarán la utilización de un total de 27 ratas.

Grupos experimentales

Se utilizarán 27 ratas que se dividirán en tres grupos. Un grupo recibirá un implante de PRP solo, otro de ME + PRP y el último de ME + fibrina.

Se randomizará el estudio numerando los subtipos de implantes y se asignarán aleatoriamente a un número de rata.

- Grupo A (control): implante subcutáneo de PRP.
- Grupo B: implante subcutánea de ME + fibrina.
- Grupo C: implante de ME + PRP

Estos tres grupos se subdivirán a su vez en 4 subgrupos según el día de reintervención. Esta subdivisión se realiza según el tiempo de evolución desde la colocación del implante a fin de poder observar los cambios histológicos producidos en la zona del implante, la degradación del implante y inflamación de acuerdo a los objetivos planteados en este ensayo. (Tabla 1)

- Subgrupo 1. 7 días. Ratas 1, 2, 3, 13, 14, 15
- Subgrupo 2. 14 días. Ratas 4, 5, 6, 16, 17, 18
- Subgrupo 3. 30 días. Ratas 7, 8, 9, 19, 20, 21
- Subgrupo 4. 90 días. Ratas 10, 11, 12, 22, 23, 24

GRUPO	SUBGRUPO	RATAS	DIA		GRUPO	SUBGRUPO	RATAS	DIA	
A	I	1	7	B	I		13	7	
		2					14		
		3					15		
	II	4	14		II		16	14	
		5					17		
		6					18		
	III	7	30		III		19	30	
		8					20		
		9					21		
	IV	10	90		IV		22	90	
		11					23		
		12					24		

Tabla 1. Distribución esquemática de grupos, subgrupos, ratas y día de intervención de las mismas

6. RECOGIDA DE DATOS

6.1 Datos clínicos

Desde el momento de la intervención los animales se evaluarán según el protocolo de supervisión (Tabla 2) basado en las recomendaciones del Comité de Ética de la Fundación Instituto de investigación en Ciencias de la Salut Germans Trias i Pujol y aprobado por el comité de Ética en experimentación animal de la Dirección General de Medio Ambiente del Departamento de Medio Ambiente y Habitaje de la Generalitat de Cataluña.

Los datos son recogidos en forma de variables cuantitativas discretas con un valor de 0 a 3 para evaluar cada parámetro y una escala total al sumarlos de 0 a 10. Si se obtiene un 3 en más de un concepto, todos estos pasan a puntuarse como 4. Los valores considerados esperables o dentro de la

normalidad en un postoperatorio abdominal son entre 0 y 4, en estos casos se les administra analgesia pautada diluida en agua de su bebedor, Meloxicam en dilución de 1 mg/kg.

En los casos que el dolor sea de severidad intermedia (valores entre 5-7) se aplicará un segundo analgésico al animal, Buprenorfina a 0.05 – 0.1 mg/kg por vía subcutánea cada 12 hs hasta la mejora de estado del animal. Combinando los dos analgésicos se potencian los efectos y se evitan dosis tóxicas de los mismos.

En los animales con resultados de 7 o más se realizará la eutanasia a fin de evitar el sufrimiento del animal. Los datos se recogen como si fuera el día final del programa. En cualquier caso e independientemente de la puntuación total obtenida, cualquier animal con mutilaciones, comatoso o con indicadores de sufrimiento grave será inmediatamente sacrificado.

Observación de la rata		Conducta		Complicaciones postoperatorias	
Automutilaciones o vocalizaciones extrañas		Muy comatosa o agresiva			
Si	3	Si	3	Si	3
	0	No	0	No	0
Aspecto		Peso		Escala de severidad	
Normal		Normal	0	Baja	<5
Pelaje en mal estado		Pérdida < 10%	1	Intermedia	5-10
Secreciones óculo-nasales		Pérdida 10-20%	2	Alta	>10
Postura anormal		Pérdida > 20%	3		

Tabla Nro 2. Protocolo de supervisión de bienestar animal.

6.2. Datos Analíticos

Se procederá a realizar estudios de imagen por TAC con angiografía para observar angiogénesis periprotésica, fluorescencia y luminiscencia para monitorizar la biodistribución del implante y la inflamación respectivamente.

6.2.1 Fluorescencia

A fin de evaluar la biodistribución del implante de PVA y de la biomolécula se marcaran los 2 componentes con moléculas fluorescentes que emiten en canales NIR (infrarrojo cercano) diferentes, 800nm y 680 nm.

Las moléculas que emiten en el infrarrojo cercano presentan mayor sensibilidad debido a que en esta franja espectral el tejido propio presenta autofluorescencia mucho menor que a otras longitudes de onda.

Se realizaran imágenes a distintos tiempos (7, 14, 21 y 90 días) y se cuantificar la fluorescencia para mesurar la estabilidad del hidrogel durante el periodo de implantación in vivo.

En el caso de la biomolécula, el fluoróforo servirá de trazador para comprobar su comportamiento y su desaparición o estabilidad dentro del hidrogel. Este estudio se realizará con el detector de Fluorescencia Pearl imager de LI-COR Biosciences y se utilizará anestesia inhalada isoflurano 1,5-2% en combinación con oxígeno 1 L/min para la realización de las imágenes. Los fluoróforos empleados están aprobados para su uso en animales de experimentación.

6.2.2 Bioluminiscencia

El seguimiento de la inflamación in vivo se realizará mediante la administración IP de la sonda L-012 derivado del luminol por quimioluminiscencia para monitorizar especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por fagocitos como los neutrófilos del SI que contienen la enzima MPO. En condiciones fisiológicas encontramos cierto *background*, es decir niveles bajos de ROS generados por células que juegan un papel importante en la señalización celular y el mantenimiento de la homeostasis vascular. En cambio, en condiciones de inflamación los niveles de producción de ROS se elevan considerablemente como parte del mecanismo de defensa innata. Esta sonda nos permitirá medir a diferentes tiempos dos niveles de inflamación la aguda y la crónica. La sonda esta aprobada para su uso en animales de experimentación.

Las determinaciones se realizaran con Xenogen IVIS lumina II de Calliper, detector de BLI y Fluorescencia. Los animales estarán anestesiados en todo

momento ya que el equipo cuenta con sistema de anestesia propio de isoflurano y oxígeno. Se realizará la cuantificación de los fotones mediante el software del aparato y este dato nos dará información para comparar los grupos a estudio y controles.

6.2.3 TAC

Toma de imágenes con microtomógrafo TAC preclínico Skyscan 1076. Incorpora el uso de shutter y filtros de Al 0,5mm y Al 1mm como protectores de la radiación en el animal. El TAC incorpora equipo de anestesia isoflurano y oxígeno.

Evaluación de la angiogénesis periprotésica mediante administración de contraste y angioTAC.

Se procederá al abordaje de la arteria iliaca, canulación y administración de contraste intravenoso mediante bomba de infusión y se realizará la adquisición de imágenes de rayos X para posteriormente obtener reconstrucciones anatómicas seriadas mediante software.

6.3 DATOS HISTOLÓGICOS

El segmento a analizar histológicamente incluirá un centímetro de margen alrededor de la zona de implantación del material. En el momento de la extracción las piezas serán colocadas sobre una superficie plana, fijadas con agujas para evitar su retracción e introducidas en formol al 10%. El procesamiento y estudio de las muestras estará a cargo de Técnicos y especialistas en Anatomía Patológica del Hospital GermansTrias I Pujol.

La muestra será incluída en parafina y cortada. De los bloques obtenidos se realizarán secciones de 5 micrómetros mediante un micrótomo de hoja móvil. Se utilizarán tinciones de hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson.

Como indican los objetivos de nuestro, el estudio anatómo-patológico evaluará los cambios histológicos producidos alrededor del implante y la presencia de crecimiento de nuevo tejido entre la estructura del implante.

Para el estudio de la reacción inflamatoria de los tejidos circundantes al implante, fibrosis, neovascularización e infiltración de grasa, se utilizará el Anexo E de la normativa ISO 10993_6:2007 que basada en la bibliografía da

ejemplos de tablas para clasificar la reacción biológica local de los tejidos. Los datos se recojen en forma de variables cuantitativas discretas según la cantidad de células por campo.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados se analizarán mediante SPSS.

Se realizarán pruebas paramétricas y no paramétricas, tomando un nivel de significación del 5%

8. RESULTADOS PRELIMINARES Y DISCUSIÓN

Primera Fase. Ensayos in vitro.

Presentación y selección de la ME.

Como primera medida el personal a cargo de la investigación procedió a la inspección macroscópica de las ME aportadas por el laboratorio, a fin de seleccionar la mas idónea para la continuación del estudio. Por razones de protección de datos debido a trámites en la licencia de patentes, no está permitido la descripción y composición exacta de las mismas. Evidentemente cumplen con las propiedades comunes y establecidas para los biomateriales: biocompatibilidad, biodegradabilidad, ausencia de efectos tóxicos.

Se aportaron dos tipos de matrices.

La matriz nro 1 presentada en forma de gel, de consistencia semielástica.

La matriz nro 2 presentada en forma de lámina porosa, liofilizada (Fig.1)

De acuerdo a los objetivos de este ensayo donde se plantea el uso de la ME enriquecida con una molécula bioactiva, se consideró que la matriz porosa liofilizada era la mas idónea debido a su alto potencial de absorción y la facilidad por simple imbibición.

Se comprueba que es fácil de cortar y de manejar y se decide hacer una primera prueba embebiendo un fragmento con PRP y otro con agua.

En aproximadamente 20 minutos la esponja se ha rehidratado tanto en PRP como en agua; presenta una textura gelatinosa y en el caso del PRP ha adoptado el color amarillo característico. (Fig. 2.)



Fig. 1. Matriz estructural liofilizada

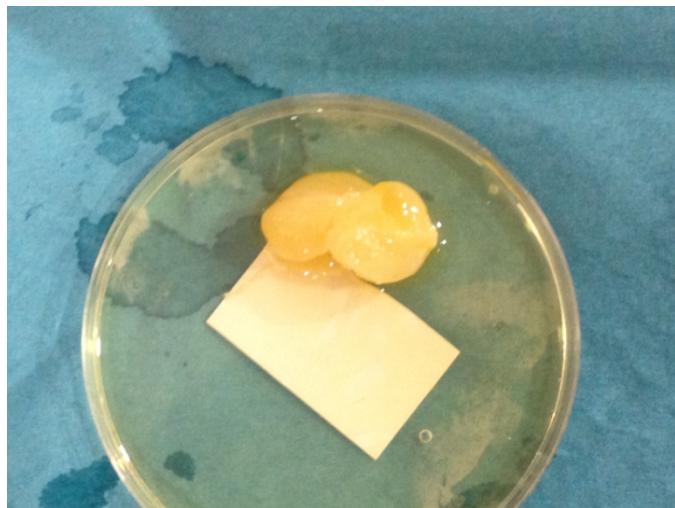


Fig. 2. Imbibición de la ME en PRP. Se observa Su aumento de volumen y aspecto gelatinoso.

Pensando en la utilización de la esponja en quirófano, el tiempo de rehidratación debería ser menor. Para facilitar la impregnación y acelerar el proceso, se sugiere aumentar el tamaño de los poros de la esponja. En el momento de la implantación, el gel de plaquetas debe estar bien gelificado para evitar complicaciones (reabsorción prematura, pérdidas)

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Programa de la Especialidad, aprobado por la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (Resolución 15-7-86), ratificado y actualizado en 1996, la Cirugía Plástica y Reparadora (CPL)
2. Definición y marco de la especialidad. Tema 1. 2-3. Manual de Cirugía Plástica de la SECPRE.
3. Patrick C. W. JR, McIntire L. V. Prospectus of Tissue Engineering en “Frontiers in Tissue Engineering”, 1983. Elsevier Science Ltd., 3.
4. Heineken F. G., Skalak R., Tissue Engineering: a brief overview, J. Biomechanical Engineering.1991; 113: 111-120.
5. Langer J., Vacanti P. Tissue Engineering. Science.1993.260: 920-926.
6. Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng.2001.7(6): 679:89.
7. Hutmacher D.W.Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. 2001a. J Biomater Sci Polym Edn 12(1):107–124
8. Tamer A.E. Ahmed, M.Sc., Emma V. Dare, B.Sc., and Max Hincke, Ph.D. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. 2008. *Tissue Engineering: Part B*, **14** (2): 199–215
9. Ratner,B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., (editores)- An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press. 1996, BioMaterials Science.
10. Cuadrado, T.R., 1996, "Ciencia y Mercado de Biomateriales, situación actual y perspectivas", Materiales - Ciencia y Mercado, 2:47-52.
11. Peppas, N.A., Langer, R., 1994, "New challenges in BioMaterials", Science, 263:1715-1720.
12. Von Recum, A.F., Laberge, M., 1995, "Educational Goals for BioMaterials Science and Engineering: Prospective View". Journal of Applied BioMaterials, 6:137-144.
13. Lapidot, S. A. and Kost, J.. "Hydrogels," in: Encyclopedia of Materials: Science and Technology, Elsevier Science.2001. 3878-3882.

14. Hoffman, A. S. "Hydrogels for biomedical applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002 vol. 54: 3-12.
15. Yoshii, F.; Makuuchi, K.; Darwis, D.; Iriawan, T.; Razzak, M. T. and Rosiak, J. M. "Heat resistance poly(vinyl alcohol) hydrogel". *Radiation Physics and Chemistry*. 1995. vol. 46: 169-174.
16. Hassan, C. M. and Peppas, N. "Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods". 2000a. *Advances in Polymer Science*. 153: 37-65.
17. Hassan, C. M. y Peppas, N. "Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels". *Macromolecules*. 2000b.33, pp. 2472-2479.
18. El Fray, M.; Pilaszkiewicz, A.; Swieszkowski, W. and Kurzydlowski, K. J. "Morphology assessment of chemically modified and cryostructured poly(vinylalcohol) hydrogel". *European Polymer Journal*. 2007.43 pp. 2035-2040.
19. Charles R. Nuttelman, Derek J. Mortisen, Scott M. Henry, Kristi S. Anseth. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001. **57** (2): 217-223.
20. Stammen, J. A.; Williams, S.; Ku, D. N. and Guldberg, R. E. "Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression". *Biomaterials*. 2001.22: 799-806.
21. Bryan N, Rhodes N P and Hunt J A. Derivation and performance of an entirely autologous injectable hidrogel delivery system for cell-based therapies *Biomaterials* 2009. **30**: 180-188.
22. Lin, C. C. and Metters, A. T. "Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling". *Advanced Drug Delivery Review*.2006.58:1379-1408.
23. Ashley A Amini1 and Lakshmi S Nair, Injectable hydrogels for bone and cartilage repair. 2012, *Biomed. Mater.* 7: 1-9.
24. Pakulska M M, Balios B G and Shoichet M S 2012 Injectable hydrogels for central nervous system therapy *Biomed. Mater.* 7 024101.
25. Amini A A and Nair L S 2012 Injectable hydrogels for bone and cartilage repair *Biomed. Mater.*7 024105.

26. Bartlett R S, Thibeault S L and Prestwich G D 2012 Therapeutic potential of gel-based injectables for vocal fold regeneration *Biomed. Mater.* **7** 024103.
27. Gholap, S. G.; Jog, J. P. and Badiger, M. V. "Synthesis and characterization of hydrophobically modified poly (vinyl alcohol) hydrogel membrane". *Polymer*. 2004.45: 5863-5873.
28. Ailish Breen, B.E., Ph.D., Timothy O'Brien, M.B., B.Ch.,B.A.O.,Ph.D. and Abhay Pandit, B.E., M.S., Ph.D., M.P.H. Fibrin as a Delivery System for Therapeutic Drugs and Biomolecules. *Tissue Engineering: Part B*. 2009. **15** (2): 201-214.
29. Raphael Gorodetsky, Richard A. F. Clark, Jianquiang An, James Gailit, Lila Levdansky, Akiva Vexler, Elisha Berman and Gerard Marx. Fibrin Microbeads (FMB) as Biodegradable Carriers for Culturing Cells and for Accelerating Wound Healing. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1999. **112** (6): 866-872.
30. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin polymerization and functions. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10 Suppl 1: S45-8.
31. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;31:27-33.
32. Clark RAF. Fibrin sealant in wound repair: a systematic survey of the literature. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 2371-92
33. Sanders RP, Goodman NC, Amiss LR, Jr., et al. Effect of fibrinogen and thrombin concentrations on mastectomy seroma prevention. *J Surg Res* 1996; 61: 65-70/
34. Eroglu E, Oral S, Unal E, et al. Reducing seroma formation with fibrin glue in an animal mastectomy model. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22: 137-9.
35. Yao E, Eriksson E. Gene therapy in wound repair and regeneration. *Wound Repair Regener* 2000;8:443-51.
36. Adler SC, Kent KJ. Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2002;10:129-46.
37. Fennis JPM, Stoelinga PJW. Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographical animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:281-6.

38. Anitua E. The use of plasma rich growth factors in oral surgery. *Pract Proced Esthet Dent* 2001;13:487-93.
39. Petrungaro PS. Using platelet rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent* 2001;22:729-36.
40. Han SK, Kim DW, Jeong SH, Hong YT, Woo HS, Kim WK, Gottrup F.: "Potential use of blood bank platelet concentrates to accelerate wound healing of diabetic ulcer". *Ann Plast Surg*. 2007;59(5):532.
41. Man D, Plasker H, Winland Brown JE. The use of autologous platelet rich plasma (platelet gel) and autologous platelet poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconst Surg* 2001;107:238-23.
42. Serra Renom, J.M., Muñoz del Olmo, J.L. and Gonzalo Caballero, C.: "Uso de factores de crecimiento plaquetar unidos a injertos de grasa para lipofiling facial en ritidectomía". *Cir. plást. iberolatinoam.* 2006, 32 (3): 191.
43. Ganio, C., Tenewitz, F. E., Wilson, R., et al.: "The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors". *J. Foot Ankle Surg.* 1993, 32: 263.
44. Monton Echevarria J, Perez Redondo, S., Gomez Bajo, G.J.: "Experiencia clínica en el empleo de factores de crecimiento autólogos obtenidos de plasma rico en plaquetas". *Cir. plást. iberolatinoam.* 2007, 33 (3): 155.