

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**EVALUACIÓN DE MATRICES DE FIBRINA
CULTIVADAS Y ENRIQUECIDAS CON FACTORES
DE CRECIMIENTO EN LA PROFILAXIS DE LA
FÍSTULA BRONCOPLEURAL
POSTNEUMONECTOMÍA**

M^ª PILAR DE LA PUENTE GARCÍA

2012

D. CLEMENTE MURIEL VILLORIA, Director del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca:

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral, titulada “EVALUACIÓN DE MATRICES DE FIBRINA CULTIVADAS Y ENRIQUECIDAS CON FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA PROFILAXIS DE LA FÍSTULA BRONCOPLEURAL POSTNEUMONECTOMÍA” ha sido realizada por **DÑA. M^a PILAR DE LA PUENTE GARCÍA**, en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Salamanca a veintidós de febrero de dos mil doce.

Fdo: Clemente Muriel Villoria

DR. D. GONZALO VARELA SIMÓ. Profesor titular de Universidad en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

DR. DÑA. M^a DOLORES LUDEÑA DE LA CRUZ. Profesora titular de Universidad en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca.

DR. D. FRANCISCO JAVIER IGLESIAS MUÑOZ. Director del Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León.

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral, titulada “EVALUACIÓN DE MATRICES DE FIBRINA CULTIVADAS Y ENRIQUECIDAS CON FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA PROFILAXIS DE LA FÍSTULA BRONCOPLEURAL POSTNEUMONECTOMÍA” que para optar al grado de Doctor presenta **DÑA. M^a PILAR DE LA PUENTE GARCÍA**, ha sido realizada en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca bajo nuestra dirección, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Considerando que constituye un trabajo de Tesis, autorizamos su presentación ante la Comisión de Tercer Ciclo de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la presente en Salamanca a veintidós de febrero de dos mil doce.

Fdo: F. Javier Iglesias Muñoz

Fdo: M^a Dolores Ludeña De La Cruz

Fdo. Gonzalo Varela Simó

Los científicos no persiguen la verdad,
es ésta quien los persigue a ellos.

Schlechta, Karl

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis por su gran apoyo y colaboración. Al Dr. Gonzalo Varela por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo, a la Dra. Dolores Ludeña por su apoyo incondicional, por estar siempre dispuesta a colaborar y por su trato amable y familiar, y en especial agradecer a D. Javier Iglesias por haberme guiado, a través de este complejo mundo de la investigación, en el día a día.

A mis compañeros del Establecimiento de Tejidos, Juanjo, Marta, Jenny, Ana, Paloma, Carmen y los demás becarios, “BT-Team” gracias a todos por convertir el banco en un lugar agradable donde trabajar.

A Guti, del Servicio de Patología del Hospital Universitario de Salamanca, por tratarme siempre tan bien, por estar siempre dispuesta a ayudar y repetir tantas tinciones como hicieran falta.

Al Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de León, y en especial a Marta, por su cercanía y gran disponibilidad, y sobre todo por sus perfectos cuidados de los animales del proyecto.

A Antonio, del Servicio de Microscopía de la Universidad de León, por su gran disposición a colaborar y ayudarme a encontrar el “enfoque” adecuado.

Al Dr. José Luís Aranda, del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de Salamanca, por ser el engranaje perfecto de impulso de este proyecto de investigación, permitiendo desarrollar esta tesis.

A mis padres y hermano, por estar a mi lado, por vuestro cariño, paciencia y comprensión en el día a día, sabiendo entender mis ausencias y mis malos momentos.

Al resto de mi familia, por su apoyo, orientación y sus sabios consejos.

A todos mis amigos, en especial a Andrea, Noemí, Sheila y Jose Luis, por animarme a seguir adelante en este mundo de la investigación, aun con el poco tiempo que les he prestado durante estos años. Gracias por aguantarme y por escucharme.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin Chema, gracias por tu gran apoyo en los momentos difíciles y por darme los ánimos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Gracias a todos.

FINANCIACIÓN

La realización de este trabajo de investigación ha recibido el apoyo económico de las siguientes instituciones:

- Diputación Provincial de León, Fundación Clínica San Francisco y la Universidad de León, a través de una Beca de Formación de Personal Investigador bajo la **Cátedra Extraordinaria “Manuel Elkin Patarroyo”**.
- Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, a través de la concesión de un **Proyecto de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud**. Título del proyecto: *Desarrollo y validación experimental de un injerto tisular de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento fibroblástico como profilaxis de la fístula broncopleurales tardía postneumonectomía*. Año de concesión: 2008. Código del proyecto: GRS/213/A/08.
- Obra Social de Caja España, a través del apoyo a los proyectos de investigación llevados a cabo en el Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León.

A mi familia, y en especial a mi madre y a Chema,
por estar siempre a mi lado,
y apoyarme en los momentos difíciles.

Os quiero.

I.



Indice

Presentazione	
I. Idee	
Il corpo	
La comunicazione	
Nel tempo	
L'azione	
Il dialogo	
Un segno trasversale	
Wittgenstein, Zagar, Elliot e la Voipa	
L'esplicito e l'implicito	
L'ibrido e l'interpretazione	
Una scelta futurista	
Di là dalla convenzione	
La comunicazione è a Zig-Zag	
Ringraziamenti	

Índice

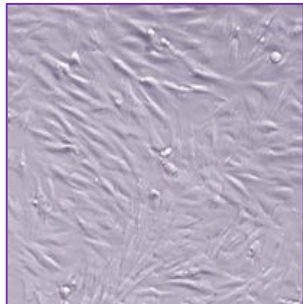
I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	I
II. FIGURAS	V
III. TABLAS	IX
IV. ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. La ingeniería de tejidos	2
1. 1. a. Biomateriales como andamiajes: La fibrina	2
1. 1. b. El componente celular: Células madre mesenquimales	8
1. 1. c. Sustancias inductoras: Factores de crecimiento	11
1. 2. La ingeniería de tejidos aplicada a la vía aérea	14
1. 3. La Fístula Broncopleural Postneumonectomía (FBPN)	15
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
2. 1. Hipótesis de trabajo	21
2. 2. Objetivo principal	21
2. 3. Objetivos específicos	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	23
3. 1. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas	24
3. 1. a. Extracción de biopsias dérmicas porcinas	24
3. 1. b. Extracción de muestras de sangre	25
3. 1. c. Procesamiento de las biopsias dérmicas	25
3. 1. d. Aislamiento, análisis y conservación del plasma	26
3. 2. Cultivo celular <i>in vitro</i> en superficies plásticas	26
3. 2. a. Contaje y viabilidad celular	26
3. 2. b. Siembra celular	27
3. 2. c. Subcultivos (Tripsinización)	27
3. 2. d. Congelación de células	28
3. 2. e. Evaluación de los rendimientos celulares	28
3. 3. Cultivo celular <i>in vitro</i> en andamiajes de fibrina	29
3. 3. a. Elaboración de los andamiajes de fibrina	29
3. 3. b. Cultivo celular tridimensional	29
3. 3. c. Incorporación de factores de crecimiento	30
3. 3. d. Distribución, adhesión y morfología celular	30

3. 3. e. Proliferación celular	31
3. 3. f. Viabilidad celular	31
3. 3. g. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos	33
3. 4. Caracterización celular	35
3. 4. a. Citometría de flujo	35
3. 4. b. Métodos tradicionales de diferenciación: superficies plásticas y pellets	36
3. 4. c. Diferenciación hacia linajes mesenquimales en andamiajes de fibrina	37
3. 4. d. Técnicas específicas de diferenciación	38
3. 5. Modelo animal porcino	40
3. 5. a. Neumonectomía y devascularización del muñón bronquial	40
3. 5. b. Grupos de estudio de implante	43
3. 5. c. Anestesia, control postoperatorio y eutanasia	43
3. 6. Evaluación <i>in vivo</i> del implante	44
3. 6. a. Estudio morfológico de los muñones bronquiales	44
3. 6. b. Estudio de la reacción inflamatoria	45
3. 6. c. Análisis de la revascularización y el grado de maduración vascular	45
3. 6. d. Estudios microbiológicos	45
3. 7. Análisis estadístico	47
4. RESULTADOS	48
4. 1. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas	49
4. 1. a. Extracción, procesamiento y digestión de las biopsias dérmicas	49
4. 1. b. Aislamiento, análisis y conservación del plasma	49
4. 2. Cultivo celular <i>in vitro</i> en superficies plásticas	49
4. 2. a. Evaluación de los rendimientos celulares	50
4. 2. b. Viabilidad celular	51
4. 3. Cultivo celular <i>in vitro</i> en andamiajes de fibrina	52
4. 3. a. Distribución, adhesión y morfología celular	52
4. 3. b. Proliferación celular	55
4. 3. c. Viabilidad celular	57
4. 3. d. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos	60
4. 4. Caracterización celular	63
4. 4. a. Citometría de flujo	63
4. 4. b. Diferenciación hacia linajes mesenquimales en superficies plásticas	65
4. 4. c. Diferenciación hacia linajes mesenquimales en andamiajes de fibrina	66

4. 4. d. Diferenciación condrogénica en pellet	69
4. 5. Modelo animal porcino	70
4. 5. a. Grupos de estudio de implante	70
4. 5. b. Complicaciones postoperatorias	71
4. 6. Evaluación <i>in vivo</i> del implante	72
4. 6. a. Estudio morfológico de los muñones bronquiales	73
4. 6. b. Estudio de la reacción inflamatoria	73
4. 6. c. Análisis de la revascularización y el grado de maduración vascular	80
4. 6. d. Estudios microbiológicos	81
5. DISCUSIÓN	84
5. 1. Elección de la fibrina como andamiaje	85
5. 2. Elección del tipo celular de estudio	87
5. 3. Valoración del efecto de los factores de crecimiento	90
5. 4. Evaluación del modelo animal	93
5. 5. Perspectivas futuras	93
6. CONCLUSIONES	95
7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	97
8. ANEXOS	108
9. BIBLIOGRAFÍA	113

II.



Figuras

II. FIGURAS

Figura 1. Esquema del procedimiento de las técnicas de ingeniería de tejidos	3
Figura 2. Esquema de la molécula de fibrinógeno	4
Figura 3. Sitios de anclaje de la fibrina en el fibrinógeno	5
Figura 4. Sitios de unión a proteínas en el fibrinógeno	5
Figura 5. Proceso de formación del coágulo de fibrina	6
Figura 6. Características biológicas y aplicaciones clínicas de las MSCs	9
Figura 7. Proceso de formación y maduración vascular	12
Figura 8. Estructura en red de la matriz alginato-bario	13
Figura 9. Corte histológico de tráquea	14
Figura 10. Broncoscopia virtual de una fístula broncopleural	15
Figura 11. Extracción de biopsia dérmica	24
Figura 12. Disgregación de las biopsias dérmicas	25
Figura 13. Elaboración de la matriz de fibrina	30
Figura 14. Modo de empleo del AlamarBlue	32
Figura 15. Modelo animal porcino de ingeniería de tejidos	40
Figura 16. Preparación y realización de la toracotomía	41
Figura 17. Devascularización del muñón bronquial	42
Figura 18. Biopsia del muñón bronquial	44
Figura 19. Tallado del muñón bronquial	45
Figura 20. Estudio microbiológico de los hisopados.....	47
Figura 21. Morfología de las células de dermis.....	50
Figura 22. Curva de crecimiento en superficies plásticas.....	50
Figura 23. Tasa de duplicación celular acumulada.....	51
Figura 24. SEM andamiaje de fibrina (F) y andamiaje de fibrina con células (FC)	52
Figura 25. Distribución celular y de microcápsulas en los FC y FCF	53
Figura 26. SEM de la distribución celular en los FC y FCF	54
Figura 27. SEM de la distribución de microcápsulas en los FCF	55
Figura 28. Curva de crecimiento en andamiajes de fibrina.....	55
Figura 29. Curva de crecimiento en andamiajes de fibrina y superficies plásticas	56
Figura 30. Proliferación celular en FC y FCF	56
Figura 31. Ensayo de viabilidad en diferentes superficies plásticas	57

Figura 32. Escala cromática de viabilidad celular en superficies plásticas	57
Figura 33. Incubación y penetración del AlamarBlue en andamiajes de fibrina	57
Figura 34. Rectas patrón de tiempos de incubación en andamiajes de fibrina....	58
Figura 35. Rectas patrón de viabilidad celular en superficies plásticas y andamiajes de fibrina.....	58
Figura 36. Escala cromática de viabilidad celular en andamiajes de fibrina	59
Figura 37. Viabilidad celular en FC y FCF	59
Figura 38. H&E de los andamiajes FC y FCF	60
Figura 39. Tricómico de Masson de los andamiajes FC y FCF	61
Figura 40. Orceína de los andamiajes FC y FCF	61
Figura 41. Inmunohistoquímica de fibronectina, actina y Ki-67 de los andamiajes FC y FCF	62
Figura 42. Población celular de estudio por citometría de flujo	63
Figura 43. Citometría de flujo de los marcadores de superficie CD14, CD29, CD31, CD45 y CD90.....	64
Figura 44. Tinción Oil-Red-O de diferenciación adipogénica en monocapa	65
Figura 45. Tinción Rojo Alizarina de diferenciación osteogénica en monocapa ..	66
Figura 46. H&E y Tinción Oil-Red-O de andamiajes de fibrina sometidos a diferenciación adipogénica	66
Figura 47. Tinción Rojo Alizarina y Von Kossa de andamiajes de fibrina sometidos a diferenciación osteogénica	67
Figura 48. Inmunohistoquímica de osteopontina y osteocalcina de andamiajes de fibrina sometidos a diferenciación osteogénica	68
Figura 49. H&E y Tinción Azul Alcían de andamiajes de fibrina sometidos a diferenciación condrogénica	68
Figura 50. Inmunohistoquímica de colágeno tipo II en andamiajes de fibrina sometidos a diferenciación condrogénica	69
Figura 51. H&E de pellets sometidos a diferenciación condrogénica	69
Figura 52. Grupos de implante	70
Figura 53. Complicaciones postoperatorias del modelo animal	71
Figura 54. Porcentaje de incidencia de las complicaciones postoperatorias.....	72
Figura 55. Estudio morfológico de los muñones bronquiales	73

Figura 56. H&E de los muñones bronquiales del grupo control	74
Figura 57. H&E de los muñones bronquiales del grupo matriz simple	74
Figura 58. H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo tras 3 días de la cirugía.....	75
Figura 59. H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo tras 7 días de la cirugía.....	75
Figura 60. H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo tras 14 días de la cirugía.....	76
Figura 61. H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo tras 21 días de la cirugía.....	76
Figura 62. H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo tras 28 días de la cirugía.....	77
Figura 63. Reacciones inflamatorias de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo.....	77
Figura 64. H&E de los muñones bronquiales tras 3 días de la cirugía	78
Figura 65. H&E de los muñones bronquiales tras 7 días de la cirugía	78
Figura 66. H&E de los muñones bronquiales tras 14 días de la cirugía	79
Figura 67. H&E de los muñones bronquiales tras 21 días de la cirugía	79
Figura 68. H&E de los muñones bronquiales tras 28 días de la cirugía	79
Figura 69. Inmunohistoquímica de actina de los muñones bronquiales tras 28 días de la cirugía	80
Figura 70. Inmunohistoquímica de actina de los muñones bronquiales del injerto tisular completo.....	81
Figura 71. Porcentaje de microorganismos de los muñones bronquiales.....	83

III.

Etiología Asociada a la aparición de una Etapa broncopulmonar	
Resección pulmonar	
Tipo de resección: neumotomía + lobectomía	
Resección pulmón derecho + izquierdo	
Problemas infecciosos	
Aspergilosis pulmonar	
Coccidioidomicosis	
Histoplasmosis pulmonar	
Neumocistosis	
Cáncer	
Tratamientos con quimioterapia	
Tratamientos con radioterapia	
Patologías específicas	
Neumatoceles espontáneos persistentes	
Síndrome de Lújar respiratorio agudo	
Bronquiectasia	
Idiopática	
Idiopática	

Tablas

III. TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de los andamiajes de fibrina en ingeniería de tejidos	8
Tabla 2. Etiología asociada con la aparición de una fístula broncopleurál	16
Tabla 3. Factores de riesgo de una fístula broncopleurál	17
Tabla 4. Composición del medio de cultivo completo	27
Tabla 5. Tinción Hematoxilina & Eosina	34
Tabla 6. Tinción Tricómico de Masson y Orceína	34
Tabla 7. Anticuerpos inmunohistoquímica	35
Tabla 8. Anticuerpos e isotipos control para Citometría de flujo	36
Tabla 9. Composición de los medios de cultivo de diferenciación y tinciones específicas realizadas en cada ensayo de diferenciación	37
Tabla 10. Tinción Oil-Red-O, para la Diferenciación Adipogénica.....	38
Tabla 11. Tinción Rojo Alizarina, para la Diferenciación Osteogénica.....	38
Tabla 12. Tinción Azul Alcían, para la Diferenciación Condrogénica.....	39
Tabla 13. Anticuerpos inmunohistoquímica para estudios de diferenciación	39
Tabla 14. Tinción Von-Kossa, para la Diferenciación Osteogénica.....	39
Tabla 15. Tinción de Gram	46
Tabla 16. Procesamiento de las muestras de dermis.....	49
Tabla 17. Procesamiento de las muestras de sangre.....	49
Tabla 18. Tasa de expansión celular	51
Tabla 19. Porcentaje viabilidad celular.....	51
Tabla 20. Expresión de los marcadores de superficie por citometría de flujo.....	65
Tabla 21. Distribución de los animales del estudio en grupos y subgrupos	70
Tabla 22. Complicaciones postoperatorias del modelo animal.....	71
Tabla 23. Resultados microbiológicos de los muñones bronquiales	81-82

IV.



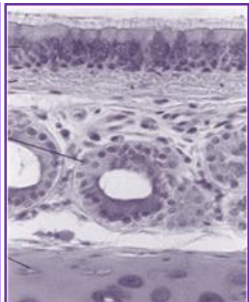
Abreviaturas

IV. ABREVIATURAS

PGA:	Poli-ácido glicólico
PLA:	Poli-ácido láctico
PLGA:	Poli ácido láctico - ácido glicólico
FXIIIa:	Factor XIII activado
FDA:	Administración de Drogas y Alimentación (Food&Drug Administration)
MSCs:	Células madre mesenquimales (Mesenchymal stem cells)
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Ang1:	Angiopoyetina 1
bFGF:	Factor de crecimiento fibroblástico básico
TGF-β:	Factor de crecimiento transformante beta
FBPN:	Fístula broncopleural postneumonectomía
FBP:	Fístula broncopleural
ULE:	Universidad de León
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco
SBF:	Suero bovino fetal
OP:	Cultivo primario
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético
T/E:	Tripsina/EDTA
1P:	Cultivo primer pase
DMSO:	Dimetilsulfóxido
RBID:	Rodamina B isotiocianato dextrano
F:	Andamiaje de fibrina
FC:	Andamiaje de fibrina con células
FCF:	Andamiaje de fibrina con células y factores de crecimiento
SEM:	Microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscopy)
AB:	AlamarBlue
H&E:	Hematoxilina & Eosina
HRP:	Peroxidasa de rábano picante polimérica
PBS:	Buffer salino fosfato

BSA:	Albúmina sérica bovina
FITC:	Fluoresceína isotiocianato
MDA:	Monocapa Diferenciación Adipogénica
MDAC:	Monocapa Diferenciación Adipogénica Control
MDO:	Monocapa Diferenciación Osteogénica
MDOC:	Monocapa Diferenciación Osteogénica Control
IBMX:	3-isobutil-1-metilxantina
FDA:	Fibrina Diferenciación Adipogénica
FDAC:	Fibrina Diferenciación Adipogénica Control
FDO:	Fibrina Diferenciación Osteogénica
FDOC:	Fibrina Diferenciación Osteogénica Control
FDC:	Fibrina Diferenciación Condrogénica
FDCC:	Fibrina Diferenciación Condrogénica Control
PDC:	Pellet Diferenciación Condrogénica
PDCC:	Pellet Diferenciación Condrogénica Control
C:	Control
MS:	Matriz Simple
ITC:	Injerto Tisular Completo
RGD:	Arginina-Glicina-Aspártico
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico

1.



Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La ingeniería de tejidos

La **ingeniería tisular** es un área científica interdisciplinaria, que intenta reparar o mejorar las funciones biológicas de un tejido que está dañado o ha dejado de desarrollar su función, a través del uso de biomateriales, como estructuras tridimensionales, que albergan células y moléculas biológicamente activas¹. El andamiaje acomoda y guía el crecimiento de las células y permite la regeneración del tejido en una estructura tridimensional².

Un injerto tisular debe cumplir **dos requisitos** para que resulte viable: la aparición de **neovascularización** de la región donde se implanta la matriz avascular, que ayude a evitar la erosión, infección y necrosis de la misma, donde la acción coordinada y secuencial de ciertos factores de crecimiento va a tener un papel importante; y la **cicatrización** de la zona, gracias a la proliferación y diferenciación del componente celular, que ayude a la regeneración del epitelio¹.

Aunque existen estudios donde se plantea la posibilidad de usar **injertos avasculares y sin necesidad de añadir ningún tipo celular**, y otros en los que se ha comprobado la existencia de invasión epitelial y vascular desde el órgano hacia el injerto³; la mayoría de estudios apuestan por el uso de diversos tipos celulares para promover la regeneración del epitelio y la conservación de la red capilar o promoción de la vascularización del injerto⁴⁻⁷.

En las técnicas de ingeniería de tejidos, **el componente celular** suele ser autólogo (del propio paciente), el cual se mantiene en cultivo *in vitro* hasta que se introduce en un **andamiaje biocompatible tridimensional**, junto con la adición de diversas **sustancias biológicamente activas**, promotoras de la angiogénesis o de la proliferación celular. El injerto tisular resultante se mantiene en condiciones de cultivo apropiadas hasta que se realiza su implante *in vivo* (Figura 1).

En definitiva, existen **tres importantes componentes** para la creación de un injerto viable gracias a las técnicas de la ingeniería de tejidos: el **biomaterial** que actuará de andamiaje, el **componente celular** y las **sustancias inductoras**.

1.1. a. Biomateriales como andamiajes: La fibrina

Un andamiaje ideal, debe estar elaborado con materiales biocompatibles que presenten propiedades de superficie que favorezcan la adhesión, proliferación y diferenciación celular⁸, y no generen reacciones inflamatorias tras su implante².

Los biomateriales se clasifican, según su origen, en **naturales**, que generalmente se tratan de proteínas y polisacáridos (colágeno, fibrina, alginato, ácido hialurónico,...); y **sintéticos**, que pueden ser metálicos, cerámicos o poliméricos, como el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico (PLA); todos ellos han sido utilizados para la fabricación de andamiajes en la ingeniería de tejidos⁸⁻¹⁰.

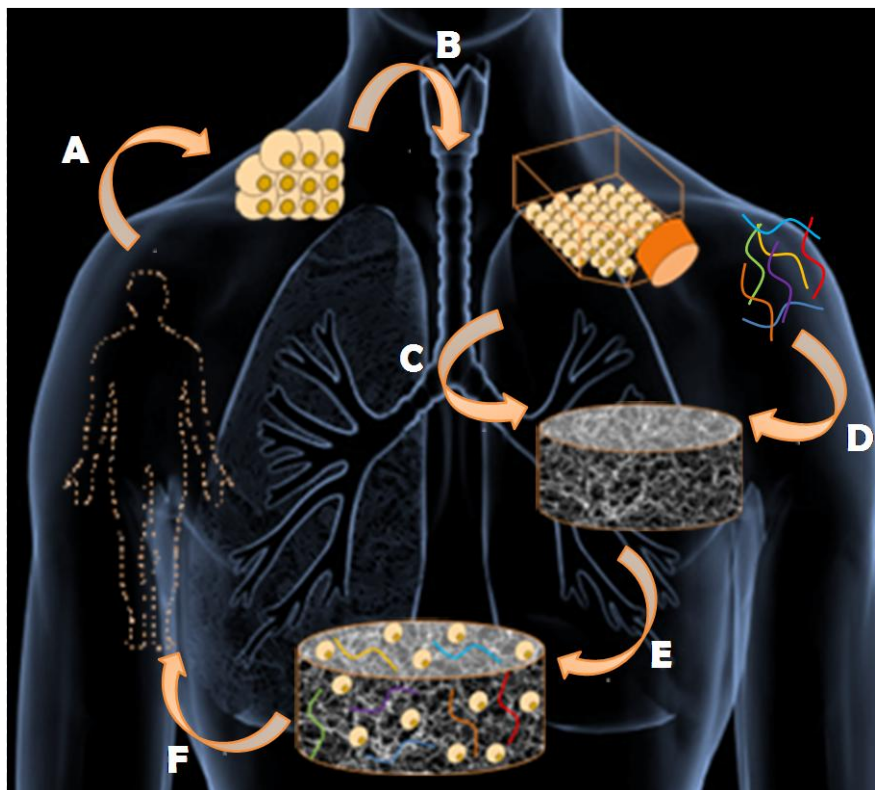


Figura 1. Esquema del procedimiento a seguir en las técnicas de ingeniería de tejidos. Se obtiene una biopsia del paciente (A), para extraer el componente celular autólogo, el cual se siembra en cultivo *in vitro* (B), posteriormente se introduce dicho componente celular (C) junto con sustancias inductoras (D) en un biomaterial o andamiaje, y se cultiva (E) hasta su posterior implante *in vivo* (F).

Los biomateriales **naturales** mimetizan la estructura y composición de la matriz extracelular nativa, además de simular sus efectos estimulantes, permitiendo la incorporación de factores de crecimiento y otras proteínas, que pueden promover las funciones celulares. Sin embargo se degradan fácilmente, pueden transferir patógenos y su variabilidad depende de la estructura del polímero natural de origen¹¹.

Polímeros **naturales** como el **colágeno**, se han empleado en múltiples aplicaciones de la ingeniería de tejidos blandos, como en la piel, sin embargo, existe cierta preocupación en cuanto al uso del colágeno debido a su antigenicidad e inmunogenicidad, difícil manejo y el bajo control en cuanto a su biodegradabilidad¹²⁻¹³. Por su parte los andamiajes de **fibrina** combinan alta proliferación celular, distribución de las células uniforme en la estructura tridimensional y buena adhesión, además, si los andamiajes son autólogos, no presentan riesgos de reacción de cuerpo extraño o infección; aun así, sus mayores desventajas radican en su baja dureza mecánica y su rápida degradación¹⁴⁻¹⁵.

En cuanto a los biomateriales **sintéticos**, éstos son de fácil manipulación, con cinéticas de degradación controladas, sin riesgo de transferencia de patógenos y moldeables. No obstante, suelen necesitar la incorporación de moléculas de superficie para favorecer las interacciones entre las células y el material, y su degradación puede generar subproductos no deseados¹¹.

El ácido poliláctico (**PLA**), el ácido poliglicólico (**PGA**), y su copolímero poli DL-ácido láctico - ácido glicólico (**PLGA**) son los materiales biodegradables **sintéticos** más utilizados en la ingeniería de tejidos, no obstante, cuando estos polímeros son implantados en un modelo *in vivo*, se produce liberación masiva de productos ácidos, los cuales desencadenan una reacción inflamatoria¹⁶.

En condiciones fisiológicas, cuando una lesión tiene lugar, una **compleja red de proteínas** aparece para **prevenir la pérdida de sangre**, en la cual la fibrina es muy importante¹. La fibrina, por tanto, constituye el soporte del tapón hemostático, estando formada por una malla proteica resultante de la polimerización del fibrinógeno.

El **fibrinógeno** es una **glicoproteína** de gran tamaño (340kD) formada por **tres cadenas polipeptídicas** ($A\alpha$, $B\beta$, y γ) unidas por puentes disulfuros¹⁷⁻¹⁹ (Figura 2). La molécula de estructura alargada (45nm de longitud y 9nm de diámetro) está dividida en **tres secciones**: el nódulo central, llamado dominio E, formado por los 6 extremos amino-terminales de las cadenas proteicas, unidos por puentes disulfuro, mientras que los dos nódulos externos D están formados por los extremos carboxi-terminales.

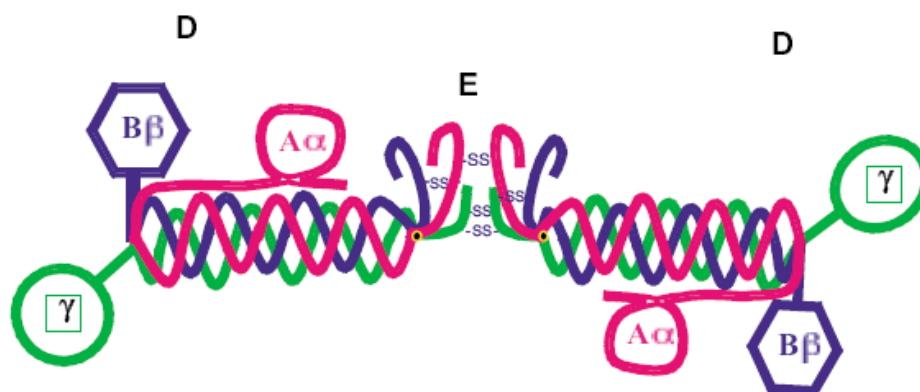


Figura 2. Esquema de la molécula de fibrinógeno. Cada cadena polipeptídica se representa de un color distinto. Tomado de Acta Bioquim Clin Latinoam 2007; 41: 7-19.

Los segmentos centrales de las tres cadenas polipeptídicas se pliegan formando una triple α -hélice que proporciona estabilidad y flexibilidad mecánica a la molécula²⁰. El extremo carboxi-terminal de la cadena $A\alpha$, es un brazo flexible que puede variar su posición y unirse con otras moléculas de fibrinógeno²¹.

En el fibrinógeno hay sitios constitutivos con funciones bien definidas (Figura 3). En los **dominios D se produce el ensamblaje de la fibrina**. Los sitios DD contribuyen a alinear perfectamente los monómeros de fibrina, mientras los sitios D_A o D_B son los huecos donde se insertan las cadenas A y B de los monómeros vecinos, respectivamente. El sitio γ_{XL} interviene en el ensamblaje de la fibrina y al mismo tiempo ubica a las moléculas en su posición exacta para que el Factor XIII activado (FXIIIa) catalice la transglutaminación²².

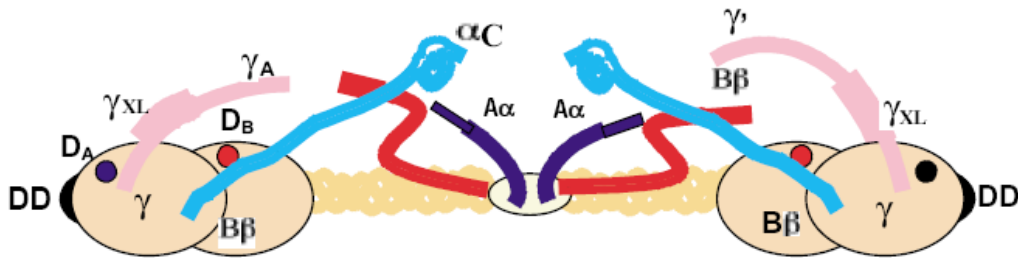


Figura 3. Sitios del fibrinógeno que intervienen en el ensamblaje de la fibrina. Tomado de Biochemistry 1996; 35: 10448-53.

Existen sitios de unión a proteínas del sistema de coagulación (Figura 4). En el **dominio E, la trombina se une al fibrinógeno** a través del sitio sustrato y de un sitio no sustrato de baja afinidad, es decir, donde la trombina no puede ejercer su actividad biológica. Además, en el extremo C-terminal de la cadena γ' el fibrinógeno posee otro sitio de alta afinidad para trombina y un sitio de unión a la subunidad B del Factor XIII²³.

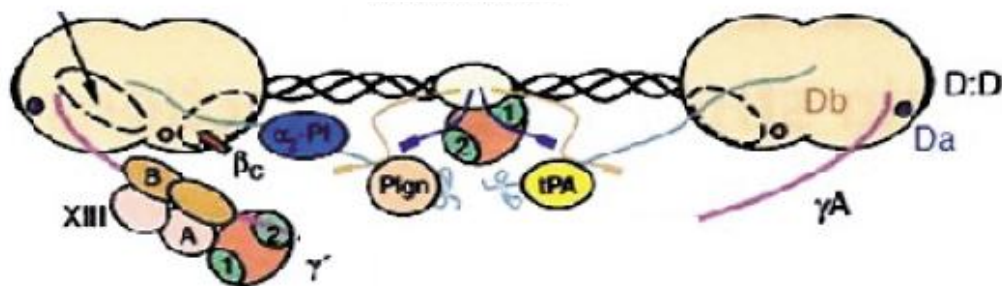


Figura 4. Sitios de unión a proteínas de los sistemas de coagulación y fibrinolíticos. Tomado de J Thromb Haemost 2005; 3: 1894-904.

La **formación de la red de fibrina**, es el proceso por el cual el fibrinógeno soluble es convertido en fibrina insoluble por acción de la trombina y del Factor XIIIa (Figura 5). Se distinguen **3 etapas: proteólisis del fibrinógeno por la trombina** (liberándose los Fibrinopéptidos A y B), **polimerización de los monómeros de fibrina y estabilización de la fibrina por el Factor XIIIa** (el factor XIII plasmático es activado por acción de la trombina, en una reacción dependiente de iones calcio)¹⁸.

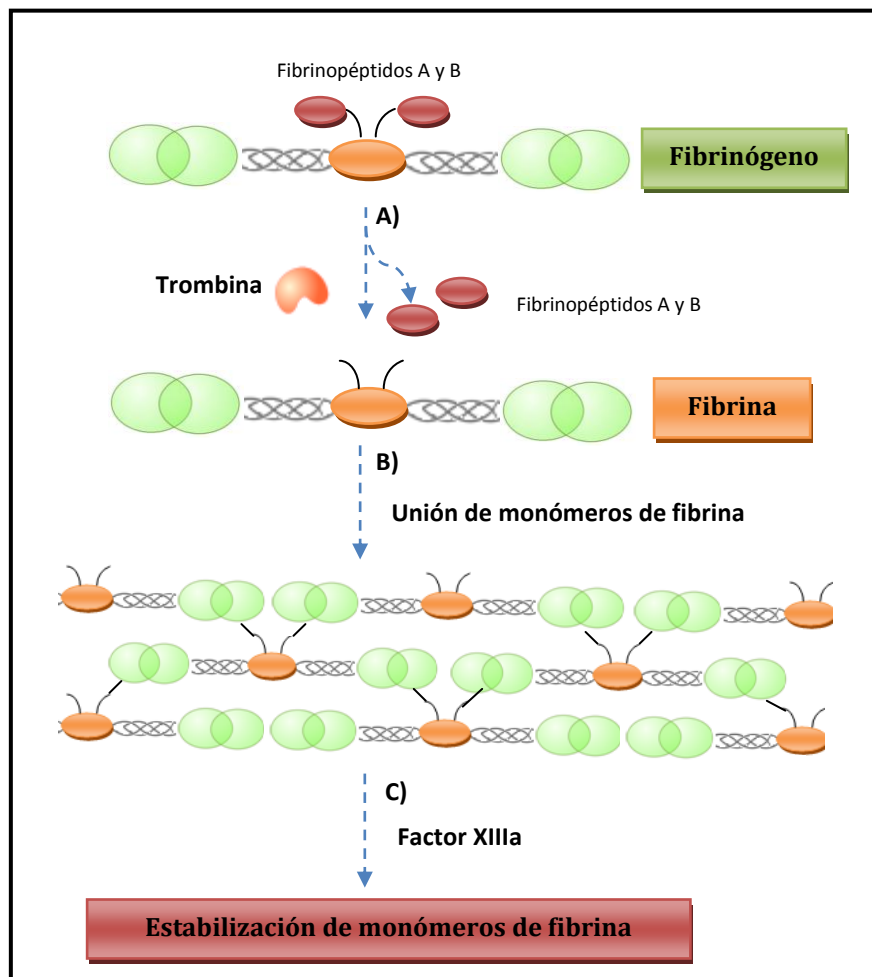


Figura 5. Formación del coágulo de fibrina. La acción de la trombina sobre el fibrinógeno forma la molécula de fibrina (tras la liberación de los fibrinopéptidos A y B), la cual es capaz de agregarse consigo misma por acción del factor XIIIa.

La **concentración de fibrinógeno** en el plasma, el cuál es liberado por el hígado, fluctúa en un estrecho rango (**2 a 4 g/L**)²⁴⁻²⁵; no obstante, estas pequeñas variaciones modifican la estructura de la fibrina^{18,26}.

La fibrina tiene la **capacidad de unir** otras moléculas sanguíneas como la **fibronectina**²⁷ y la **vitronectina**²⁸. La capacidad de la fibrina para transportar estas proteínas de la matriz, amplifica su potencial para soportar la migración celular tisular²⁹.

Además, la fibrina es capaz de unir gran cantidad de **factores de crecimiento**, tanto de forma directa como indirecta (unión a través de heparina). A su vez **enzimas** (trombina), **proenzimas** (plasminógeno) e **inhibidores enzimáticos**, también tienen la habilidad de unirse a la fibrina y controlar el balance entre la coagulación y la fibrinólisis²⁴.

El **primer uso clínico** de una emulsión de fibrina data de **1909** y se utilizó para mejorar la cicatrización de heridas³⁰. Sin embargo, no fue hasta 1944, cuando por primera vez, se combinó trombina y fibrinógeno (previamente purificados) para promover la adhesión de injertos de piel en soldados con grandes quemaduras³¹. Aun así, hasta comienzos de los setenta, no se utilizaría el concepto de fibrina que hoy en día se conoce, todo ello gracias a los importantes avances en las técnicas de aislamiento y concentración de los factores de la coagulación.

Los **primeros selladores de fibrina** comercializados en Europa fueron el **Tissucol/Tisseel y el Beriplast H5/Beriplast P**, hoy en día, existe una gran diversidad de productos disponibles en el mercado que difieren en composición³², lo que modifica sus propiedades adhesivas³³.

Sin embargo en los años 90, la **FDA** (Administración de Alimentos y Medicamentos) de Estados Unidos, **revocó la licencia del uso en clínica** de pools de concentrados de fibrinógeno comercial, evitándose la importación desde Europa de estas fibrinas comerciales, y todo ello debido al elevado **riesgo de transmisión vírica** asociado³⁴. Lo cual llevó al desarrollo de diversas técnicas de inactivación y eliminación viral que asegurasen la reducción de dicha transmisión vírica.

El uso de la fibrina como método sellador, ha abarcado **múltiples aplicaciones clínicas**, incluidas la cirugía cardiovascular y torácica³², la neurocirugía³⁵, el tratamiento de hemorragias gastrointestinales³⁶ y la cirugía plástica y reconstructiva³⁷.

Los métodos de elaboración, tanto de fibrinas comerciales como de fibrinas autólogas, **aíslan y concentran el fibrinógeno** de la sangre, a través de una primera centrifugación en combinación con métodos de crioprecipitación u otros métodos químicos³⁸⁻⁴⁰.

Los **métodos de concentración de fibrinógeno** requieren en ocasiones **técnicas caras y complicadas**, alterando la propia naturaleza de la fibrina, consiguiéndose fibrinas útiles como selladores o pegamentos. El uso de fibrinas comerciales conlleva un riesgo de transmisión vírica, además de presentar elevadas concentraciones de fibrinógeno (60-115 mg/ml) y un elevado coste¹. Debido a esto, el uso de **fibrinas autólogas** supone una buena alternativa, se elaboran a partir de sangre autóloga, donde el riesgo de transmisión vírica desaparece, y si no se utilizaran métodos de concentración de fibrinógeno, se trabajaría con un método de elaboración más sencillo y barato.

En las últimas décadas ya no se ha utilizado la fibrina únicamente como sistema sellador, debido a que por sus propiedades químicas y mecánicas también sirve como **sistema de liberación** de fármacos⁴¹ (drogas, antibióticos o agentes de quimioterapia), factores de crecimiento⁴²⁻⁴³ y células⁴⁴; y como **andamiaje tridimensional** capaz de albergar el crecimiento y diferenciación celular⁴⁵.

Un **andamiaje tridimensional** es necesario para la adhesión, proliferación y diferenciación celular⁸. Los andamiajes utilizados en ingeniería tisular deben ser biocompatibles, biodegradables, con estructura porosa, y deben ser no tóxicos ni inmunogénicos; propiedades que los andamiajes de fibrina cumplen¹.

A continuación, se describen algunas de las múltiples **aplicaciones clínicas relacionadas con la ingeniería de tejidos**, en las cuales los **andamiajes de fibrina** han sido utilizados (Tabla 1).

Aplicaciones en Ingeniería Tisular de los andamiajes de fibrina	
Tejido diana	Autores
Tejido Adiposo	Cho et al., 2005 ⁴⁶ ; Borges et al., 2003 ⁴⁷
Hueso	Le Nihouannen et al., 2006 ⁴⁸ ; Peled et al., 2007 ⁴⁹
Tejido Cardíaco	Jockenhoevel et al., 2001 ⁵⁰ ; Birla et al., 2005 ⁵¹
Cartílago	Ahmed et al., 2007 ⁵² ; Eyrich et al., 2007 ⁵³
Tejido Muscular	Rowe et al., 2007 ⁵⁴ ; Huang et al., 2005 ⁵⁵
Tejido Nervioso	Sakiyama et al., 1999 ⁵⁶ ; Willerth et al., 2006 ⁵⁷
Tejido Ocular	Alaminos et al., 2006 ⁵⁸ ; Han et al., 2002 ⁵⁹
Piel	Geer et al., 2002 ⁶⁰
Tendones y ligamentos	Hankemeier et al., 2007 ⁶¹
Tejido Vasculare	Cummings et al., 2004 ⁶²

Tabla 1. Aplicaciones en ingeniería tisular de andamiajes de fibrina.

1. 1. b. El componente celular: Células madre mesenquimales

Uno de los principales objetivos de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, se centra en la **búsqueda de nuevas fuentes celulares** que sustituyan a las células nativas de un órgano o tejido dañado.

En la ingeniería de tejidos, el componente celular participa en la **regeneración y cicatrización** de los tejidos. Cuando es posible, las células deben ser accesibles, fácilmente manipulables, con buenas tasas de proliferación y de origen autólogo.

Existe gran variedad de células disponibles para la ingeniería tisular, quizá, las más utilizadas en la actualidad son las **células madre** (stem cells), que residen en tejidos adultos y dan lugar a células específicas de cada tejido. Dentro de las células madre, las células **mesenquimales**, tienen un alto potencial de diferenciación, lo cual las presenta como buenas candidatas.

Las **células madre mesenquimales** (Mesenchymal stem cells, MSCs) son un heterogéneo subgrupo de células madre estromales con diversas habilidades, como la capacidad de autorenovarse, la multipotencialidad, rasgos inmunológicos, propiedades antiinflamatorias y efectos tróficos⁶³⁻⁶⁴ (Figura 6). Debido a estas propiedades, las MSCs representan un tipo celular ideal para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

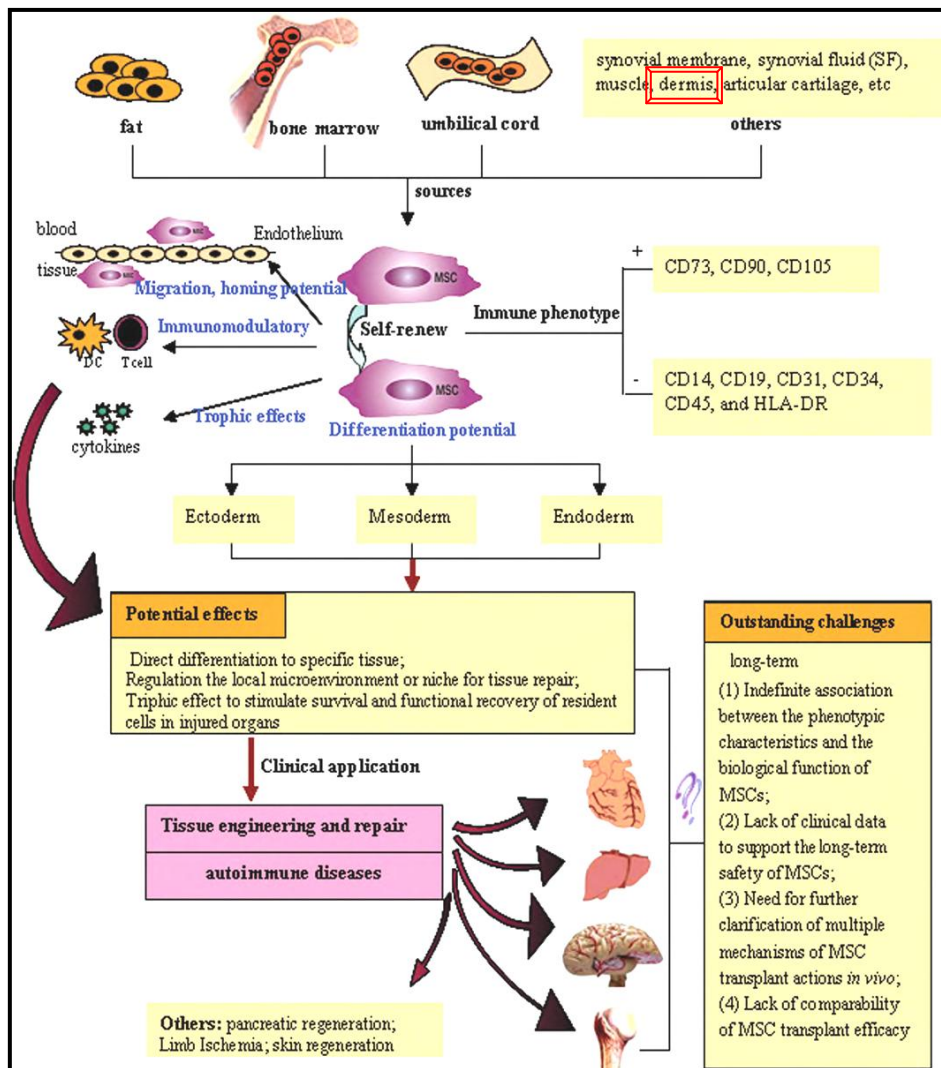


Figura 6. Características biológicas y aplicaciones clínicas de las MSCs. Tomado de Ageing Res Rev 2011; 10: 93-103.

Las **células madre mesenquimales** (MSCs) son **células inmunoprivilegiadas** para el trasplante autólogo y alogénico, debido a su baja inmunogenicidad⁶³⁻⁶⁴. Las MSCs secretan citoquinas y factores de crecimiento con funciones paracrinas y autocrinas, con diversos efectos, como la supresión del sistema inmune local, inhibición de la fibrosis y apoptosis, promoción de la angiogénesis, y estimulación de la mitosis y diferenciación celular⁶⁵, que ayudan a su utilización en terapias de ingeniería tisular y medicina regenerativa.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha descrito los **criterios mínimos para definir las MSCs** humanas⁶⁶. Las MSCs deben adherirse al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, más del 95% de la población de MSCs debe expresar CD105, CD73, y CD90, y estas células no deben expresar (menos del 2% positivas) CD45, CD34, CD14 o CD11b, Cd79α o CD19, y HLA clase II. Además, estas células deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos en condiciones de cultivo específicas.

La mayoría de las células madre han sido descritas en **humanos y pequeños animales**. Las células madre de **cerdo** pueden representar un modelo atractivo para evaluar la eficacia y aplicabilidad de las MSCs, debido a la similitud en tamaño y anatomía entre el cerdo y el humano.

Las **células madre mesenquimales de cerdo** han sido encontradas en médula ósea, fluido amniótico, sangre de cordón umbilical, músculo y piel fetal⁶⁷⁻⁷². Sin embargo, poco se conoce sobre las células madre de cerdo de la dermis. En la **piel** se han identificado, en diferentes localizaciones, poblaciones celulares multipotentes como las células madre epidérmicas y las células madre de los folículos pilosos⁷³. Aún así, se ha descrito que la **dermis** puede representar un mejor reservorio de células madre adultas que la epidermis y los folículos pilosos juntos⁷⁴. En 2001, se aisló por primera vez células madre mesenquimales de dermis en ratón, para posteriormente ser localizadas también en la dermis humana⁷⁵.

Multitud de poblaciones celulares, relacionadas con MSCs de la dermis, han sido identificadas en roedores y en humanos, utilizando diferentes técnicas de cultivo. Barstch, aisló **células madre mesenquimales dérmicas** a partir de biopsias de prepucio preservadas a baja temperatura⁷⁶.

Precusores derivados de piel (descritos como un tipo celular distinto a las conocidas MSCs) fueron aislados de la dermis de mamíferos y humanos por Toma⁷⁷. Chunmeng, detalló la existencia de **células multipotentes** aisladas a partir de la digestión enzimática de la dermis de ratas neonatales⁷⁸⁻⁷⁹.

Chen, describió un nuevo concepto de **células madre multipotentes nestina⁻ vimentina⁺** aisladas a partir de biopsias de prepucio humano⁸⁰. A partir de 2009, Selheyer presentó un nuevo concepto, **células madre mesenquimales cutáneas**, donde la vaina de tejido conectivo y la papila del folículo piloso representarían su nicho anatómico⁸¹.

Las **células de la dermis** son, por tanto, un tipo celular interesante para la ingeniería de tejidos, debido a su **fácil accesibilidad**, se trata de un tejido ubicuo, con **buenas tasas de expansión**¹ y cuyas células son capaces de sintetizar **gran cantidad de matriz extracelular**⁸².

Las células de la dermis han sido utilizadas en diversas **técnicas de ingeniería tisular** como son la **reparación de defectos tendinosos**⁸³ o en la **creación de la capa estromal de la córnea**⁸⁴, de lo cual se deriva que este tipo celular derivado del mesodermo, en un ambiente de tejido específico, puede alterar su fenotipo y comportarse como otro tipo celular.

Además, este tipo celular ya ha sido **cultivado previamente en andamiajes de fibrina** consiguiéndose buenos ratios de proliferación in vitro^{1,85}, de lo que se deriva la estrecha relación entre el biomaterial y el tipo celular.

1. 1. c. Sustancias inductoras: Factores de crecimiento

La **neovascularización** y la **angiogénesis** son importantes conceptos en la ingeniería de tejidos. Los **factores de crecimiento** son requeridos para promover la **regeneración tisular**, ya que pueden inducir angiogénesis, la cual proporciona **oxígeno y nutrientes** a las células trasplantadas para que puedan mantener sus funciones biológicas⁸⁶. Sin un aporte suficiente de oxígeno y nutrientes, las células sembradas en un andamiaje tridimensional sobrevivirían con dificultad, desembocando en la necrosis celular del injerto.

Existen estudios que demuestran que la **acción coordinada y secuencial** de determinados **factores de crecimiento**, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), aceleran los procesos normales de angiogénesis y maduración vascular⁸⁷⁻⁹⁰, permitiendo el desarrollo de redes capilares totalmente funcionales dentro de injertos inicialmente avasculares.

Los efectos biológicos de los factores de crecimiento no pueden ser siempre predichos, por tanto es necesaria la utilización de **sistemas de liberación**⁸⁶. Aunque pequeñas cantidades de factores de crecimiento son necesarias para generar una respuesta celular, los **factores de crecimiento son rápidamente degradados**. La vida media de FGF⁹¹ y VEGF⁹² son 3 y 50 minutos, respectivamente, cuando se inyectan por vía intravenosa. El uso de vehículos poliméricos permite trabajar con un método de **liberación** de moléculas de forma **controlada y localizada**⁹³. Los factores de crecimiento por tanto, pueden ir **libres en un andamiaje o incluidos en microcápsulas** que permitan controlar su liberación, y así, poder elegir en función del efecto que se busque conseguir, en qué momento se van a liberar o ejercerán su función^{88-90,94}.

El **factor de crecimiento endotelial vascular** (VEGF) participa en la **formación de vasos inmaduros**, sin embargo para la **remodelación y maduración** de esos vasos inmaduros, se necesitan moléculas como la **angiopoyetina 1 (Ang1)** y la **efrina B2**, y factores de crecimiento como el **factor de crecimiento fibroblástico básico** (bFGF) y el **factor de crecimiento derivado de plaquetas** (PDGF)^{87,95} (Figura 7).

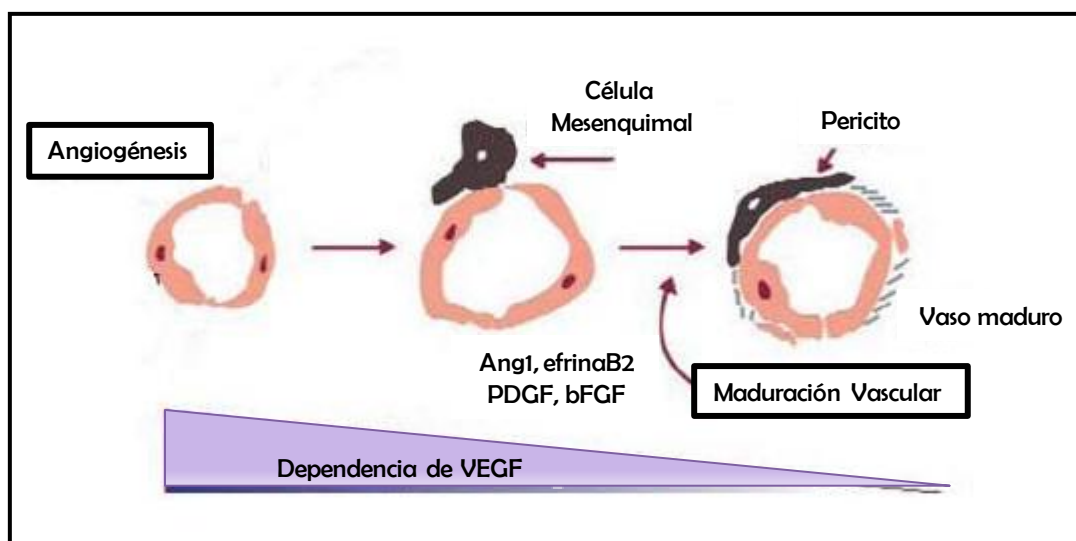


Figura 7. Proceso de formación y maduración vascular: al principio, la formación de vasos es altamente dependiente de la acción del VEGF. Conforme se inicia la maduración vascular, la importancia del VEGF disminuye progresivamente a la par que comienzan su acción otros factores. Tomado y modificado de J Clin Invest 1999; 103: 157-158.

El **VEGF** (Factor de crecimiento endotelial vascular) es una citoquina que juega un papel fundamental en la **angiogénesis**, actuando como **mitógeno específico** de la micro y macrovasculatura de arterias, venas y vasos, careciendo de actividad mitogénica en otros tipos celulares⁹⁶; además de incrementar la **permeabilidad vascular**⁹⁷. La familia de VEGF consta de cuatro proteínas homodiméricas, donde el VEGF-A, es el principal miembro de la angiogénesis, del cual existen cuatro isoformas, el VEGF 165 (forma molecular predominante) corresponde al VEGF de 165 aminoácidos. Multitud de moléculas participan en la regulación de VEGF aumentando su expresión: bFGF, interleucinas, prostaglandina E2 o PDGF, entre otros⁹⁸⁻⁹⁹.

El **FGF** (Factor de crecimiento fibroblástico) actúa también como factor **mitógeno**, pero de un amplio número de células de mamíferos, participa en la **reparación de tejidos**, curación de heridas y en la hematopoyesis¹⁰⁰. Además es un **factor angiogénico** que induce proliferación, migración y diferenciación de **células endoteliales**¹⁰¹. El bFGF (Factor de crecimiento Fibroblástico básico) es capaz de **aumentar la expresión de VEGF** mediante un mecanismo autocrino, favoreciendo su efecto angiogénico¹⁰².

Se ha demostrado la efectividad *in vivo* de **bFGF** como agente promotor de **vascularización** en estudios de ingeniería tisular pulmonar¹⁰³, además de validarse su aplicabilidad como **agente angiogénico** tanto en modelos *in vivo*⁹⁴ como *in vitro*¹⁰⁴. Sin embargo, se cree que la administración de un único factor de crecimiento parece no ser suficiente para el desarrollo de una vascularización normal⁸⁸.

Por todo ello, se ha explotado la utilización de diversas combinaciones de varios factores de crecimiento, demostrándose el **efecto sinérgico entre VEGF y bFGF** promoviendo un efecto angiogénico tanto *in vitro*^{88,104} como *in vivo*¹⁰⁵, por lo que, la utilización de ambos factores en el momento adecuado, puede promover no sólo la angiogénesis, sino la formación de vasos maduros y funcionales.

El uso de microcápsulas de **alginato** como **sistema de liberación controlada** ha sido muy explotado durante la última década, se han encapsulado factores de crecimiento como VEGF¹⁰⁶, TGF- β (factor de crecimiento transformante beta)¹⁰⁷, bFGF¹⁰⁸; y células¹⁰⁹.

El **alginato** es un polisacárido de la pared celular de algas pardas marinas de gran tamaño, de origen natural, el cual está constituido por dos unidades monoméricas, el ácido manurónico y el ácido gulurónico¹¹⁰.

Los bloques de ácido manurónico cuando se unen, adquieren una forma lineal, sin embargo los de ácido gulurónico, muestran una estructura en bucle. Cuando varias cadenas de bloques de ácido gulurónico se alinean, se forma una estructura capaz de albergar en su interior un catión divalente (**modelo en caja de huevos**), la cual explica las **propiedades gelificantes** de los alginatos¹¹¹ (Figura 8).

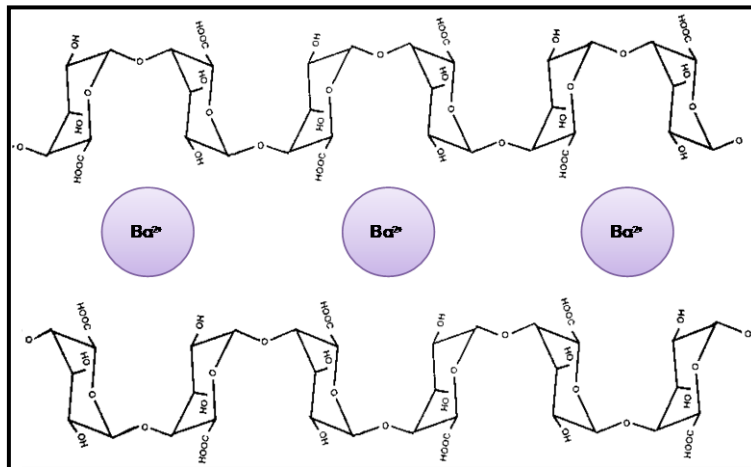


Figura 8. Estructura en red de la matriz alginato-bario, las esferas representan las moléculas del ión bario que permiten la unión de las cadenas en bucle del ácido gulurónico, formándose una estructura conocida como "caja de huevos", que permite que la estructura tenga mayor rigidez y consistencia.

Además, el alginato es biocompatible y no tóxico, hoy en día se utiliza en la industria cosmética y alimenticia como espesante, emulsionante y estabilizante¹¹². Todas estas propiedades lo presentan como un candidato ideal en la encapsulación de factores de crecimiento para su posterior aplicación en terapias de ingeniería tisular.

1. 2. La ingeniería de tejidos aplicada a la vía aérea

La ingeniería de tejidos aplicada a la vía aérea, se ha centrado en la **reconstrucción traqueal**^{3-7,114}. La tráquea presenta una complejidad funcional y estructural que la hacen particularmente especial a la hora de realizar una terapia regenerativa, debido a la diversidad celular, la estructura cilíndrica y rígida, y su débil vascularización.

Las **terapias regenerativas y reparativas en el pulmón** representan una **meta complicada**, principalmente debido a tres razones: la estructura altamente compleja del árbol bronquial en los pulmones, la amplia diversidad celular existente y que el epitelio pulmonar muestra tasas de renovación celular lentas¹¹³.

La porción conductora del aparato respiratorio, que incluye vías altas y bajas hasta los bronquiolos terminales, se sustenta por un esqueleto óseo y/o cartilaginoso, que ayuda a mantener la luz de los conductos respiratorios permeables al aire, además, presenta un **epitelio de revestimiento** pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes cuyas funciones son calentar, humedecer y limpiar de partículas extrañas y gérmenes al aire, en cuya lámina propia se encuentran abundantes glándulas serosas y mucosas¹¹⁵ (Figura 9).

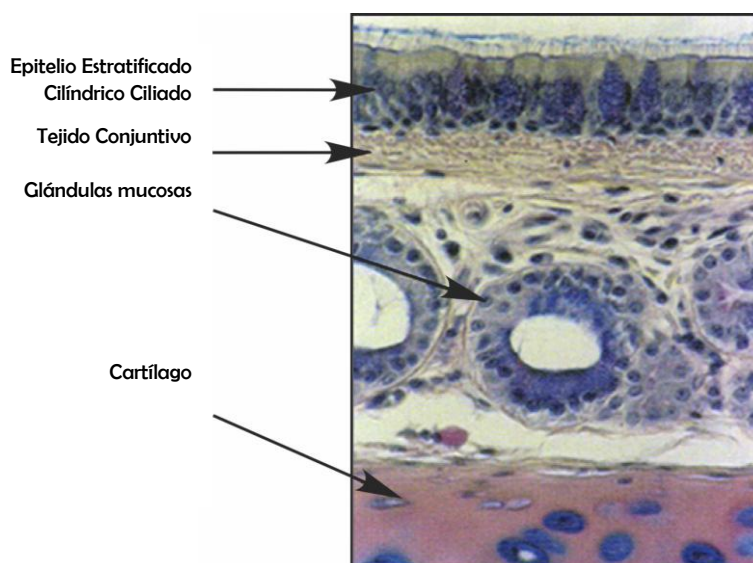


Figura 9. Corte histológico de tráquea. Tomado y modificado de Junqueira, L.C. & Carneiro J. Histología básica, texto y atlas. 2005. 6ª edición. Barcelona. Editorial Masson.

Patologías como el cáncer de pulmón, y en menor medida, otras como la tuberculosis o las bronquiectasias, generalmente requieren técnicas quirúrgicas radicales, como la resección total de un pulmón (neumonectomía) o de un lóbulo (lobectomía). Los cambios tanto anatómicos como fisiológicos que se derivan de ésta intervención, favorecen la aparición de complicaciones postoperatorias.

Entre las **complicaciones postoperatorias** que pueden aparecer tras una neumonectomía o lobectomía destacan: las hemorragias, hemotórax, empiema, insuficiencia respiratoria o cardio-respiratoria, y la fístula broncopleurales postneumonectomía, una de las complicaciones más graves y difíciles de resolver, asociada a la zona traqueobronquial.

Por tanto, debido a la **similitud histológica entre la tráquea y el bronquio**, se puede asumir que, los fundamentos de las terapias regenerativas de la tráquea se extrapolarían al bronquio, buscando la cicatrización y revascularización de la zona, factores necesarios para favorecer la regeneración del epitelio.

1. 3. La Fístula Broncopleurales Postneumonectomía (FBPN)

Se define **fístula** como aquella comunicación que se produce entre dos superficies epiteliales, por tanto, una **fístula broncopleurales (FBP)** consiste en la existencia de una comunicación entre el árbol traqueo-bronquial y la cavidad pleural¹¹⁶⁻¹¹⁷ (Figura 10). En otras ocasiones se puede decir que el término fístula broncopleurales se refiere a la pérdida de aire inspirado en la cavidad pleural por un período de tiempo superior a 24 horas¹¹⁸.

Por tanto, la **Fístula Broncopleurales Postneumonectomía (FBPN)** representa la aparición de una comunicación entre el espacio pleural y la vía aérea a través del muñón bronquial, tras la realización de una cirugía pulmonar con resección total del pulmón (neumonectomía).

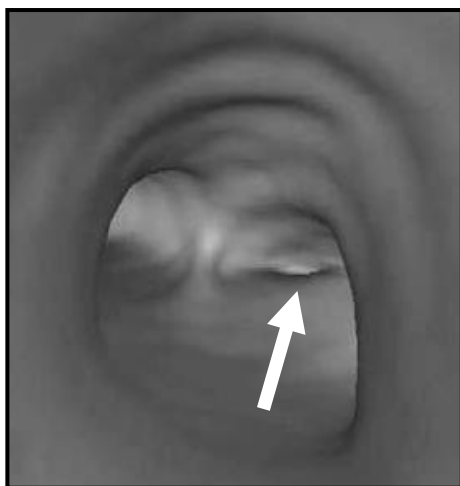


Figura 10. Broncoscopia virtual que muestra una fístula broncopleurales (flecha). Tomado de Eur J Cardio-thorac Surg 2009; 36: 415-416.

La **etiología** asociada a la aparición de una fístula broncopleurales es variada, pero la causa más común se deriva de complicaciones postoperatorias tras una resección pulmonar (lo más frecuente tras una neumonectomía y sobre todo, si ésta se produce en el pulmón derecho), seguida de problemas infecciosos (presencia de *Haemophilus influenzae* en el esputo), tratamientos con quimioterapia y radioterapia en cáncer, junto con la relación con diferentes patologías como el neumotórax espontáneo persistente o el síndrome de distrés respiratorio agudo, entre otras^{116,118} (Tabla 2).

Etiología asociada a la aparición de una fístula broncopleural	
Resección pulmonar	Tipo de resección: neumonectomía > lobectomía Resección pulmonar derecha > izquierda
Problemas infecciosos	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> Pneumonocos
Cáncer	Tratamientos con quimioterapia Tratamientos con radioterapia
Patologías específicas	Neumotórax espontáneo persistente Síndrome de distres respiratorio agudo Broncolitiasis
Iatrogénico	
Idiopático	

Tabla 2. Etiología asociada a la aparición de una fístula broncopleural.

La **prevalencia** de aparición de una fístula broncopleural tras una resección pulmonar es de entre el **3´1 y el 4´5%**, siendo mayor tras una neumonectomía que tras otros tipos de cirugías como la lobectomía o resecciones de lóbulo pulmonar más pequeñas¹¹⁸⁻¹²¹.

La **mortalidad asociada** de la fístula broncopleural postneumonectomía es del **33´3%**^{119,122}, lo cual implica que uno de cada tres pacientes que presentan esta complicación postoperatoria mueren debido a ella.

En cuanto a los **factores de riesgo** que afectan, o no, directamente a la aparición de una fístula broncopleural destacan: la **neumonectomía derecha** frente a la izquierda, problemas de **infección pleuro-pulmonar preoperatoria**, la necesidad de **ventilación mecánica postoperatoria prolongada** y la **técnica de cierre bronquial** (grapas o manual), entre otros^{119-120,123-126} (Tabla 3), aunque existen ciertas divergencias según autores.


Quizá, uno de los principales factores responsables del desarrollo de una fístula se deba, a la **extensa devascularización** del muñón bronquial, que facilita la posterior isquemia, necrosis o dehiscencia de la sutura del borde bronquial^{121,127}.


Factores de riesgo en la aparición de una fístula broncopleural	
Factores que incrementan el riesgo	Autores
Neumonectomía derecha	Sirbu et al., 2001 ¹¹⁹ ; Wright et al., 1996 ¹²⁰ ; Hollaus et al., 1997 ¹²³ ; Algar et al., 2001 ¹²⁴ ; Chae et al., 2006 ¹²⁵ .
Infección pleuro-pulmonar preoperatoria	Sirbu et al., 2001 ¹¹⁹ ; Wright et al., 1996 ¹²⁰ ; Chae et al., 2006 ¹²⁵ .
Ventilación mecánica postoperatoria prolongada	Sirbu et al., 2001 ¹¹⁹ ; Wright et al., 1996 ¹²⁰ ; Algar et al., 2001 ¹²⁴ ; Chae et al., 2006 ¹²⁵ .
Técnica de cierre bronquial	Wright et al., 1996 ¹²⁰ ; Chae et al., 2006 ¹²⁵ ; Sonobe et al., 2000 ¹²⁶ .
Sexo masculino	Hollaus et al., 1997 ¹²³ .
Hiperglicemia, hipoalbuminemia y terapias con esteroides prolongadas	Algar et al., 2001 ¹²⁴ .
Quimioterapia y radioterapia	Chae et al., 2006 ¹²⁵ ; Sonobe et al., 2000 ¹²⁶ .
Factores independientes	Autores
Técnica de cierre bronquial	Sirbu et al., 2001 ¹¹⁹ ; Algar et al., 2001 ¹²⁴ .
Quimioterapia y radioterapia	Sirbu et al., 2001 ¹¹⁹ ; Algar et al., 2001 ¹²⁴ .
Edad	Hollaus et al., 1997 ¹²³ ; Algar et al., 2001 ¹²⁴ .


Tabla 3. Factores que incrementan, o no, el riesgo de aparición de una fístula broncopleural, según distintos autores.

La posible mayor **prevalencia de fístulas en neumonectomía derechas** que en izquierdas, podría deberse a que: el muñón bronquial derecho es más largo, y por tanto presenta una mayor tendencia a abrirse; existe una mayor falta de cobertura mediastínica en comparación con el lado izquierdo; además en el muñón bronquial derecho suele realizarse una mayor devascularización, al estar irrigado generalmente por una única arteria bronquial^{119-120,124,128} .

Las fístulas broncopleurales postneumonectomía se clasifican en función del momento de aparición, según autores en:

 **Hollaus et al. 1997¹²³**: Fístulas **tipo I, II y III**; con aparición antes de las dos primeras semanas tras la cirugía, entre los 14 y 90 días, o con posterioridad a esta fecha, respectivamente.

 **Varoli et al. 1997¹²⁹**: Fístulas **tempranas, intermedias y tardías**; en función de que aparezca la FBPN tras la primera semana, en el mes o después del mes, respectivamente.

 **Algar et al. 2001**¹²⁴: Fístulas **tempranas** o precoces (aparecen en la primera semana postcirugía) y fístulas **tardías** (posteriores al plazo de una semana tras la cirugía).


Los tratamientos disponibles hoy en día son diversos, destacan la broncoscopia, los procedimientos quirúrgicos, un manejo adecuado de la pérdida de aire adaptando la ventilación mecánica, uso de pegamentos y selladores para el cierre de la fístula, y por último existen terapias preventivas, centradas en evitar la aparición de la fístula.


La **broncoscopia** inicialmente se utilizaba como método diagnóstico que permitía visualizar directamente la fístula, poco después se comenzó a aplicar sustancias selladoras a través del broncoscopio. Las limitaciones de esta técnica radican en que deben tratarse fístulas pequeñas, con pérdidas de flujo secundarias¹¹⁶.

Para minimizar la pérdida de aire y mejorar el intercambio gaseoso, se han utilizado diversas técnicas de **manipulación de la ventilación mecánica**, uso de catéteres intercostales y tubos en el pecho, sin embargo, estas manipulaciones son problemáticas al incrementar el riesgo de neumotórax y aumentar la posibilidad de infección de la cavidad pleural^{116,118}.

Los **procedimientos quirúrgicos** son agresivos debido a que, la toracostomía o ventana torácica permanente, implica una resección costal e invaginación de los colgajos miocutáneos adyacentes, permitiendo así la cura diaria durante meses e incluso años, lo que conlleva hospitalizaciones prolongadas con un elevado coste sanitario. Después, se cierra esta cavidad mediante plastia muscular¹³⁰. Por tanto, se trata de una técnica que conlleva importantes repercusiones estéticas y funcionales para los pacientes.

El uso de adhesivos como **selladores y pegamentos** para el cierre de una FBPN ha ido en aumento en las últimas décadas, diversos biomateriales han sido utilizados. Multitud de estudios han evaluado la validez de distintos adhesivos sintéticos para el cierre del muñón bronquial, aunque se han utilizado, los resultados son dudosos¹³¹⁻¹³⁴. El uso de **componentes naturales** frente a los sintéticos, ha adquirido cierto protagonismo debido a los graves problemas de histocompatibilidad que los sintéticos presentaban. Entre los selladores naturales más utilizados destacan:

 **Fibrina**: Es una de las proteínas de la coagulación, de origen natural, con bajo grado de inflamación, buena biocompatibilidad, pero baja fuerza de tensión. Existen versiones comerciales como el Tisseel/Tissucol[®] que se elaboran a partir de plasma de donantes, donde se concentra el fibrinógeno (se consigue mayor fuerza de tensión)³³, pero que presenta ciertos riesgos de transmisión vírica o problemas de rechazo inmunológico¹³⁶. Para paliar estos problemas existe la alternativa de utilizar fibrina autóloga a partir de la sangre del propio paciente, con buenos resultados como sellador¹³⁷.

 **Colágeno:** Es un componente del tejido conectivo, por lo cual se trata de un producto biocompatible. Se han fabricado tornillos de colágeno para ocluir las fístulas de pequeño tamaño, con buenos resultados, pero los cuales no pueden usarse para fístulas grandes¹³⁵.

Por último, se incluyen aquellas terapias preventivas que puedan ayudar a la **profilaxis de la FBPN**, intentando que esta complicación no se produzca tras una neumectomía, las cuales se centran en la protección del muñón bronquial mediante cobertura con tejidos viables y vascularizados, que ayuden a promover una temprana curación del bronquio^{117,124,126,138}. Entre otros, se han utilizado pleura parietal, músculo intercostal, vena ácigos y pericardio^{124,139}.

El éxito de los diferentes tratamientos es variable, lo que implica que no hay disponible un tratamiento perfecto que resulte totalmente eficaz, por tanto el tratamiento de cada paciente debe ser individualizado.

Durante las últimas décadas, la terapia celular y la ingeniería tisular se han convertido en herramientas clave en el tratamiento de múltiples patologías. En el ámbito de la cirugía pulmonar, la investigación se centra en la aplicación de las técnicas de la **ingeniería de tejidos**, intentando construir un **injerto tisular compatible** (biomateriales naturales o sintéticos utilizados previamente como selladores), que fomente la **vascularización y angiogénesis** de la zona a tratar (mediante la incorporación de factores de crecimiento o el uso de tejidos vascularizados) y, que a través de la incorporación de componente celular, se ayude a mejorar la **cicatrización**.

2.



Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. 1. Hipótesis de Trabajo

La falta de vascularización en los tejidos puede dar lugar a complicaciones clínicas graves, como es el caso de las fístulas broncopleurales postneumonectomía. La aplicación de un injerto tisular, capaz de revascularizar y cicatrizar el tejido, podría constituir un tratamiento preventivo eficaz en la fístula broncopleurales postneumonectomía o en otras patologías similares.

2. 2. Objetivo Principal

Evaluar las matrices de fibrina autóloga, cultivadas con fibroblastos dérmicos porcinos, como nicho para la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Implantar matrices de fibrina cultivadas y enriquecidas con factores de crecimiento como injerto tisular en neumonectomías para la profilaxis de la fístula broncopleurales postneumonectomía, y validar su efectividad y futura aplicabilidad en el ámbito clínico.

2. 3. Objetivos Específicos

1) Aislar y cultivar *in vitro* una línea celular porcina:

- Evaluar los rendimientos y viabilidad celular en superficies de cultivo.
- Caracterizar el tipo celular de estudio.

2) Elaborar andamiajes de fibrina autóloga aptos para el cultivo celular:

- Evaluar los rendimientos y viabilidad celular en los andamiajes de fibrina.
- Analizar la diferenciación mesenquimal dentro de las matrices de estudio.
- Incorporar factores de crecimiento y evaluar su influencia en el cultivo celular *in vitro*.

3) Diseñar un modelo animal porcino de estudio:

- Diseñar un modelo viable de neumonectomía y devascularización del muñón bronquial.
- Definir los grupos de estudio de implante: control, implante de matriz simple y del injerto tisular completo.

4) Evaluar el injerto tisular *in vivo*:

- Analizar la presencia de signos histológicos de rechazo agudo del implante y evaluar la cicatrización del margen bronquial.

- Comprobar la acción revascularizadora, la funcionalidad y madurez de los vasos neoformados.
- Comparar los resultados obtenidos tras implante de injerto tisular completo, matriz simple y grupo control.

3.



Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas

Se realizó un estudio experimental en **35 cerdos** (20 ♀ y 15 ♂) de la especie cruce **Large-White**, de entre 1 y 3 meses de edad y 15-35 kg de peso. Todos los animales fueron tratados bajo la normativa de **manejo ético de animales de experimentación** según directiva EU 86/609 de la Unión Europea y Real Decreto 1201/2005 de España. El protocolo experimental fue revisado y aceptado por el Comité de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Los animales fueron operados y cuidados bajo las instalaciones del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León (ULE).

3. 1. a. Extracción de biopsias dérmicas porcinas

Dos semanas antes de la resección pulmonar, se realizó la extracción de las biopsias dérmicas (n=35), las cuales fueron obtenidas de la zona alta del muslo de la extremidad inferior derecha. La **premedicación anestésica** empleada, consistió en una sedación conjunta con 0,35 mg/kg midazolam (Dormicum) y 5 mg/kg ketamina (Imalgene) por vía intramuscular, con mantenimiento con isoflurano (Isoflo) al 2%.

Se realizó una **desinfección previa** de la zona con jabón antiséptico (Desinpop), afeitado, limpieza con alcohol 96° (Noriega) y aplicación de povidona iodada al 10% (Yodicura). Con instrumental quirúrgico estéril, se procedió a la realización de un corte en forma de media luna con un tamaño aproximado de 5-8 cm, que permitió levantar la capa de piel. En la capa de piel, hacia el exterior se localiza la epidermis y hacia el interior la dermis, tejido que con pinzas y bisturí se separó del resto, hasta obtener en torno a **1-3 gramos de tejido dérmico** (Figura 11), el cual fue almacenado hasta su procesamiento a 4°C en una solución de transporte con cóctel de antibióticos HAM'S F12 (PAA) suplementado con 80 µg/ml Trobamicina (Braun), 320 µg/ml Soltrim (Almirall Prodefarma), 100 µg/ml Vancomicina (Normon) y 20 µg/ml Anfotericina B (Sigma Aldrich). La zona fue suturada con puntos sueltos de seda del número uno (30 casos) o con grapas (5 casos).



La herida finalmente fue cubierta con furacin 0,2% pomada (Seid), cuyo principio activo es un derivado de nitrofurano con actividad desinfectante, antiséptica, y antibacteriana de la mayor parte de los gérmenes patógenos que causan infecciones en la superficie de la piel.

Figura 11. Extracción de biopsia dérmica: A) Desinfección y afeitado; B) Zona limpia y afeitada; C) Aplicación de povidona iodada; D) En un campo quirúrgico estéril, se extrae el tejido dérmico.

3. 1. b. Extracción de muestras de sangre

En el mismo acto quirúrgico que se obtuvieron las biopsias dérmicas, fueron extraídos **20 ml de sangre** de vías periféricas en **tubos de citrato trisódico (9NC)** tamponado concentración 0.129 M (BD Vacutainer®). Se mezcló por inversión el citrato con la muestra de sangre para evitar que la sangre coagulara, y se transportó a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

3. 1. c. Procesamiento de las biopsias dérmicas

Las biopsias dérmicas fueron transportadas al laboratorio de cultivos celulares del Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León, donde fueron procesadas bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar vertical (Modelo V-100, Telstar). En primer lugar se llevó a cabo un **lavado** de las biopsias: 2 minutos en medio HAM'S F12 suplementado con 100 U/ml Penicilina y 100 µg/ml Estreptomina (PAA), a continuación se introdujeron durante 30 segundos en una mezcla de suero fisiológico (Braun) y alcohol 96° (Noriega) (1:1), para finalmente dejarse hasta ser troceadas en un medio base de HAM'S suplementado con 200 U/ml Penicilina y 200 µg/ml Estreptomina.

El tejido dérmico fue **disgregado mecánicamente** para favorecer la posterior **digestión enzimática** con colagenasa tipo I, de *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich), a una concentración de 2 mg/ml en Medio Eagle Modificación Dulbecco (DMEM, PAA), durante 22-24 horas a 37°C y humedad del 5% de CO₂, hasta que se consiguió una completa digestión. A continuación, se centrifugaron las muestras a 353g (1400 rpm) durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se repitió una segunda centrifugación a 353g 10 minutos, tras ser desechado el sobrenadante se obtuvo un pellet con las células sanguíneas y de la dermis (Figura 12).

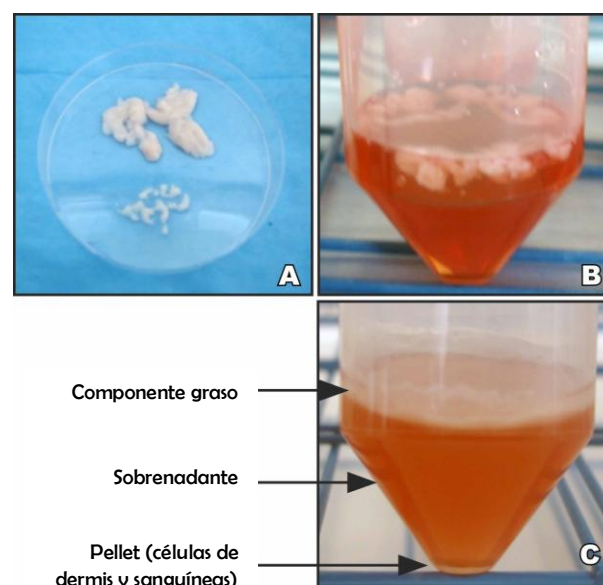


Figura 12. Disgregación de las biopsias dérmicas: A) Disgregación mecánica; B) Disgregación enzimática con colagenasa tipo I; C) Separación del componente celular tras centrifugación.

3. 1. d. Aislamiento, análisis y conservación del plasma

La sangre se centrifugó (Eppendorf Modelo 5804) a 1620g (3000 rpm) para la **obtención de la fracción plasmática** (40-60% de la sangre total) durante 10 minutos. Se tomó una alícuota representativa (20-50 µl) para el análisis de la concentración de fibrinógeno utilizando un analizador automático de la coagulación (Sysmex A500 Series, Embee Diagnostics). El plasma obtenido fue alícuotado en condiciones de esterilidad y congelado a - 40°C hasta su uso.

3. 2. Cultivo celular *in vitro* en superficies plásticas

El desarrollo de los cultivos celulares bajo condiciones *in vitro*, fue realizado bajo **estricta asepsia** en el laboratorio de Cultivos Celulares de la Fundación Clínica San Francisco de León, para ello, se trabajó en campana de flujo laminar vertical y todas las soluciones y materiales utilizados fueron filtradas y esterilizados, respectivamente.

3. 2. a. Contaje y viabilidad celular

El contaje celular, tanto de los tejidos digeridos como de las células tripsinizadas para la realización de subcultivos, se llevó a cabo gracias al **método de exclusión del Azul Tripán** (Solución de Azul Tripán al 0.4%, Sigma Aldrich), el cual permitió estimar también la viabilidad celular.

Los pellets de células obtenidos, tras centrifugación, fueron resuspendidos en un volumen de medio conocido. Se homogeneizó la muestra para extraer una alícuota de 10 µl. A continuación, se añadió un volumen conocido de Azul Tripán, se homogeneizó la suspensión y se dispensaron 10µl de la mezcla en cada una de las cámaras de contaje de una **cámara de Neubauer**. Con un microscopio óptico invertido se realizó el contaje celular de los 8 campos de la cámara. Para el cálculo del número de células de la muestra original se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Nº Células} = (\text{Nº células contadas} / 8) \times (1/\text{Factor Dilución}) \times \text{Volumen resuspensión} \times 10^4$$

Nº células contadas = Número total de células contadas en las 8 cámaras de contaje.

Factor Dilución = Nº veces que la muestra se diluye con el Azul Tripán.

Volumen resuspensión = Volumen total en el cual el pellet es resuspendido.

A la hora de contar las células, se diferenció entre células vivas y muertas; las **células vivas son redondeadas y refringentes**, mientras que **las muertas se tiñen de color azul**, ya que presentan daños en la membrana plasmática y por tanto, el colorante penetra a través de la misma. Se determinó el porcentaje de Viabilidad Celular gracias a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = [\text{Nº células vivas} / (\text{Nº células vivas} + \text{Nº células muertas})] \times 100$$

3. 2. b. Siembra celular

Las suspensiones celulares obtenidas tras las digestiones enzimáticas fueron sembradas en **superficies plásticas de poliestireno**, placas multipocillo con 6 pocillos de 9 cm^2 (BD Falcon), a diferentes densidades celulares desde 10^4 a 3×10^4 células/cm².

El **medio de cultivo completo** utilizado, se compone de un medio nutritivo base de DMEM suplementado con suero y un cóctel antibiótico (Penicilina /Estreptomicina), junto con el aminoácido esencial Glutamina (Tabla 4).

Composición del medio de cultivo completo	
Medio de Cultivo	Suplementos
Medio de cultivo completo	DMEM (PAA) + 10% SbF (Linus) + 100 U/ml Penicilina (PAA) + 100 µg/ml Estreptomicina (PAA) + 2 mM L-Glutamina (PAA)

Tabla 4. Composición del medio de cultivo completo: DMEM, Medio Eagle Modificación de Dulbecco; SbF, Suero bovino Fetal.

Se estableció, por tanto, el **cultivo primario (OP)**, el cual se mantuvo a 37°C y humedad del 5% de CO₂ en un incubador (Forma Scientific Modelo 3111) y se realizaron cambios de medio cada 2-3 días. El primer cambio de medio se acompañó de un lavado con suero fisiológico estéril (Braun), para facilitar la eliminación de los restos sanguíneos, que no se eliminaron con la digestión y la disgregación mecánica.

3. 2. c. Subcultivos (Tripsinización)

Cuando los cultivos primarios (OP) alcanzaron un **estado de confluencia** del 90%, se procedió a subcultivar. Para ello se sometió a las células a una solución de **Tripsina/EDTA (T/E)** 0´05/0´02% (PAA) durante 5-10 minutos a 37°C y humedad del 5% CO₂ para conseguir la individualización de las células, al romperse las uniones celulares de éstas con el soporte y las que se establecían entre ellas mismas. Posteriormente **se neutralizó la acción de la enzima** al añadir medio de cultivo con suero bovino fetal al 10%, y se procedió a su centrifugación a 353 g (1400 rpm) durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante resultante y se procedió a la cuantificación celular. Las células obtenidas fueron sembradas para **establecer los cultivos de primer pase (1P)**, tanto en superficies plásticas como en los andamiajes de fibrina. Además, una parte de esas células fue congelada para la realización de estudios con posterioridad.

Los **cultivos en superficies plásticas** permitieron evaluar los estudios de expansión, curvas de crecimiento y duplicación de células en los subcultivos siguientes. Cuando estas células alcanzaron el estado de preconfluencia, fueron sometidas al mismo procedimiento de tripsinización, y posteriormente fueron sembradas o congeladas, estableciéndose el cultivo 2P y así sucesivamente, hasta el pase 10P.

Parte de las células 1P fueron sembradas en los andamiajes de fibrina autóloga, los cuales fueron utilizados tanto para los implantes como para los estudios *in vitro* de adhesión, distribución, proliferación, viabilidad y diferenciación celular, junto con la evaluación de la influencia *in vitro* del factor de crecimiento fibroblástico encapsulado en microesferas de alginato.

3. 2. d. Congelación de células

Algunas de las células fueron congeladas para poder ser utilizadas en cualquier momento, sin seguir avanzando pases de cultivo. Para la congelación celular se necesitó un **agente crioprotector** que fue el **DMSO** (Dimetilsulfóxido, Sigma Aldrich) y un recipiente que aseguró una congelación a una velocidad lenta y gradual de **-1°C/min**, que en este caso se trató del Mr. Frosty (Nalgene) relleno con Alcohol Isopropílico al 100% (Sigma Aldrich).

En crioviales de 1ml (Nunc) fueron congelados **10⁶ células** con una solución crioprotectora con DMSO al 10% añadido al medio de cultivo completo, inicialmente se trabajó con todos los productos a 4°C, se introdujeron en el Mr. Frosty, y éste en un congelador de -80°C, al día siguiente se introdujeron los crioviales en Nitrógeno Líquido a -196°C, asegurándose así una larga preservación celular.

Cuando se descongelaron las células se controló la cadena de frío al igual que en la congelación, debido a que el DMSO a temperaturas de 37°C es tóxico. Para ello, se descongelaron los crioviales y rápidamente se neutralizó el DMSO al 10% llevando el ml del criovial a 9 ml de medio de cultivo completo, y procediéndose a centrifugar a 353g (1400 rpm) durante 10 minutos. Al pellet obtenido se realizó una **cuantificación celular y evaluación de la viabilidad celular** para determinar el número de células afectadas por el proceso de congelación.

3. 2. e. Evaluación de los rendimientos celulares

Se llevó a cabo un seguimiento por **microscopio óptico invertido** (Leica DMIL) y se realizó la toma de fotografías (Leica DFC 300 FX) todos los días de cultivo para evaluar la morfología y confluencia celular.

Se realizó un seguimiento del cultivo celular a distintos pases (OP a 1P), con contajes diarios para evaluar el comportamiento y proliferación celular durante un período de 12 días. Para ello, se procedió de igual modo que cuando se realizó un subcultivo, las células fueron tripsinizadas y contadas por el método del Azul Tripán. Se pudo evaluar por tanto, la **curva de crecimiento** obtenida para este tipo celular.

La **tasa de expansión** de un cultivo se estimó en función del número de células obtenidas en relación a las células sembradas, dando una idea del número de veces que la población incrementa, para ello se evaluó la tasa de expansión celular de los pases 1P a 5P de nuestro tipo celular. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Tasa expansión} = \text{N}^{\circ} \text{ células obtenidas} / \text{N}^{\circ} \text{ células sembradas}$$

En relación a la tasa de expansión, se pudo calcular la **tasa de duplicación celular**, para evaluar el número de veces que la población se duplicó en función del número de pases. Se evaluaron los pases 1P a 10P. Los resultados se expresaron como valores acumulados. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Tasa duplicación celular} = \log N / \log 2$$

$$N = \text{Tasa expansión} = \text{N}^{\circ} \text{ células obtenidas} / \text{N}^{\circ} \text{ células sembradas}$$

Finalmente, se realizó un estudio más exhaustivo de las células en 1P durante 15 días para poder evaluar la **proliferación celular en superficies plásticas** con contajes cada 3 días.

3. 3. Cultivo celular *in vitro* en andamiajes de fibrina

El desarrollo de los cultivos celulares *in vitro*, en andamiajes de fibrina, fue realizado bajo **estricta asepsia** en el laboratorio de Cultivos Celulares de la Fundación Clínica San Francisco de León, para ello se trabajó en campana de flujo laminar vertical y todas las soluciones y materiales utilizados fueron filtradas y esterilizados, respectivamente.

3. 3. a. Elaboración de los andamiajes de fibrina

Se mezcló en un recipiente estéril en condiciones de máxima asepsia los siguientes componentes: **400 µl/ml plasma congelado, medio de cultivo completo, ácido tranexámico 4 mg/ml** (Rottapharm) como agente estabilizante del coágulo y **cloruro cálcico 4 mg/ml** (Braun) como responsable de la coagulación final de la fibrina (Figura 13).

Se homogeneizó la muestra por pipeteo y se dispensó en el recipiente de cultivo en el que se coaguló la mezcla (Placas multipocillo BD Falcon de 6 y 12 pocillos, con 9´6 y 3´8 cm² cada pocillo, respectivamente). Las multiplacas de 6 pocillos se utilizaron para la elaboración de los andamiajes de implante, sin embargo, para los estudios *in vitro*, se usaron las multiplacas de 12 pocillos.

Se introdujo el recipiente de cultivo inmediatamente en un incubador a 37°C, humedad del 5% CO₂, a los 15-30 minutos la fibrina coaguló. Se dejó estabilizar 1-2 horas y tras el tiempo de estabilización del gel, se añadió un pequeño volumen de medio de cultivo completo para evitar así su posible desecación.

3. 3. b. Cultivo celular tridimensional

El componente celular se añadió a los geles de fibrina después de añadir el medio de cultivo completo, antes de añadir los agentes estabilizantes y formadores del coágulo de fibrina (ácido tranexámico y cloruro cálcico). Se utilizaron **células 1P** a concentración celular de **10⁴ células/ml**.

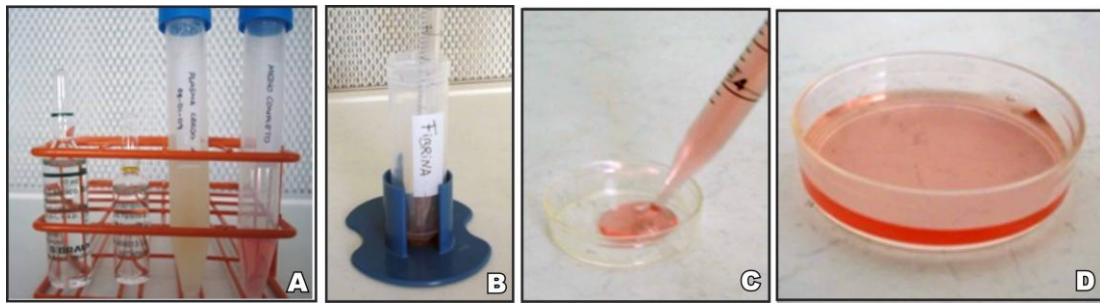


Figura 13. Elaboración de la matriz de fibrina: A) Componentes necesarios para la elaboración; B) Mezcla de los componentes en un recipiente estéril; C) Dispensación del gel de fibrina; D) Coagulación del andamiaje de fibrina tras estabilización del gel.

3. 3. c. Incorporación de factores de crecimiento

Se evaluó el **efecto *in vitro* sobre las células** del factor de crecimiento fibroblástico básico (**bFGF**) humano, encapsulado en microcápsulas de alginato de 250 μm de diámetro a una concentración 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El **efecto** del factor de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**) **no se pudo evaluar *in vitro*, pero sí *in vivo***, a través de la revascularización existente en los muñones bronquiales, en los cuales se implantó una matriz inicialmente avascular. El VEGF humano libre se añadió a concentración 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la solución Tris buffer pH 8, que contenía las microcápsulas de alginato con el bFGF.

El bFGF microencapsulado y el VEGF libre, todo ello en una solución Tris buffer, fueron suministrados por el Departamento de Ingeniería Química y Textil de Salamanca.

3. 3. d. Distribución, adhesión y morfología celular

Se evaluaron tres tipos de andamiajes: andamiajes de fibrina (**F, Fibrina**), andamiajes de fibrina con células (**FC, Fibrina-Células**) y andamiajes de fibrina con células y factores de crecimiento (**FCF, Fibrina-Células-Factores**).

Se llevó a cabo un seguimiento diario por **microscopio óptico invertido** (Leica DMIL) y se realizó la toma de fotografías (Leica DFC 300 FX) para analizar la morfología, adhesión y distribución celular.

La **microscopía electrónica de barrido (SEM)** permitió evaluar la distribución celular y de las microcápsulas en el andamiaje de fibrina, junto con el estudio de la estructura interna de la matriz de fibrina. Para ello, los andamiajes de fibrina fueron cortados en fragmentos pequeños de 5 mm^2 , fijados químicamente con glutaraldehído al 2.5% en oscuridad y a 4°C al menos durante 24 horas. Se lavaron las muestras con PBS (Sigma Aldrich) (3 lavados de 30 minutos) y después, se realizó la deshidratación de las muestras con soluciones crecientes de alcoholes (20, 30, 50, 70, 80, 90, (3) 96 y (2) de 100°, 45 minutos en cada alcohol (Panreac)).

A continuación, se procedió a la desecación por punto crítico de la muestra (CPD, Balzers) y al recubrimiento con oro por pulverización iónica (Sputter coater SCD 004, Balzers), finalmente, se realizó la visualización con microscopio electrónico de barrido (JEOL 6100), y se tomaron las fotografías pertinentes gracias al programa Jsm 5000.

3. 3. e. Proliferación celular

Se evaluaron dos tipos de andamiajes: andamiajes de fibrina con células (**FC, Fibrina-Células**) y andamiajes de fibrina con células y factores de crecimiento (**FCF, Fibrina-Células-Factores**).

El procedimiento de estudio de la proliferación celular en los andamiajes de fibrina, consistió en una **digestión enzimática en colagenasa tipo I**, concentración 2 mg/ml, a 37°C y humedad del 5% de CO₂ hasta conseguir una completa digestión de las matrices (20-24 horas), finalmente, se procedió al conteo celular con el método del Azul Tripán.

Se **evaluó la concentración celular de siembra óptima en los andamiajes de fibrina**, para ello, se sembraron 10⁴ y 2x10⁴ células/ml de fibrina. Se realizaron contajes tras 3, 6, 9, 14, 21 y 30 días de incubación.

Además, se llevó a cabo un estudio del cultivo de las células en 1P durante 15 días para poder **comparar la proliferación celular en los andamiajes de fibrina con respecto a las superficies plásticas** con contajes cada 3 días.

Finalmente, se realizó el **estudio comparativo de FC con respecto a FCF**, en placas multipocillo de 12 pocillos (BD Falcon), con 3,8 cm² cada pocillo, 1 ml de fibrina y concentración celular de 10⁴ células/ml, con contajes tras 3, 7, 14, 21 y 28 días en cultivo, para así, evaluar el **efecto real *in vitro* del bFGF sobre la proliferación celular**.

3. 3. f. Viabilidad celular

Se evaluaron dos tipos de andamiajes: andamiajes de fibrina con células (**FC, Fibrina-Células**) y andamiajes de fibrina con células y factores de crecimiento (**FCF, Fibrina-Células-Factores**).

Para el ensayo de la viabilidad celular se utilizó el **AlamarBlue** (AbD Serotec), un método cuantitativo que detecta la actividad metabólica de las células. El ingrediente activo del Alamar Blue (AB) es la resazurina, se trata de un compuesto de color azul, no tóxico y que no presenta fluorescencia. La **resazurina** resulta permeable a las células, por eso una vez dentro de éstas, mediante un proceso de reducción catalizado por enzimas mitocondriales y característico de las células metabólicamente activas, la resazurina se reduce a **resorufina**, un indicador fluorescente de color rosa brillante.

El Alamar Blue es muy fácil de usar, simplemente se añade sobre las células al 10% (v/v), éstas pueden estar en suspensión o adheridas; y se incuba en la estufa a 37°C durante 1-4 horas. Después del periodo de incubación, se realiza una **medición fluorimétrica** de una alícuota de 100 µl en placas de 96 pocillos, mediante un espectrofotómetro de fluorescencia (Excitación = 560 nm / Emisión = 590 nm, Synergy HT, Bio-Tek), finalmente se realiza el análisis de los datos (programa KC4 v3.3) (Figura 14). La cantidad de fluorescencia es proporcional al número de células viables y se corresponde con el número de células que poseen una actividad metabólica.

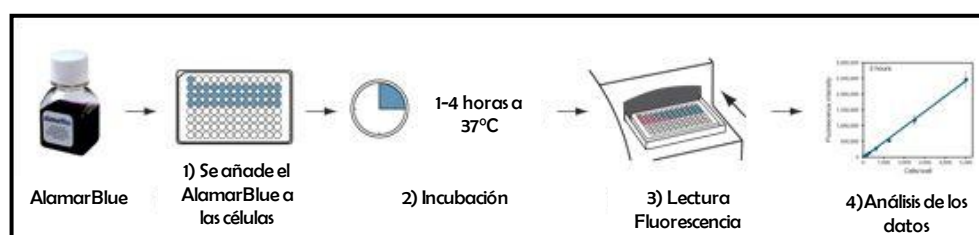


Figura 14. Modo de empleo del AlamarBlue. Tomado y modificado del catálogo de Molecular Probes®.

El AlamarBlue es un indicador colorimétrico pensado para la medición de **viabilidad, citotoxicidad y proliferación celular** para células en suspensión o adherentes sobre una superficie. En este caso, se evaluó la viabilidad celular de células crecidas en el interior de un andamiaje tridimensional, para ello, se necesitó obtener las **rectas patrón** de células 1P crecidas sobre superficies plásticas (lo que recomienda el fabricante) y en el interior de la fibrina, y así evaluar el tiempo adicional necesario de incubación en fibrina, obteniendo los mismos resultados de reducción del AlamarBlue para el mismo número celular en ambas rectas patrón.

El tiempo de incubación recomendado para las células crecidas sobre superficies plásticas es de 4 horas, se crecieron $10^4 - 5 \times 10^4 - 10^5 - 2.5 \times 10^5 - 5 \times 10^5 - 10^6 - 1.5 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ y 2.5×10^6 células. Se recogieron los datos de fluorescencia y se calculó el porcentaje de AlamarBlue Reducido según la siguiente fórmula:

% Reducción AlamarBlue = $[(F_e - F_b) / (F_{100} - F_b)] \times 100$
Fe = Fluorescencia 590 nm del medio de las células de estudio
Fb = Fluorescencia 590 nm del blanco (medio que recubre: el andamiaje de fibrina o la superficie plástica sin células)
F100 = Fluorescencia 590 nm AlamarBlue 100% Reducido (AlamarBlue autoclavado 15 minutos)

A continuación, se procedió al cultivo de entre 2×10^4 y 1.8×10^5 células en fibrina y se incubaron desde 2 horas hasta 30 horas, con mediciones de fluorescencia cada 2 horas.

Cuando se vio que las incubaciones de 6 horas en fibrina generaban resultados similares a los obtenidos con 4 horas de incubación en superficies plásticas para el mismo número celular, se realizó un ensayo para la elaboración de las rectas patrón para células crecidas sobre superficies plásticas y células crecidas en fibrina (10^4 - 5×10^4 - 10^5 - $2,5 \times 10^5$ - 5×10^5 - 10^6 - $1,5 \times 10^6$ - 2×10^6 - $2,5 \times 10^6$ células), que permitió relacionar el número de células con un porcentaje de reducción de AlamarBlue para un tiempo concreto de incubación.

Finalmente, se realizó el **estudio comparativo del número de células viables en FC con respecto a FCF**, en placas multipocillo de 12 pocillos (BD Falcon), con $3,8 \text{ cm}^2$ cada pocillo, 1 ml de fibrina y concentración celular de 10^4 células/ml, con contajes tras 3, 7, 14, 21 y 28 días en cultivo, para así evaluar el **efecto real *in vitro* del bFGF sobre la viabilidad celular**. Para la medición, se incubó el AlamarBlue durante 6 horas, con los datos de fluorescencia se estimó el porcentaje de reducción del AlamarBlue y con la recta patrón se determinó el número de células viables en los andamiajes de fibrina en función del día de estudio.

3. 3. g. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

En el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, se evaluaron dos tipos de andamiajes: andamiajes de fibrina con células (**FC, Fibrina-Células**) y andamiajes de fibrina con células y factores de crecimiento (**FCF, Fibrina-Células-Factores**).

El día de estudio, se cogieron las matrices de fibrina con pinzas y se metieron enteras o cortadas en trozos, en cassettes de histología con esponjas a ambos lados, y se fijaron en formol tamponado al 4% (Panreac). Después, se procedió a la deshidratación (alcohol de 70, 90 y 3 de 100°, durante 1 hora cada uno a 40°C), aclarado (3 xiloles de 1 hora a 40°C) e inclusión (3 ciclos de 1 hora en parafina Histosec® pastillas a 61°C) de las muestras en un inductor automático Leica ASP 300.

A continuación, se elaboraron bloques de parafina en un inductor Leica EG11404 que posteriormente fueron cortados con microtomo Leica RM2135 en **cortes de 4 μm** de la zona de estudio, los cuales fueron introducidos en un baño (Sakura) atemperado a 37-39°C, finalmente se colocaron los cortes en portaobjetos que posteriormente fueron sometidos a diferentes tinciones.

Las secciones fueron teñidas con **Hematoxilina & Eosina (H&E, Merck)** (Tabla 5) en un teñidor automático Thermo Scientific para poder evaluar la morfología, adhesión y distribución celular en los andamiajes de fibrina. Además, se realizaron tinciones específicas para **fibras colágenas y fibras elásticas**, con las técnicas del **Tricómico de Masson** (Bio-Optica) y **Orceína** (IHC-NovaUltra) (Tabla 6), respectivamente. Todas las técnicas se realizaron según las instrucciones del fabricante.

HEMATOXILINA & EOSINA
2 pases por Xilol de 4 minutos
2 pases por alcohol de 100° y 1 pase por alcohol de 80° de 4 minutos
Lavado en agua corriente, 3 minutos
Tinción con Hematoxilina, 1 minuto
Lavado con agua corriente, 3 minutos
Alcohol de 100°, 1 minuto
Lavado en agua corriente, 2 minutos
Pase por agua amoniacal (15 cm ³ amoniaco en 300 cm ³ de agua), 30 segundos
Lavado en agua corriente, 1 minuto
Tinción con Eosina alcohólica, 1 minuto
Pase por alcohol de 96° y 2 pases alcohol 100°, 30 segundos
2 pases por Xilol de 2 minutos

Tabla 5. Tinción Hematoxilina & Eosina.

TRICÓMICO DE MASSON	TINCIÓN ORCEÍNA
Lavado en agua destilada	Lavado en agua destilada
Se añade Hematoxilina férrica de Weigert, 10 minutos	Solución Permanganato Potásico O´15%, 10 minutos
Sin lavar, se añade solución alcohólica de Ácido Pírico durante 4 minutos	Lavado en agua destilada
Lavado en agua destilada	Solución Ácido Oxálico 5%
Se añade Fucsina Ácida de Ponceau durante 4 minutos	Lavado en agua destilada
Lavado en agua destilada	Solución Ácido Periódico O´5%, 5 minutos
Se añade solución ácida de fosfomolibdico, 10 minutos	Lavado en agua destilada
Sin lavar, se añade verde claro Goldner, 5 minutos	Solución Orceína 1%, 1 hora
Lavado en agua destilada	Lavado en alcohol 70%
Deshidratación en alcoholes crecientes durante 1 minuto	Deshidratación en alcoholes crecientes
Xilol	Xilol

Tabla 6. Tinción Tricómico de Masson y Orceína, para fibras colágenas y elásticas respectivamente.

Las secciones también fueron sometidas a técnicas inmunohistoquímicas. Por un lado, se evaluó la presencia de diferenciación fibroblástica hacia miofibroblastos con la detección de **Actina específica de músculo**, se estudió el estado proliferativo celular a través de la **proteína Ki-67**, y finalmente se estudió la presencia de **fibronectina** en los andamiajes de fibrina (Tabla 7).

Para ello, se utilizó según las instrucciones del fabricante un **sistema automático de detección Bond™ Polymer Refine Detection** (Vision Biosystem), basado en el uso de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante polimérica (HRP) para la detección de IgG de conejo y ratón unidas a tejidos incluidos en parafina y fijados con formol. Todas las fotografías fueron tomadas con un microscopio Axiophot Zeiss asociada a una cámara Nikon Digital Sight D5-U1.

Anticuerpos inmunohistoquímica		
Anticuerpo	Clon	Dilución
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- Actina específica de músculo (Novocastra)	HHF35	1:200
Anticuerpo monoclonal de conejo anti- KI67 (MasterDiagnóstica)	SP6	1:100
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- Fibronectina (DBS)	568	1:50

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en las tinciones inmunohistoquímicas de los andamiajes de fibrina.

3. 4. Caracterización celular

El tipo celular aislado de la dermis porcina, fue evaluado a través de estudios de diferenciación y mediante un estudio de marcadores de superficie, para discriminar la posible contaminación celular con otros tipos celulares y además, clarificar la posible naturaleza de las mismas como células madre mesenquimales (MSCs).

3. 4. a. Citometría de flujo

Células de pases **2P a 3P** fueron tripsinizadas, centrifugadas a 400g (1400 rpm) durante 5 minutos y se resuspendieron **500.000 células** en **buffer PBS/BSA** (Buffer Salino Fosfato pH 7.4 y Albúmina Sérica Bovina 1%). Se repitió la centrifugación a 400g y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se procede con la técnica de inmunofluorescencia indirecta siguiente:

1. Añadir el **anticuerpo primario o isotipo control** a la dilución recomendada (Tabla 8). Mezclar bien e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. (Volumen final 50 µl). Lavar el pellet con PBS/BSA. Centrifugar a 400g 5 minutos y descartar sobrenadante.
2. Añadir el **anticuerpo secundario marcado con FITC** (Fluoresceína isotiocianato) a la dilución recomendada (Tabla 8). Mezclar bien e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad (volumen final 50 µl). Lavar el pellet con PBS/BSA. Centrifugar a 400g 5 minutos y descartar sobrenadante.
3. Resuspender en 500 µl de PBS/BSA, poner en tubos de citómetro y proteger de la luz.
4. Adquirir datos con citómetro de flujo **CyAn_{ADP}** (Dako) y análisis de los datos con **Summit 4.3**

Anticuerpos e isotipos para citometría de flujo		
Anticuerpo o isotipo	Clon	Dilución
IgG1, k de Ratón Purificada, Isotipo Control (BD, 555746)	MOPC-21	Ac 1 ^{ario}
IgG2a, k de Ratón Purificada, Isotipo Control (BD, 555571)	G155-178	Ac 1 ^{ario}
Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD14 humano purificado (BD, 555396)	M5E2	1:10
Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD29 porcino purificado (BD, 552369)	NaM160-1A3	1:10
Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD31 porcino purificado (abdSerotec, MCA1746)	LCl-4	1:10
Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD45 porcino purificado (abdSerotec, MCA1222)	k252-1E4	1:20
Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD90 humano purificado (BD, 555593)	5E10	1:500

Tabla 8. Anticuerpos e isotipos control para Citometría de flujo: clones y diluciones.

3. 4. b. Métodos tradicionales de diferenciación: superficies plásticas y pellets

En las superficies plásticas células 1P fueron sembradas a 10^4 células/cm² en placas multipocillo de 24 pocillos (BD Falcon), con 2 cm² cada pocillo. Inicialmente, se cultivaron con medio nutritivo completo (Tabla 4) hasta alcanzar el estado de preconfluencia, entonces, se comenzó la diferenciación celular hacia linajes adipogénico y osteogénico (**MDA**, Monocapa Diferenciación Adipogénica, **MDAC**, Monocapa Diferenciación Adipogénica Control, **MDO**, Monocapa Diferenciación Osteogénica, y **MDOC**, Monocapa Diferenciación Osteogénica Control) al cultivarse con medios específicos de diferenciación (Tabla 9) durante **21 días**. Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días. Las células control se mantuvieron con medio de cultivo completo durante el mismo período. Las tinciones específicas se realizaron pasados 7, 14 y 21 días de cultivo.

La **diferenciación adipogénica** se puso de manifiesto gracias a la tinción **Oil-Red-O** (Tabla 10) que tiñe de rojo las **vacuolas lipídicas intracelulares**, características de los adipocitos. En cuanto a la **diferenciación osteogénica**, la tinción del **Rojo Alizarina** (Tabla 11) puso de manifiesto los **signos de mineralización**, al teñir de rojo los depósitos de calcio.

En los pellets células 1P fueron mantenidas a 10^6 células/pellet e incubadas en medio de **diferenciación condrogénico** (Tabla 9) **durante 21 días**, salvo los pellet control que se mantuvieron en medio de cultivo completo. Las muestras de estudio fueron **PDC**, Pellet Diferenciación Condrogénica, y **PDCC**, Pellet Diferenciación Condrogénica Control. Con mucho cuidado de no aspirar el pellet generado, se realizaron cambios de medio cada 2-3 días. Finalmente, estos pellet fueron fijados, tras 21 días en cultivo, en una solución de Metanol (ThinPrep PreservCyt[®] Solution, Cytec) y procesados para la realización de técnicas de tinción H&E y Azul Alcian (Tabla 12) e inmunohistoquímica de colágeno tipo II (Tabla 13).

Composición de los medios de diferenciación			
Medio de Cultivo	Suplementos	Tinciones Superficies Plásticas	Técnicas de los Andamiajes de Fibrina
Medio Diferenciación Adipogénica	DMEM (PAA) + 10% SbF (Linus) + 100 U/ml Penicilina (PAA) + 100 µg/ml Estreptomycin (PAA) + 2 mM L-Glutamina (PAA) + 100 nM Dexametasona (Sigma Aldrich) + 0.5 mM IBMX (Sigma Aldrich) + 10 µg/ml Insulina (Sigma Aldrich) + 200 µM Indometacina (Sigma Aldrich) + 500 µM ascorbato 2-fosfato (Sigma Aldrich)	Oil-Red-O	H&E y tinción Oil-Red-O
Medio Diferenciación Osteogénica	DMEM + 10% SbF + 100 U/ml Penicilina + 100 µg/ml Estreptomycin + 2 mM L-Glutamina + 10 nM Dexametasona + 500 µM ascorbato 2-fosfato + 10 mM β-glicerofosfato (Sigma Aldrich)	Rojo Alizarina	H&E, Rojo Alizarina, VonKossa, e inmunohistoquímica de osteopontina y osteocalcina.
Medio Diferenciación Condrogénica	DMEM + 1% SbF + 100 U/ml Penicilina + 100 µg/ml Estreptomycin + 2 mM L-Glutamina + 10 ng/ml TGF β1 (Sigma Aldrich) + 6.25 µg/ml Insulina + 50 µg/ml ascorbato 2-fosfato + 100 nM Dexametasona	-	H&E, Tinción Azul Alcian, e inmunohistoquímica de colágeno tipo II

Tabla 9. Composición de los medios de cultivo de diferenciación y tinciones específicas realizadas en cada ensayo de diferenciación: DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; SbF, Suero bovino Fetal; IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina; TGF β1, Factor de crecimiento transformante β1; H&E, Hematoxilina & Eosina.

La tinción **Azul Alcian** permitió discriminar de color azul sustancias como los **proteoglicanos** típicos de la matriz extracelular sintetizada por las células que han experimentado diferenciación condrogénica.

3. 4. c. Diferenciación hacia linajes mesenquimales en andamiajes de fibrina

Células 1P fueron sembradas a 10^4 células/ml en fibrinas de 2 ml utilizando como molde placas multipocillo de 12 pocillos (BD Falcon), con 3.8 cm^2 cada pocillo. Tras dejar estabilizar 24 horas los andamiajes de fibrina se procedió al cambio de medio de cultivo completo por medios de diferenciación **durante 35 días** (Tabla 9).

Se comprobó la capacidad de diferenciación de las células en el interior de los andamiajes de fibrina hacia linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico (**FDA**, Fibrina Diferenciación Adipogénica, **FDAC**, Fibrina Diferenciación Adipogénica Control, **FDO**, Fibrina Diferenciación Osteogénica, **FDOC**, Fibrina Diferenciación Osteogénica Control, **FDC**, Fibrina Diferenciación Condrogénica, y **FDCC**, Fibrina Diferenciación Condrogénica Control). Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días. Las matrices control se incubaron con medio de cultivo completo.

Los andamiajes de estudio, fueron fijados en formol al 4% (Histofix) tras 14, 21, 28 y 35 días en cultivo, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes (mismo procedimiento apartado 3. 3. g. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos), los cuales fueron sometidos a **técnicas de tinción e inmunohistoquímica específicas** (Tabla 9).

Algunos de los andamiajes de fibrina de diferenciación adipogénica fueron congelados a -40°C con Tissue-Tek OCT (Sakura) y cortados con criostato, para preservar la morfología de los adipocitos, los cortes de $6\ \mu\text{m}$ se dejaron secar al aire hasta su posterior tinción. En la diferenciación osteogénica se realizó la tinción de Von Kossa, para poner de manifiesto la presencia de mineralización (Tabla 14).

3. 4. d. Técnicas específicas de diferenciación

TINCIÓN OIL RED O (DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA EN SUPERFICIES PLÁSTICAS Y ANDAMIAJES DE FIBRINA)

Lavar con PBS (Sigma)
Fijar con Paraformaldehído al 4% (Panreac), 30 minutos a 4°C
3 Lavados con agua destilada (Braun)
Propanodiol (Sigma) al 100%, 2 minutos
Solución de tinción 30 minutos a temperatura ambiente: Oil-Red-O (Sigma)
O³⁵: 350 mg en 100 ml de Propanodiol
Lavar con Propanodiol al 60%
Lavar con agua destilada
Contrastar con Hematoxilina de Gill N^o2 (Sigma)

Tabla 10. Tinción Oil-Red-O, para la Diferenciación Adipogénica.

TINCIÓN ROJO ALIZARINA (DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA EN SUPERFICIES PLÁSTICAS Y ANDAMIAJES DE FIBRINA)

Lavar con PBS (Sigma)
Fijar con Metanol (Sigma), 30 minutos a 4°C
Lavado con agua destilada (Braun)
Solución de tinción 1 hora a temperatura ambiente: Rojo Alizarina (Sigma) 1%:
500 mg en 50 ml de agua destilada, se ajusta pH 6 con hidróxido amónico al 10% en agua destilada
Lavar con PBS

Tabla 11. Tinción Rojo Alizarina, para la Diferenciación Osteogénica.

TINCIÓN AZUL ALCIÁN (DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA EN PELLETS Y ANDAMIAJES DE FIBRINA)
Solución de tinción Azul Alcían (Sigma) 1%, 25 minutos
Lavado con agua destilada
Ácido periódico 1%, 20 minutos
Reactivo Schiff, 20 minutos
Lavado con agua corriente a 60°C, 10 minutos
Lavado con agua corriente
Lavado con agua destilada

Tabla 12. Tinción Azul Alcían, para la Diferenciación Condrogénica.

ANTICUERPOS DIFERENCIACIÓN		
Anticuerpo	Clon /Ref.	Dilución
Anticuerpo policlonal de conejo anti- Osteopontina (Thermo Scientific)	RB9097PO	1:50
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- Osteocalcina (Thermo Scientific)	MA1-43028	1:50
Anticuerpo policlonal de conejo anti- Colágeno tipo II (Monosan)	PSX1060	1:50

Tabla 13. Anticuerpos inmunohistoquímica utilizados en los estudios de diferenciación.

TINCIÓN VON-KOSSA (DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA EN ANDAMIAJES DE FIBRINA)
Solución de tinción Nitrato de Plata al 3%, 10 a 60 minutos
Lavado con agua destilada (Braun), 3 veces
Solución de tinción Tiosulfato de sodio al 5%, 2 minutos
Lavado con agua destilada (Braun), 3 veces
Contrastado con Nuclear Fast Red (Sigma), 5 minutos

Tabla 14. Tinción Von-Kossa, para la Diferenciación Osteogénica.

3. 5. Modelo animal porcino

El modelo animal que se planteó en este proyecto, consistió en un modelo de **ingeniería de tejidos** totalmente autólogo (Figura 15), donde de un mismo animal se extrajo el tejido dérmico y la sangre, que posteriormente, se utilizaron para la elaboración del injerto tisular que se implantó tras la realización de una neumonectomía, a la cual fue sometido el mismo animal dos semanas después.

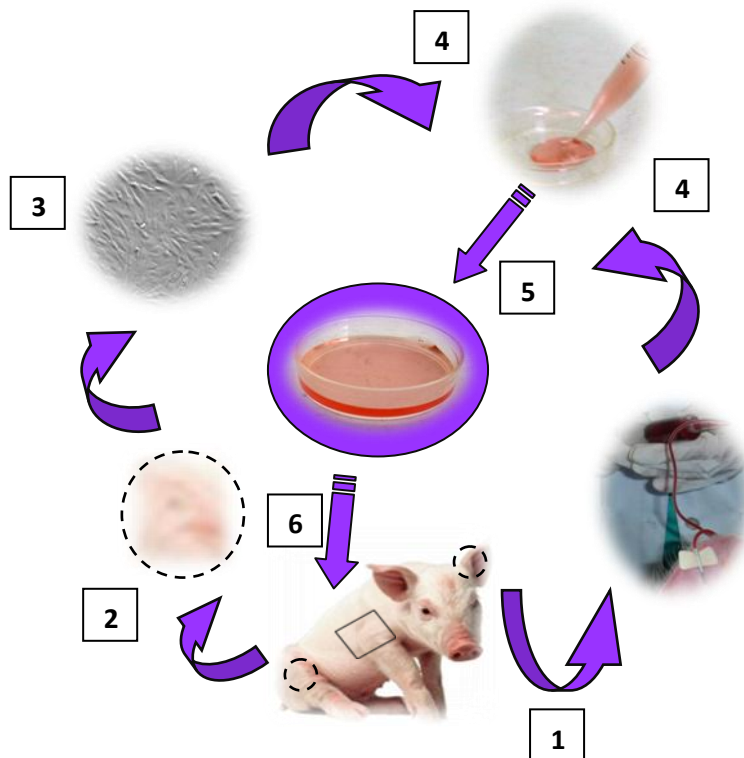


Figura 15. Modelo animal porcino de ingeniería de tejidos: 1) Extracción de muestra sanguínea, el círculo punteado marca la zona de extracción de sangre (oreja); 2) Extracción de biopsia dérmica, el círculo punteado marca la zona de extracción de dermis (zona alta de la extremidad inferior); 3) Cultivo celular *in vitro* de las células de origen dérmico; 4) Elaboración de un andamiaje tridimensional con el componente celular y elaborado a partir del plasma autólogo; 5) Aspecto del injerto tisular de implante; 6) Implante del injerto en el animal de partida tras la realización de una neumonectomía (lugar marcado por un rectángulo negro).

3. 5. a. Neumonectomía y devascularización del muñón bronquial

La neumonectomía se realizó pasados quince días de la primera intervención del animal (extracción de biopsias dérmicas y sangre). Una vez bien anestesiado, se colocó al animal en posición de decúbito lateral derecho. Se desinfectó la piel y se creó un campo quirúrgico estéril. Se realizó un **bloqueo intercostal** con bupivacaína al 0,5% (inyectando 1 ml en cada espacio intercostal) previo a la **toracotomía izquierda**, que se llevó a cabo a una altura aproximada de dos traveses de dedo por debajo de la punta de la escápula (Figura 16).

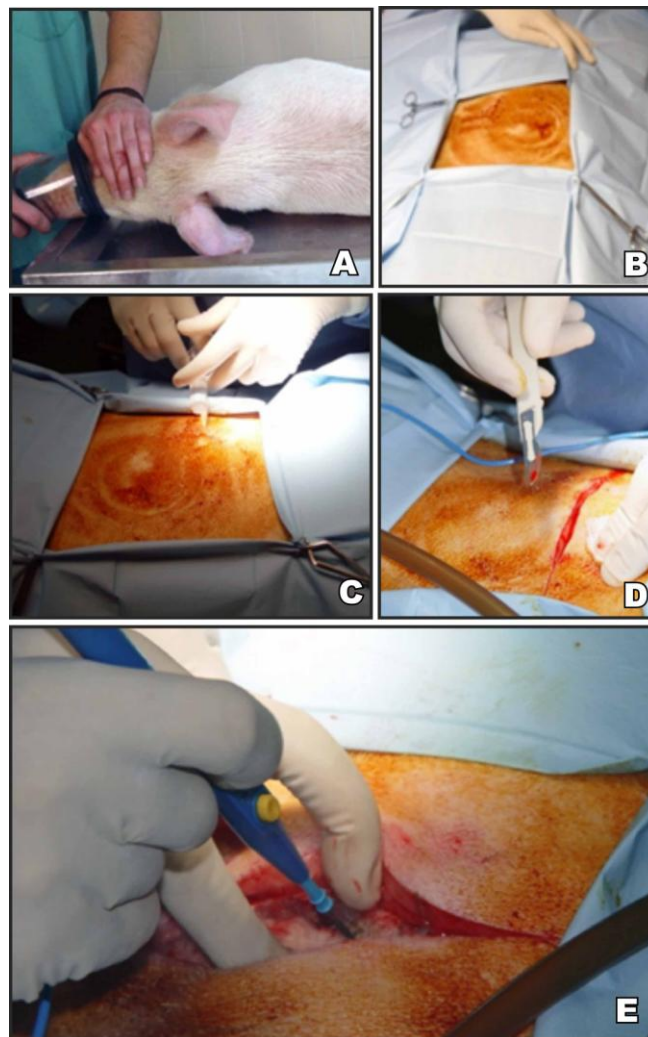


Figura 16. Preparación para el comienzo de la toracotomía: A) Anestesia del animal; B) Desinfección de la piel y preparación de un campo quirúrgico estéril; C) Bloqueo intercostal; D) Toracotomía izquierda; E) Sección de la piel, tejido subcutáneo y músculo.

En primer lugar, **se seccionó el ligamento pulmonar**, hasta la vena pulmonar inferior izquierda para permitir la movilización del lóbulo inferior izquierdo. Durante esta maniobra, se cuidó de no lesionar la pleura que cubre el lóbulo mediastínico derecho (visible desde el hemitórax izquierdo), para no provocar un neumotórax derecho que pudiera dificultar la ventilación postoperatoria.

A continuación, la **disección** se dirigió al cayado de la **vena ácigos izquierda**, bajo el cual se encuentra la arteria pulmonar izquierda e inmediatamente anterior a la misma, la vena pulmonar superior. Ambas estructuras se suturaron proximal y distalmente mediante ligadura de seda número cero, seccionándose a continuación. Finalmente, se disecó la vena pulmonar izquierda, que se suturó y cortó del mismo modo (Figura 17).

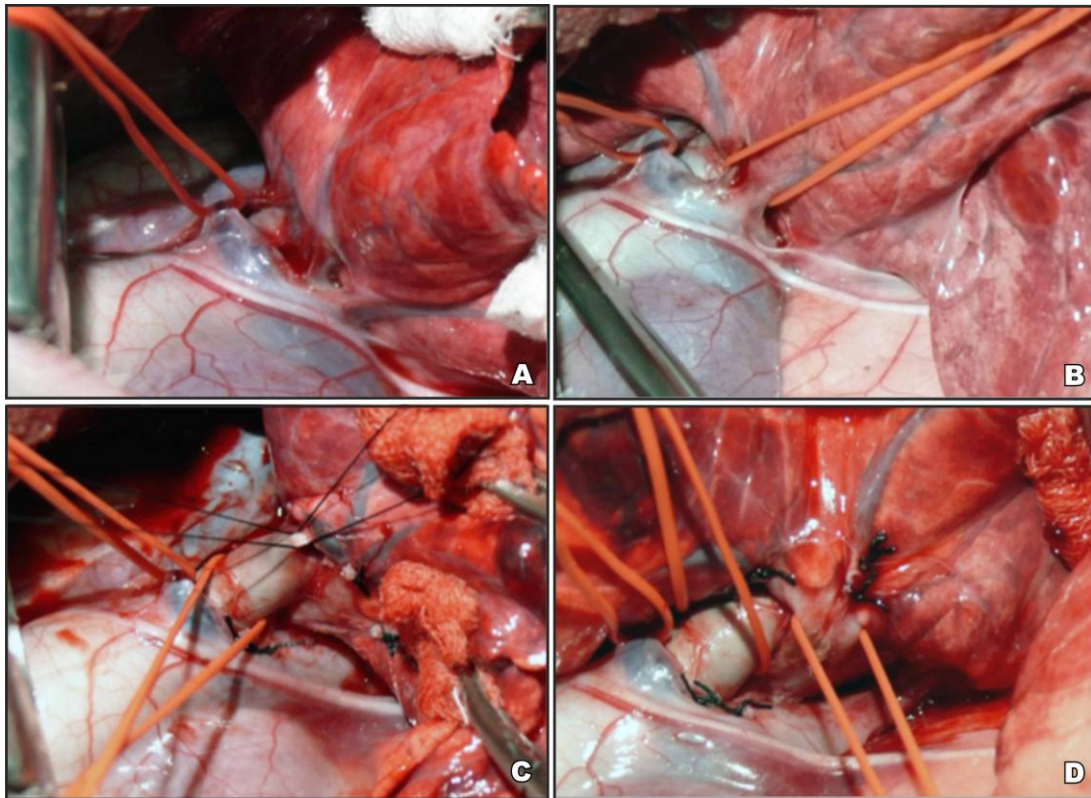


Figura 17. Devascularización del muñón bronquial: A) Disección de la vena ázigos izquierda; B) Disección de la vena pulmonar superior izquierda; C) Disección de las ramas arteriales del lóbulo superior izquierdo; D) Disección del bronquio izquierdo. Imágenes cedidas por el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Una vez seccionada la arteria pulmonar, se accedió cómodamente al **bronquio principal izquierdo** (inferior y posterior a la misma). Tras clampaje del mismo, se seccionó manualmente a nivel de su entrada en el parénquima pulmonar, a fin de conseguir un muñón bronquial largo. Dicho muñón se devascularizó de forma exhaustiva, liberándolo de todo su peribronquio y coagulando las arterias bronquiales que se encontraban. A continuación, se procedió a su cierre mediante sutura de 4/0 de ácido poliglicólico a puntos sueltos.

En este momento, se suturó en función del grupo de estudio el **andamiaje completo, la matriz simple**, o se dejó sin cobertura en los **controles**. La fijación de esta estructura al muñón bronquial se realizó con sutura de 4/0 de ácido poliglicólico a puntos sueltos.

Tras asegurar una correcta hemostasia y sin utilizar drenaje alguno, se procedió a **cerrar la toracotomía** con suturas pericostales reabsorbibles número cero, seguidas de sutura continua del plano muscular y cierre del tejido subcutáneo y piel con sutura continua, empleando seda del número uno.

3. 5. b. Grupos de estudio de implante

Se diferenciaron 3 grupos de estudio, en función de la cobertura del muñón bronquial tras neumectomía:

- 🧠 **Control (C):** El borde bronquial únicamente se suturó, no se utilizó ningún andamiaje de cobertura. (n = 5)
- 🧠 **Matriz Simple (MS):** El andamiaje de fibrina sin células ni factores de crecimiento se suturó en el borde bronquial. Debido a la baja consistencia de los andamiajes de fibrina para ser suturados se colocó encima una matriz de alginato rígida. (n = 10).
- 🧠 **Injerto Tisular Completo (ITC):** El andamiaje de fibrina con células y factores de crecimiento se suturó en el borde bronquial. Se colocó encima una matriz de alginato rígida (n = 20).

La matriz de alginato rígida se elaboró en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

3. 5. c. Anestesia, control postoperatorio y eutanasia

Como **medida analgésica** se colocó a los animales, 24 horas antes de la intervención, un parche transdérmico de fentanilo (Durogesic[®] 50 µg/kg) en la zona dorsal del cuello que se mantiene 72 horas. La profilaxis antibiótica se llevó a cabo con cefquinoma (Cobactan L.A. 7´5%) 2´5 mg/kg vía intramuscular.

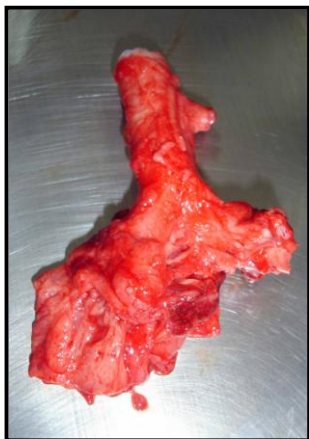
La **premedicación anestésica** empleada fue una combinación de midazolam a 0´35 mg/kg (Dormicum[®]), atropina 0´02 mg/kg (Atropina Braun) y ketamina 5 mg/kg (Imalgene[®]), todo ello aplicado por vía intramuscular.

La **inducción anestésica** se realizó con propofol (Propovet[®]) a dosis de 4 a 6 mg/kg, empleando un bloqueante neuromuscular el atracurio (Tracrium[®]) a 0´5 mg/kg, tras lo cual se realizó la intubación endotraqueal y se comenzó la ventilación controlada en modo volumen control, realizando el mantenimiento anestésico con isoflurano (Isoflo[®]) al 1%.

La **terapia antibiótica** durante el postoperatorio consistió en la administración de ciprofloxacino 500 mg/día vía oral durante 10 días.

Se diferenciaron 5 subgrupos de estudio, dentro de cada grupo de implante, en función de la **fecha postimplante**, en la cual los animales fueron eutanasiados: **3, 7, 14, 21 y 28 días**.

Para las **eutanasias** de los animales se realizó una sedación previa con midazolam y ketamina tras la cual se administró T-61[®] a dosis de 0,3 ml/kg (eutanásico de doble acción: embutramida, mebezonio yoduro y tetracaína clorhidrato) por vía endovenosa.



A continuación, se procedió a **extirpar la zona del muñón bronquial** izquierdo con su correspondiente cobertura en el caso de ITC y MS, realizándose un **hisopado** (Hisopo Amies, Copan) a través de tráquea, por la vía aérea de la **zona interna del muñón bronquial**, para su estudio microbiológico.

La pieza de biopsia (Figura 18) se introdujo en formol 4% y se envió en un plazo no superior a 24 horas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca para su estudio.

Figura 18. Biopsia del muñón bronquial. Se envió la porción de tráquea y el muñón bronquial, con su cobertura anexada en los casos ITC y MS.

3. 6. Evaluación *in vivo* del implante

Se evaluaron dos tipos de muestras; la **biopsia del muñón bronquial** para su estudio macro y microscópico (histología e inmunohistoquímica) en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, y los **hisopados** del muñón bronquial para una evaluación microbiológica en el Laboratorio de Microbiología del Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León.

3. 6. a. Estudio morfológico de los muñones bronquiales

Se extrajo el muñón bronquial de la solución fijadora (formol 4%) y se realizó un corte sagital de la zona de estudio para comprobar la **existencia de fístula broncopleurales postneumectomía** y evaluar macroscópicamente el **grado de granulación y epitelización**.

A continuación, se llevó a cabo un **tallado** más exhaustivo de la zona del muñón bronquial de **intersección con la sutura, matriz simple e injerto tisular completo**.

Se realizaron cortes sagitales de 3 mm de grosor de la zona de estudio y se procedió a su **inclusión** en parafina, para finalmente hacer cortes (mismo procedimiento apartado 3. 3. g. Estudios histológicos e inmunohistoquímico), los cuales fueron sometidos a tinciones con **H&E**, que permitieron seleccionar los bloques con mejores zonas de estudio para la realización de otras técnicas de estudio (Figura 19).

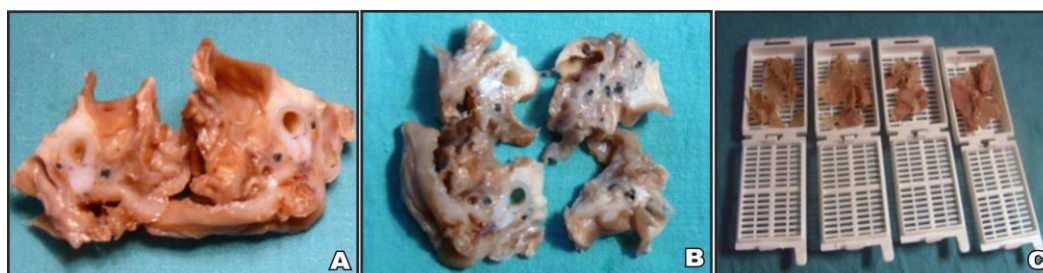


Figura 19. Tallado del muñón bronquial: A) Corte Sagital del muñón bronquial; B) Tallado exhaustivo de la zona de estudio; C) Cortes de 3 mm de grosor preparados para incluir.

3. 6. b. Estudio de la reacción inflamatoria

La tinción con H&E permitió evaluar la reacción inflamatoria, para ello se valoraron dos signos histológicos. Por un lado el **grado de inflamación**, diferenciando grados leves, agudos o crónicos. Y por otro se estudió los **signos de rechazo agudo**, caracterizados en la vía aérea por la presencia de infiltrados celulares perivasculares y/o peribronquiales, causantes en último término de isquemia y/o necrosis tisular.

3. 6. c. Análisis de la revascularización y el grado de maduración vascular

Los bloques seleccionados fueron sometidos a técnicas de inmunohistoquímica para verificar la **presencia de vasos sanguíneos capilares** y analizar el **grado de maduración vascular**, a través del marcador alfa actina de músculo liso (Novocastra, Dilución 1:50)

3. 6. d. Estudios microbiológicos

El hisopado de los muñones bronquiales, fue sembrado en medios de enriquecimiento sólidos y líquidos (por ese orden), los cuales fueron introducidos en un incubador a una temperatura de 37°C, y se mantuvieron bajo estas condiciones durante 7 días. El caldo de **Tioglicolato** (Maim) es un medio de enriquecimiento líquido muy utilizado en Microbiología, que permite el desarrollo de la mayor parte de las bacterias patógenas. Además, se utilizaron medios sólidos como las **placas de Agar Sangre al 5%** (Difco), para la visualización de las colonias obtenidas.

La aparición de turbidez en el caldo de tioglicolato o la presencia de colonias en las placas, indica la contaminación existente en la muestra de estudio. Para la caracterización de las colonias, se procedió realizando una resiembra de las colonias a **placas de enriquecimiento para el aislamiento de Gram +** (Placa Agar CNA, Difco) y **Gram -** (Placa Mc Conkey, Difco). Además, se realizaron pruebas complementarias como la **tinción de Gram** (Sigma Aldrich), que permitió, a través de esta tinción diferencial, distinguir bacterias Gram positivas (color morado) de las bacterias Gram negativas (color rosa o rojo) (Tabla 15).

TINCIÓN DE GRAM
Extensión de una colonia sobre un portaobjetos.
Fijar la muestra al calor (flameado 3 veces aprox.)
Agregar cristal violeta y esperar 1 min. Todas las células gram positivas y gram negativas se tiñen de color azul-púrpura.
Enjuagar con agua.
Agregar lugol y esperar 1 minuto.
Enjuagar con agua.
Agregar acetona y esperar 4 segundos
Enjuagar con agua.
Tinción de contraste con safranina 1-2 min. Las bacterias gram negativas se tiñen de rosa-rojizo.
Enjuagar con agua.
Visualización al microscopio óptico 100x con aceite de inmersión.

Tabla 15. Tinción de Gram.

A partir de la tinción de Gram, pueden distinguirse varias morfologías distintas: los **cocos** son de forma esférica, pueden aparecer aislados después de la división celular (Micrococos), aparecer por pares (Diplococos), formar cadenas (Streptococos), o racimos (Estafilococos).

Los **bacilos** poseen forma alargada, en general, suelen agruparse en forma de cadenas (Streptobacilos) o en empalizadas. También pueden distinguirse los **espirales**, que se clasifican en espirilos si son de forma rígida o espiroquetas si son blandas y onduladas. Si por el contrario, poseen forma de "coma", o curvados, entonces se los designa **vibrios**.

En el caso de obtener bacterias Gram positivas y con morfología de cocos, se realiza la **prueba de la catalasa**, que de manera muy general se podría decir que diferencia los Estafilococos (Catalasa +) de los Streptococos (Catalasa -). Cuando el resultado fue positivo, se realizó la **técnica de la coagulasa** (Biorad), que nos permite detectar la presencia del patógeno *Staphylococcus aureus* (Coagulasa +). En el caso de obtener bacterias Gram positivos y con morfología de bacilos, se suele de manera general hablar de bacterias del género *Bacillus* y *Corinebacterium*.

Por el contrario, si nos encontramos bacterias Gram negativas, por lo general bacilos, hablamos de Enterobacterias, que al no tratarse en su mayoría de bacterias patógenas, permitió la no realización de más pruebas de identificación.

En el esquema siguiente se representa el mecanismo de actuación en los estudios microbiológicos (Figura 20):

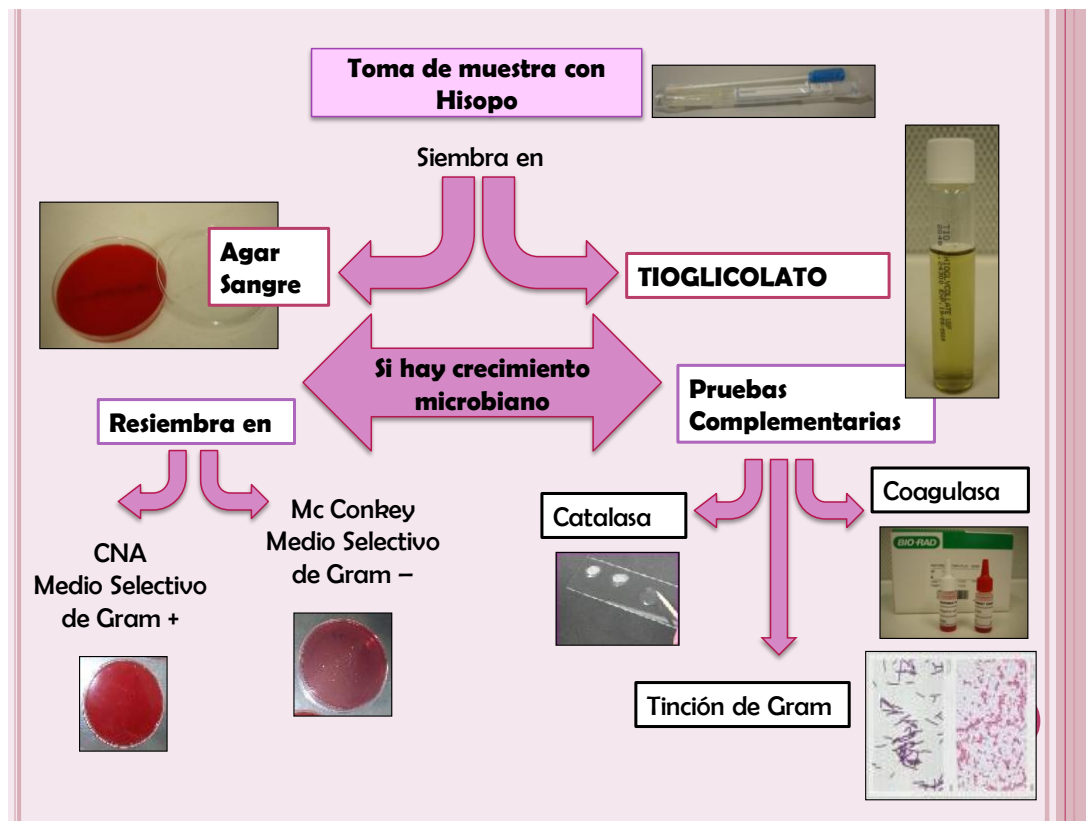
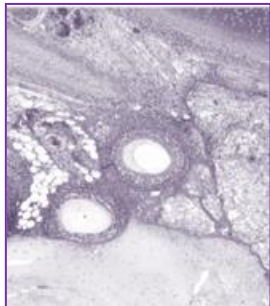


Figura 20. Estudios microbiológicos de los hisopados de los muñones bronquiales.

3. 7. Análisis estadístico

Las diferencias entre los distintos grupos, fueron determinadas mediante el programa informático SPSS Statistics 17.0. Los resultados se muestran como la media \pm desviación típica. Toda $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa. Para el estudio de los supuestos paramétricos normalidad y homocedasticidad se utilizaron respectivamente las pruebas Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, una vez comprobados dichos criterios paramétricos se realizaron análisis para muestras independientes gracias a la t-Student.

4.



Resultados

4. RESULTADOS

4. 1. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas

De las 35 muestras que fueron extraídas de dermis y sangre, ninguna sufrió problemas de contaminación durante su procesamiento u obtención. Todas las muestras fueron procesadas en un rango de tiempo inferior a 4 horas, evitándose la posible coagulación sanguínea o la pérdida de viabilidad celular en el tejido.

4. 1. a. Extracción, procesamiento y digestión de las biopsias dérmicas

La cantidad media de tejido dérmico obtenida fue de 2350 ± 850 mg, del cual tras una correcta disgregación y digestión enzimática se obtuvo $695'65 \pm 312'05$ células/mg tejido digerido (Tabla 16).

Procesamiento de las muestras de dermis		
Estudio	Media	SD
Cantidad dermis (mg)	2350	850
Nº células/mg tejido digerido	695'65	312'05

Tabla 16. Procesamiento de las muestras de dermis (n=35)

Las heridas realizadas para la extracción de las biopsias dérmicas, en el 85,71% (30/35) de los casos, no sufrieron ningún problema de infección o inflamación y se quitaron los puntos tras la correcta cicatrización de la zona, sin embargo, en 5 casos (en los que se usaron grapas) existió inflamación de la zona, y se procedió a su desinfección y limpieza, se quitaron las grapas y se cosió la herida, pero esta vez con puntos sueltos con seda del número uno.

4. 1. b. Aislamiento, análisis y conservación del plasma

La cantidad media de plasma obtenida tras centrifugación sanguínea fue de $8'2 \pm 1'3$ ml (Tabla 17), en el cual la concentración de fibrinógeno fue de 2-3'5 mg/ml de plasma (concentraciones fisiológicas). El plasma fue alicuotado en dosis de uso de 400 y 800 μ l para la posterior elaboración de andamiajes de fibrina.

Procesamiento de las muestras de sangre		
Estudio	Media	SD
Cantidad plasma (ml)	8'2	1'3

Tabla 17. Procesamiento de las muestras de sangre (n=35)

4. 2. Cultivo celular *in vitro* en superficies plásticas

El 100% de los cultivos OP *in vitro* fueron adecuados, en ningún caso se evidenciaron problemas de contaminación. Debido a problemas derivados de la manipulación algún pase posterior si sufrió contaminación, sin embargo, en ningún caso supuso la pérdida de esa línea celular, gracias a la congelación de células de todas las líneas en pases iniciales.

4. 2. a. Evaluación de los rendimientos celulares

Las células de dermis cultivadas en superficies plásticas presentaron una **morfología fusiforme** con prolongaciones citoplasmáticas alargadas, típica de células de naturaleza fibroblástica (Figura 21).

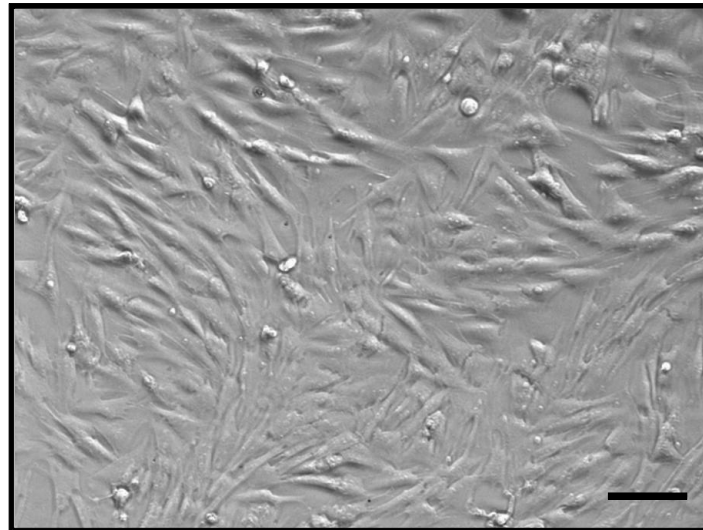


Figura 21. Morfología de las células de dermis crecidas en superficies plásticas tras 6 días en cultivo. Barra de escala = 100µm. Publicado en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

El crecimiento celular presentó un patrón similar de comportamiento independiente del pase, donde se pudieron diferenciar 4 etapas claramente diferenciadas. En primer lugar existió una **fase de latencia** (los primeros 2 días), donde no todas las células fueron capaces de adherirse a la superficie de cultivo, a continuación llegó la **fase de crecimiento exponencial**, que tras 9 días de cultivo, alcanzó una **concentración celular de saturación** que condujo a la **inhibición celular por contacto** (a partir del día 11) y por tanto comenzó a reducirse el número celular (Figura 22).

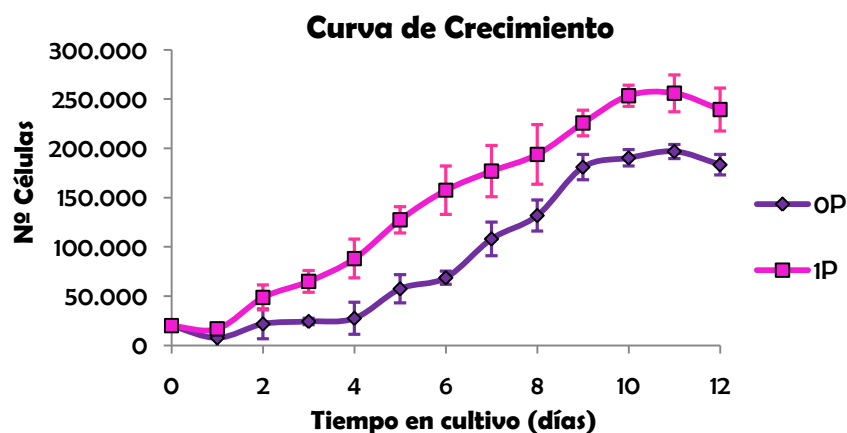


Figura 22. Curva de crecimiento en superficies plásticas para células de pasajes OP y 1P. Se representa el número de células frente al tiempo en cultivo (días) (n=5).

A través de la **tasa de expansión**, se evaluó la capacidad de las células para aumentar en número en función del pase, donde se estimó que el número de veces que crece la población es el mismo en los primeros pases ($p > 0.05$) (Tabla 18).

Tasa de expansión celular					
Pase	1P	2P	3P	4P	5P
Media	4.24	4.54	4.72	4.44	4.4
SD	1.57	1.59	1.68	1.51	1.17

Tabla 18. Tasa de expansión celular (n=10).

En relación a la tasa de expansión celular, se estudió la **tasa de duplicación celular**, que permitió conocer la capacidad proliferativa expresada como el número de veces que se duplica una población celular en cada pase, se detectó que las células se dividían aproximadamente dos veces en cada pase y que esta condición se mantenía estable al menos durante 10 pases (Figura 23).

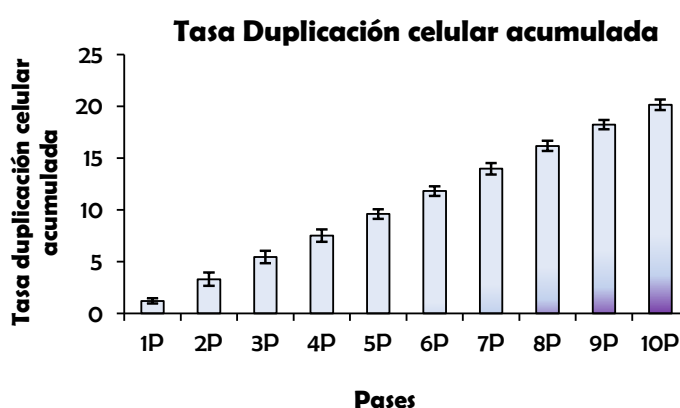


Figura 23. Tasa duplicación celular acumulada, evaluada entre los pases 1P a 10P (n=10).

4. 2. b. Viabilidad celular

La congelación y descongelación celular, resultaron ser exitosas debido a que, cuando se descongelaron los crioviales con 10^6 células y se evaluó la viabilidad celular de los mismos, los resultados fueron bastante buenos al obtenerse viabilidades en torno al 90% (Tabla 19).

% Viabilidad de las células congeladas		
	Media	SD
% Viabilidad	88.89	5.25

Tabla 19. Porcentaje Viabilidad celular (n=30).

El crecimiento celular de las células congeladas no presentó diferencias con respecto a las células no congeladas, se observó la misma capacidad proliferativa, por tanto, el procedimiento de congelación resultó efectivo para la conservación de las líneas celulares.

4. 3. Cultivo celular *in vitro* en andamiajes de fibrina

El 100% de los cultivos celulares realizados en los andamiajes de fibrina fueron exitosos, en ningún caso existió contaminación dentro de la matriz tridimensional elaborada.

4. 3. a. Distribución, adhesión y morfología celular

Los andamiajes de fibrina (F y FC) fueron estudiados gracias a la microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual permitió estudiar la microanatomía de la matriz, destacando una estructura en **mallá formada por una red de fibras** interconectadas, en la cual las células son capaces de adherirse (Figura 24).

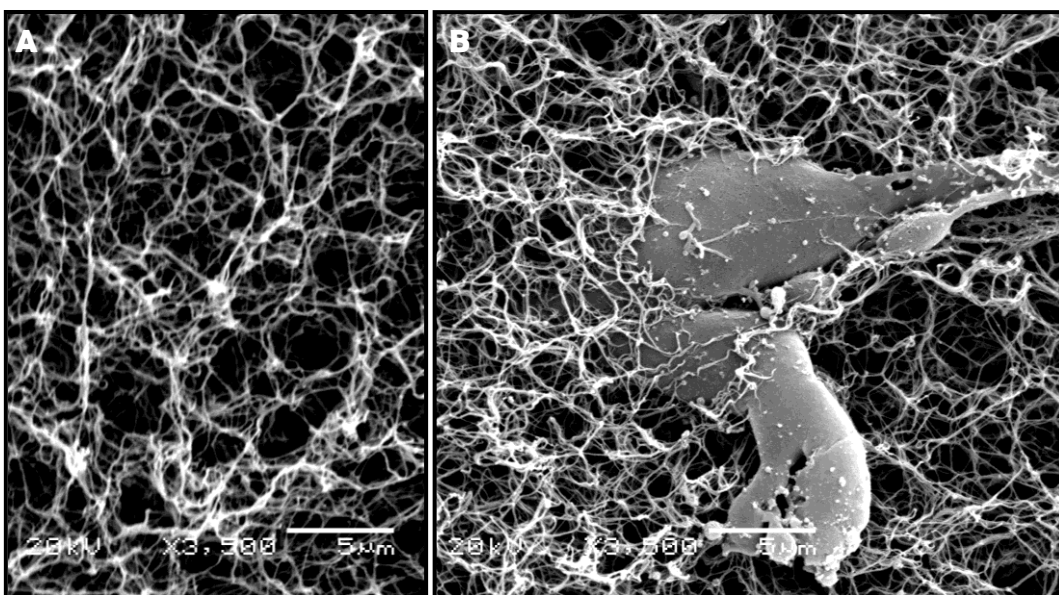


Figura 24. Microfotografía de microscopía electrónica de barrido de un andamio de fibrina (F) (A), y adhesión celular en un andamio con células (FC) (B). Barra de escala = 5µm.

La microscopía óptica (Figura 25) y el SEM (Figuras 26 y 27) de los andamiajes de fibrina con células (FC) y andamiajes de fibrina con células y factores de crecimiento (FCF), permitieron evaluar la **co-distribución de las células y las microcápsulas**.

Existió una buena **adhesión celular**, con evidente aumento del número celular con el paso del tiempo (Figuras 25 y 26). La morfología celular inicialmente se vio modificada con respecto a las células crecidas en superficie (Figura 21), el crecimiento en volumen, permitió un cambio de morfología hacia **células con mayor número de prolongaciones y éstas más alargadas** (Figuras 25. A y 26. B). En cuanto a la comparación de los dos tipos de andamiajes, visualmente no se apreciaron grandes diferencias en cuanto a número celular se refiere.

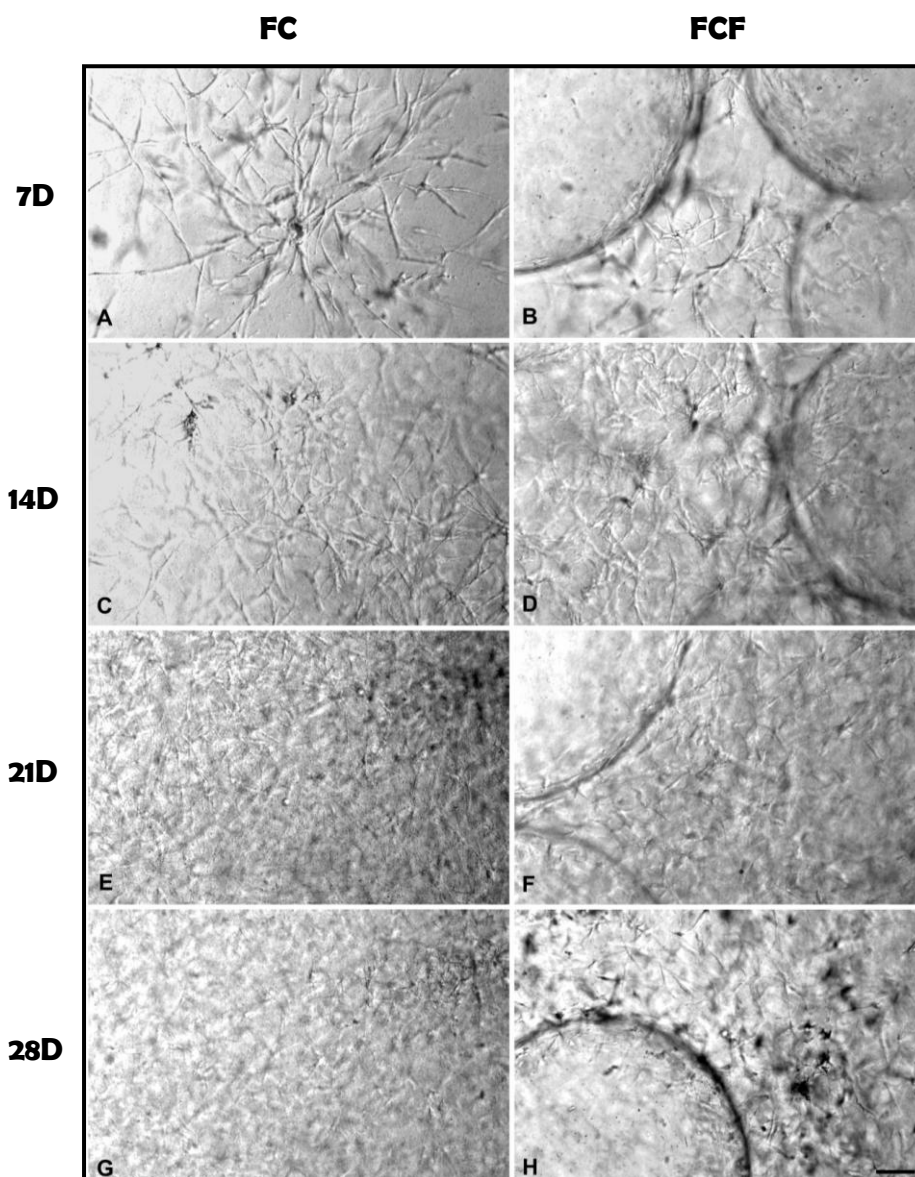


Figura 25. Distribución celular y de las microcápsulas en los andamiajes de fibrina con células (FC) (A-C-E-G) y andamiajes de fibrina con células y factores (FCF) (B-D-F-H), tras 7 (A-B), 14 (C-D), 21 (E-F) y 28 (G-H) días en cultivo. Barra de escala = 100µm. Imagen B publicada en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

A los 7 días en cultivo (Figuras 25. A y B y 26. A y B) se evidenció la presencia de **células con abundantes prolongaciones**, tras 14 días (Figuras 25. C y D y 26. C y D) en cultivo se apreció un **aumento importante en el número celular** con distribución homogénea celular por todo el andamiaje de fibrina. Tras 21 días (Figuras 25. E y F y 26. E y F) en cultivo, el aumento del número celular ya no fue tan evidente, **prácticamente la totalidad de la estructura tridimensional estaba ocupada**, para finalmente, a los 28 días (Figuras 25. G y H y 26. G y H) no evidenciarse un incremento llamativo en el número celular, pero si se apreció la **formación de una capa de células finas y planas en la superficie del andamiaje**, que se debía a la migración de las células del interior hacia la superficie, al no poder crecer más dentro de la matriz.

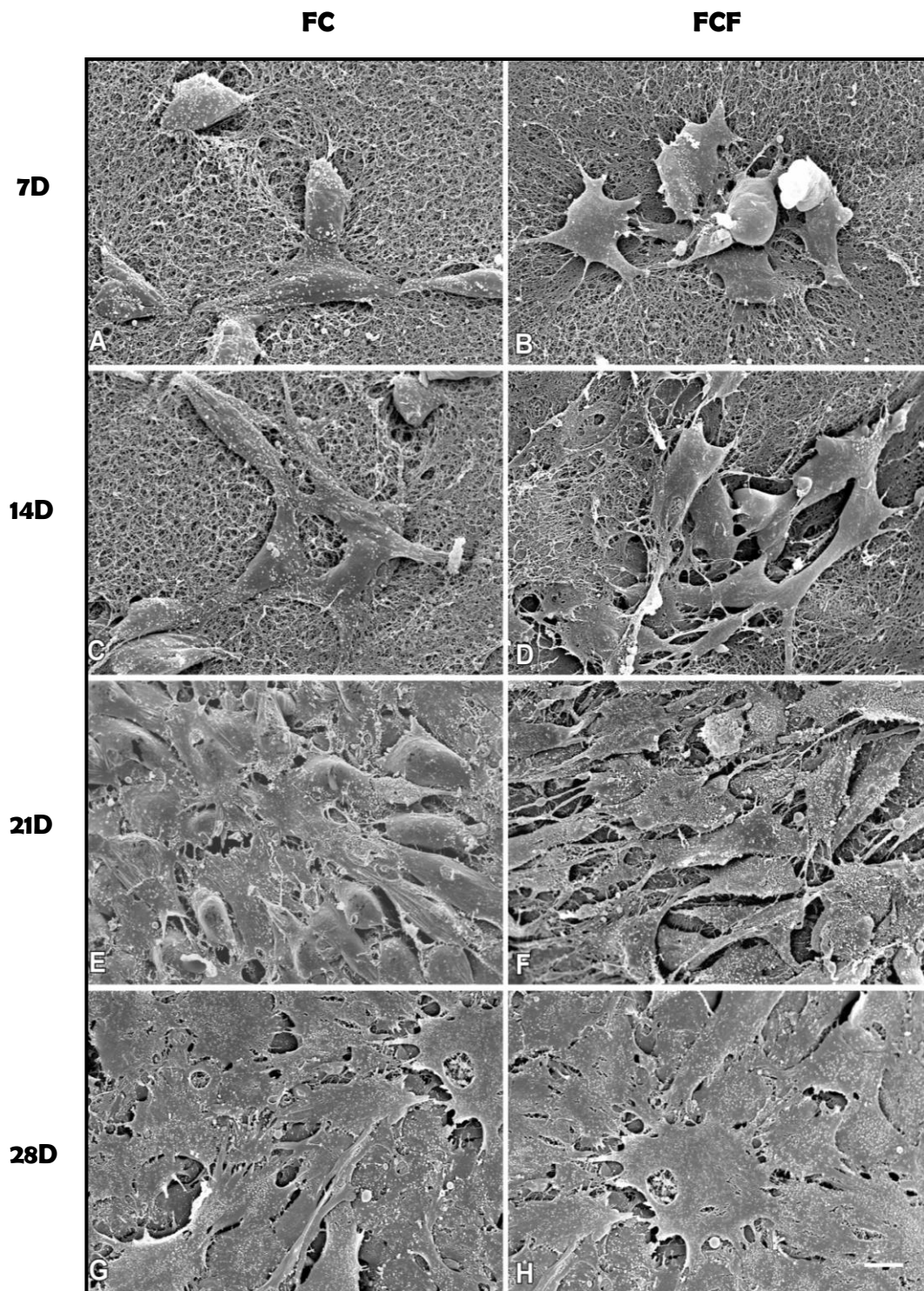


Figura 26. Microscopía Electrónica de Barrido de la distribución celular en los andamiajes de fibrina con células (FC) (A-C-E-G) y andamiajes de fibrina con células y factores (FCF) (B-D-F-H), tras 7 (A-B), 14 (C-D), 21 (E-F) y 28 (G-H) días en cultivo. Barra de escala = 10µm. Imágenes B, D y H publicadas en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

La evaluación de la distribución de microcápsulas por SEM, requirió la utilización de mayores aumentos, por lo que no se pudo evaluar con esta técnica la co-distribución de células y microcápsulas, se observó (Figura 27) que existían **microcápsulas homogéneamente distribuidas** por todo el andamiaje de fibrina.

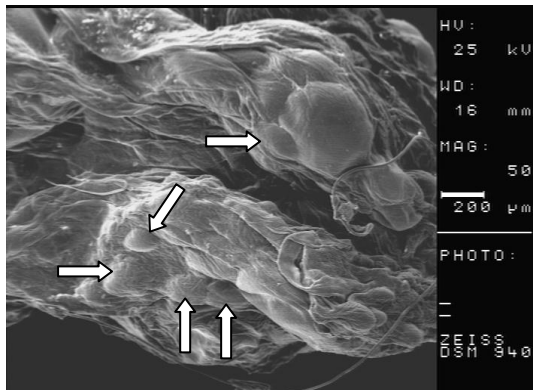


Figura 27. Microscopía Electrónica de Barrido de la distribución de microcápsulas (flechas) en los andamiajes de fibrina con células y factores (FCF). Barra de escala = 200 µm.

4. 3. b. Proliferación celular

La curva de crecimiento celular en los andamiajes de fibrina, presentó las **fases típicas de latencia (0-3 días), crecimiento exponencial (3-21 días), saturación (21-24 días) e inhibición celular (24-30 días)**, al igual que en el crecimiento en superficie (Figura 22), pero estas fases eran más largas, lo que prolongó el tiempo de cultivo. En cuanto a la evaluación de la concentración celular de siembra óptima en los andamiajes de fibrina, se evidenció una curva de crecimiento con el mismo perfil tanto para 10^4 como para 2×10^4 células/ml de fibrina, siendo ligeramente superior para 2×10^4 células/ml de fibrina (Figura 28). Es importante destacar que **con la mitad de células iniciales (10.000 células), se obtuvieron resultados muy similares ($p > 0,05$) tras 30 días en cultivo.**

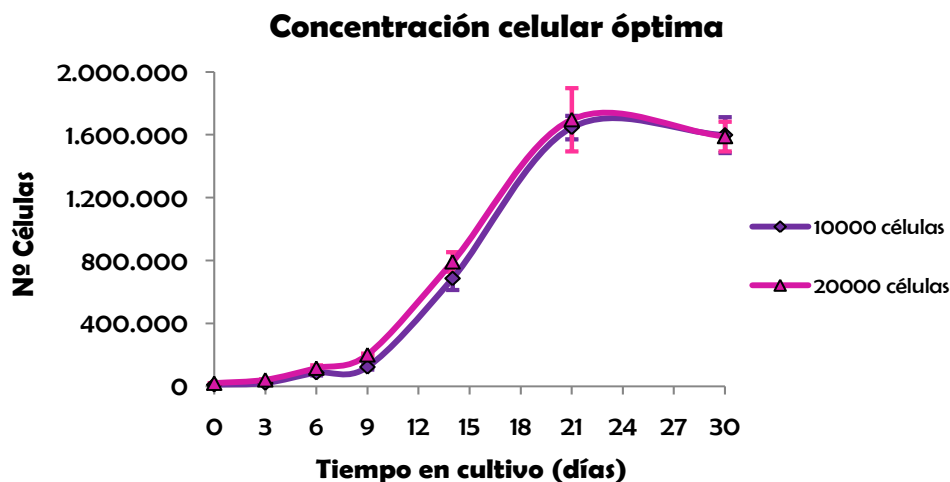


Figura 28. Curva de crecimiento en andamiajes de fibrina para 10.000 y 20.000 células. Se representa el número de células frente al tiempo en cultivo (días) (n=5).

Si se compara el **perfil proliferativo celular** en superficies plásticas con respecto a los andamiajes de fibrina, se observó como en la fibrina se pueden crecer células durante más tiempo obteniéndose números celulares más elevados. Al principio el comportamiento fue similar ($p > 0.05$) (hasta los 9 días), pero a partir de los 12 días existió más proliferación en los andamiajes de fibrina que en los cultivos en superficie ($p < 0.05$) (Figura 29).

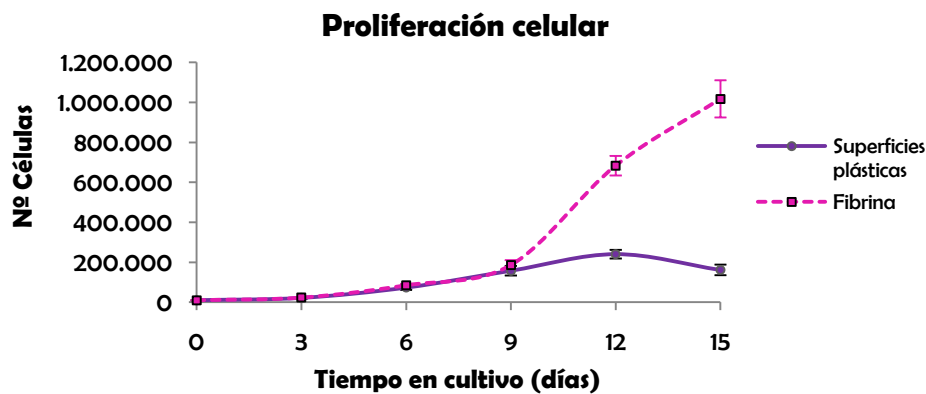


Figura 29. Curva de crecimiento en andamiajes de fibrina y superficies plásticas. Se representa el número de células frente al tiempo en cultivo (días) (n=10).

Cuando se evaluó el **efecto *in vitro* de bFGF** microencapsulado sobre la proliferación celular, se detectaron **cambios a los 14 días de cultivo** entre los andamiajes de fibrina con células (FC) y los andamiajes de fibrina con células y factores (FCF). El **número celular aumentó entre los 3 y los 21 días tanto en los FC como en los FCF**, observándose durante la última semana un punto de inflexión. La proliferación celular en los andamiajes de fibrina mostró que, de una siembra inicial de 10^4 células se obtenían casi 2×10^6 células en un período de 21 días. A los 14 días de cultivo se observaron diferencias significativas entre grupos (FC: $1.366.666 \pm 85.479 \text{ } 04$; FCF: $1.640.000 \pm 173.435 \text{ } 87$; $p = 0.006$) (Figura 30).

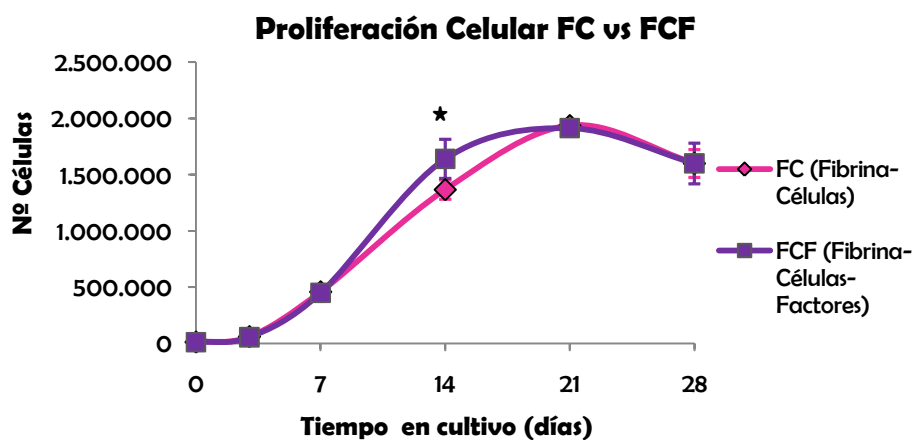


Figura 30. Proliferación celular en andamiajes de fibrina FC y FCF. Se representa el número de células frente al tiempo en cultivo (días) (n=12). (* $p < 0.05$). Publicado en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

4. 3. c. Viabilidad celular

El ensayo de viabilidad fue llevado a cabo gracias al método del AlamarBlue. En primer lugar se estandarizó la técnica para cultivos de células sobre superficies plásticas (recomendación del fabricante). Para ello se **sembraron distintos números celulares en superficies plásticas adecuadas** y se incubaron con AlamarBlue durante 4 horas (Figura 31). Pasado ese tiempo se recogieron las alícuotas y se realizó la **medición fluorimétrica** que detectó la reducción de la resazurina (azul y no fluorescente) en resorufina (rosa y fluorescente) debido a la presencia de células metabólicamente activas, por tanto viables. Se visualizó una **gradación cromática en función del número de células utilizado** (Figura 32), obteniéndose una recta patrón para el crecimiento celular en superficies plásticas.

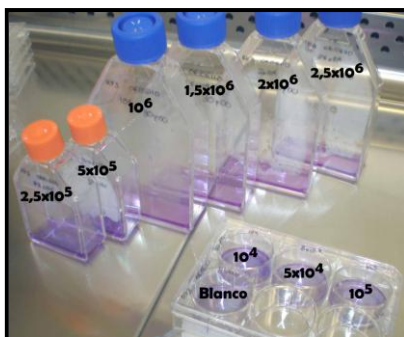
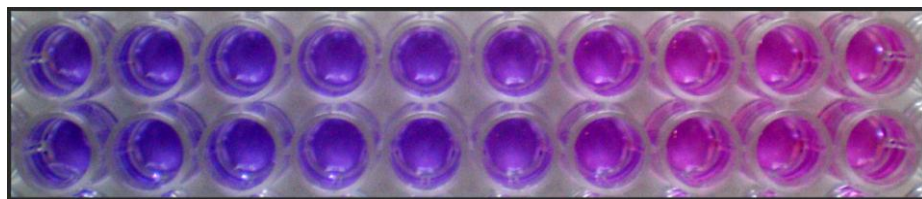


Figura 31: Ensayo viabilidad sobre diferentes superficies plásticas. Siembra de distintos números celulares en superficies plásticas adecuadas (Placa de 6 pocillos: 10^4 a 10^5 células, T-25: $2 \cdot 5 \times 10^5$ a 5×10^5 células y T-75: 10^6 a $2 \cdot 5 \times 10^6$ células) para la elaboración de la recta patrón que relacione % Reducción de AlamarBlue con diferentes números celulares, para un mismo tiempo de incubación en AlamarBlue (4 horas).



Blanco 10^4 5×10^4 10^5 $2 \cdot 5 \times 10^5$ 5×10^5 10^6 $1 \cdot 5 \times 10^6$ 2×10^6 $2 \cdot 5 \times 10^6$

Figura 32: Escala cromática de viabilidad celular en superficies plásticas obtenida a partir de las alícuotas del medio de las células crecidas sobre superficies plásticas tras 4 horas de incubación con AlamarBlue en función de los diferentes números celulares utilizados.

A continuación, se procedió a trabajar con **células crecidas en andamiajes de fibrina** (no sobre andamiajes de fibrina), lo que implica tener que averiguar el **tiempo que requiere el colorante para difundir y penetrar** en el andamiaje y llegar a las células (Figura 33).



Fibrinas sin AlamarBlue Tiempo 0 AlamarBlue Penetración AlamarBlue

Figura 33: Incubación y penetración del AlamarBlue en andamiajes de fibrina.

Inicialmente se trabajó a concentraciones celulares bajas a distintas horas de incubación para **valorar el tiempo óptimo de incubación en los andamiajes de fibrina**, aquel que para el mismo número celular presentó un valor similar de porcentaje de reducción del AlamarBlue en superficies plásticas y fibrina. Se observó cómo, a medida que pasaban más horas de incubación dicho porcentaje incrementaba, aun trabajando con concentraciones celulares bajas (cuanto más tiempo, las mismas células siguen reduciendo el colorante) (Figura 34).

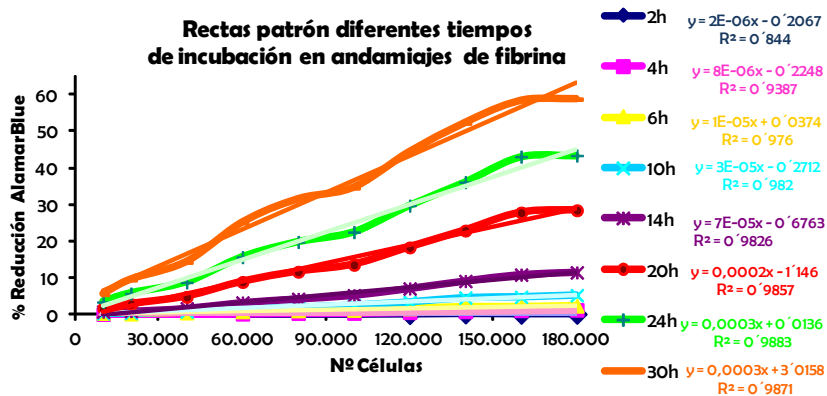


Figura 34: Rectas patrón de tiempos de incubación en andamiajes de fibrina. Se representa el % Reducción del AlamarBlue frente al número de células (n=4). Se indica los valores de las rectas patrón obtenidas para los diferentes tiempos de incubación.

Cuando se comparó los resultados obtenidos en superficies plásticas y en andamiajes de fibrina para los mismos números celulares, se comprobó que **el AlamarBlue requería un tiempo aproximado de 2 horas más de incubación para penetrar y llegar a las células en los andamiajes de fibrina** (Figura 35). Las rectas patrón obtenidas para ambas condiciones permitieron evaluar en función de un porcentaje de reducción del AlamarBlue el número de células viables presentes, sin necesidad de destruir el andamio como ocurría en los estudios de proliferación celular, y por tanto poder evaluar la viabilidad celular de un mismo andamio de fibrina a diferentes tiempos de cultivo.

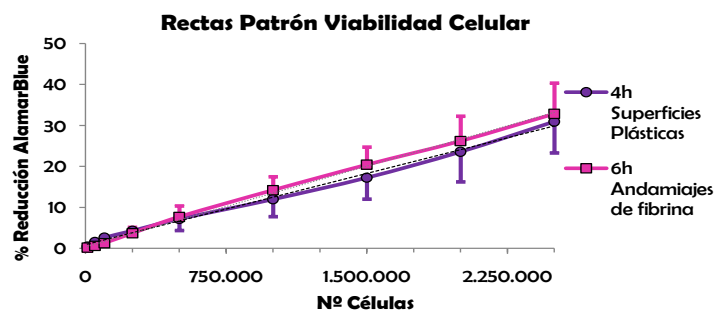


Figura 35: Rectas patrón de viabilidad celular en superficies plásticas y en andamiajes de fibrina. Se representa el % Reducción del AlamarBlue frente al número de células cultivadas sobre superficies plásticas e incubadas durante 4 horas con el colorante y células cultivadas en andamiajes de fibrina e incubadas durante 6 horas. Los valores de las rectas patrón fueron en superficies plásticas: $y = 0'0000131x + 0'3605570$, $R^2 = 0'9983441$ y en los andamio de fibrina: $y = 0'0000115x + 0'9003924$; $R^2 = 0'9958427$ (n=10). ($p > 0'05$). Publicado en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

Cuando se evaluó la **gradación cromática de la reducción del AlamarBlue en función de las diferentes concentraciones celulares sembradas en los andamiajes de fibrina**, ocurrió al igual que en las superficies plásticas, existía una escala cromática desde azul-morado a rosa, cuanto mayor era el número celular, tras una incubación de 6 horas (Figura 36).

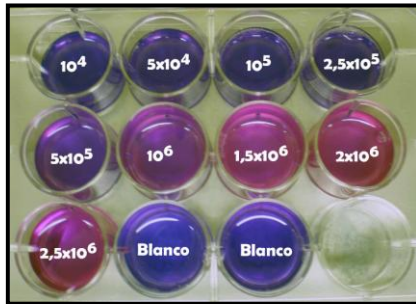


Figura 36: Escala cromática de viabilidad celular en andamiajes de fibrina tras 6 horas de incubación con AlamarBlue en función de los diferentes números celulares utilizados.

Por último, se evaluó el **efecto *in vitro* del bFGF microencapsulado sobre las células**, el ensayo de **viabilidad celular** realizado con el AlamarBlue, no sólo permitió evaluar el número de células viables en el andamiaje de fibrina, sino también el estado proliferativo de estas matrices a lo largo del estudio. A los 3 días, el número de células viables incrementó ligeramente, tanto en los andamiajes de fibrina con células (FC), como en los andamiajes de fibrina con células y factores (FCF), a los 7 días la población aumentó en 10 veces para ambos grupos, sin embargo a los 14 días existieron diferencias significativas entre grupos (FC: $1.400.425 \pm 86.235 \cdot 66$; FCF: $1.629.392 \pm 69.116 \cdot 62$; $p=2 \cdot 737 \times 10^{-7}$). A los 21 días se alcanzó el máximo número celular que el andamiaje fue capaz de albergar y finalmente a los 28 días disminuyó el número celular (Figura 37).

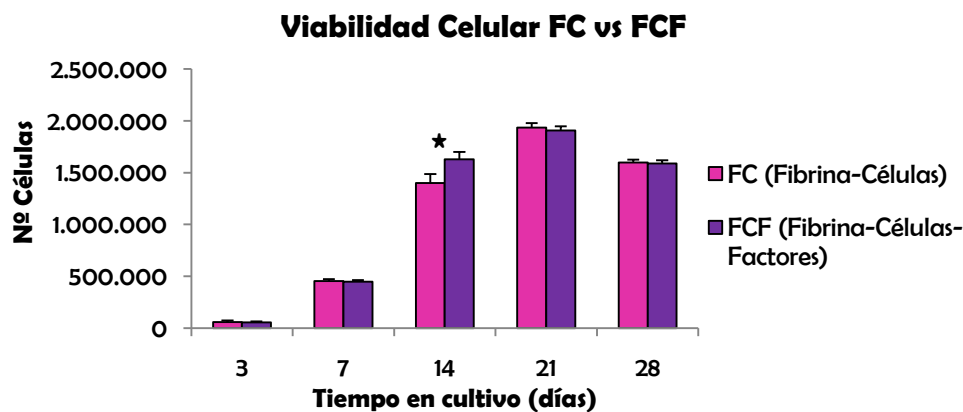


Figura 37. Viabilidad celular en los andamiajes de fibrina FC y FCF. Se representa el número de células frente al tiempo en cultivo (días) (n=12). (* $p < 0 \cdot 05$). Publicado en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

Además, de manera indirecta se valoró que ninguno de los componentes utilizados en la elaboración de los andamiajes de fibrina era tóxico para las células, ya que el número de células viables obtenido en los andamiajes de fibrina (Figura 37) era el mismo ($p > 0 \cdot 05$) que en los ensayos de proliferación celular (número de células totales) (Figura 30), para los diferentes días de estudio.

4. 3. d. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Las tinciones con **H&E** (Figura 38) permitieron evaluar el **incremento proliferativo que se produce cuanto mayor es el tiempo en cultivo *in vitro***. A los 7 días se visualizaron pocas células, sin embargo, a 14 días se produjo un aumento muy importante en el número celular, siguiendo a los 21 días un aumento celular ya menos marcado. Por último a los 28 días, no se apreció aumento sino mantenimiento del número celular.

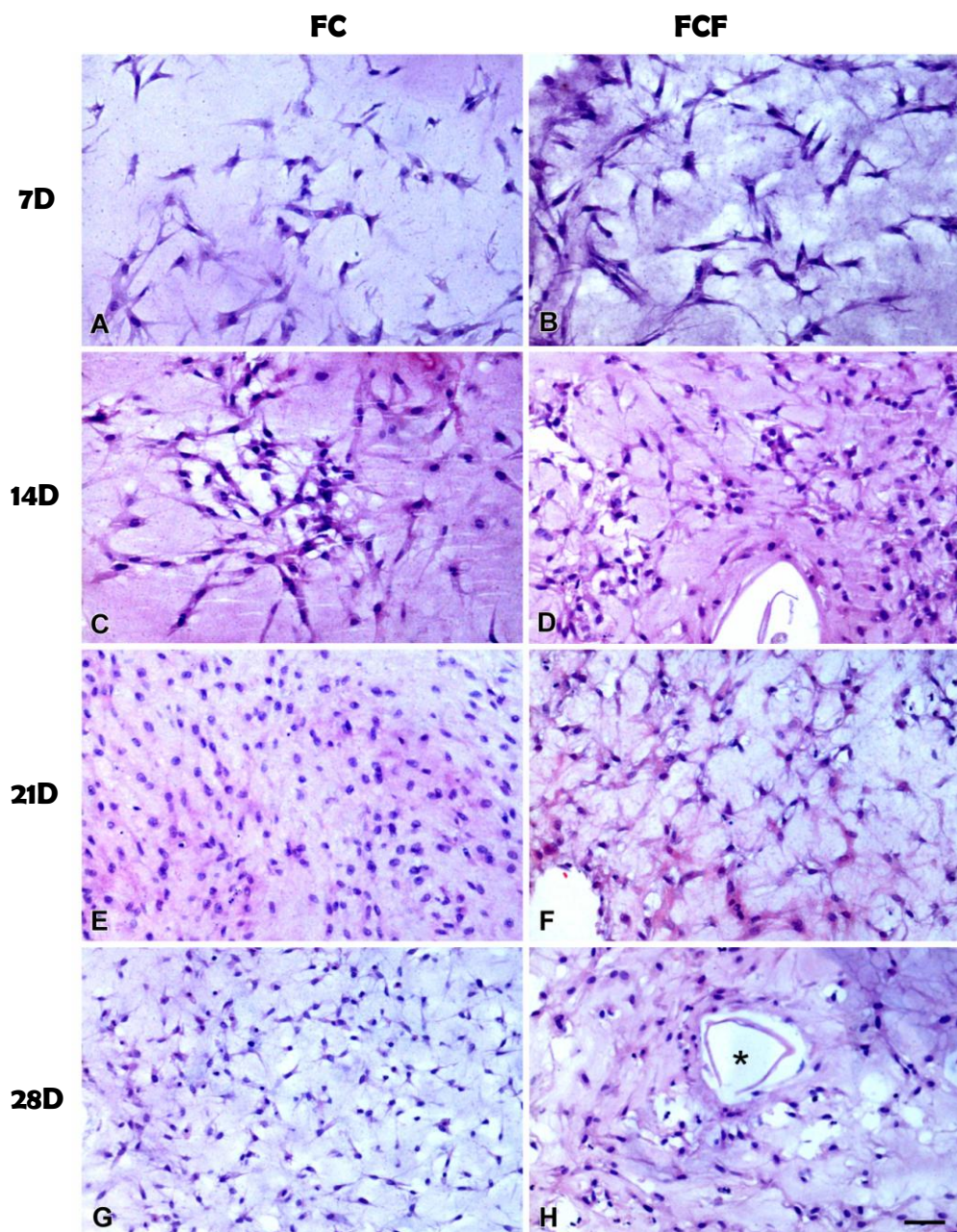


Figura 38. H&E en los andamiajes de fibrina con células (FC) (A-C-E-G) y andamiajes de fibrina con células y factores (FCF) (B-D-F-H), tras 7 (A-B), 14 (C-D), 21 (E-F) y 28 (G-H) días en cultivo. Nótese la morfología de las microcápsulas de alginato y su integración en el andamiaje de fibrina (*). Barra de escala = 50µm. Imágenes A, D, F y H publicadas en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

La **distribución celular** en el interior del andamiaje fue **homogénea** a los diferentes tiempos de incubación y se pudo evaluar la **integración de las microcápsulas en el andamiaje de fibrina** (Figura 38. D y H). Sin embargo, no resultó sencillo visualizar diferencias a través de esta técnica entre los FC y los FCF.

Gracias a la tinción **Tricómico de Masson**, se detectó la **producción de fibras colágenas**, observándose una evidente **mayor presencia en los andamiajes FC que en los FCF**, tras 14 días en cultivo (Figura 39).

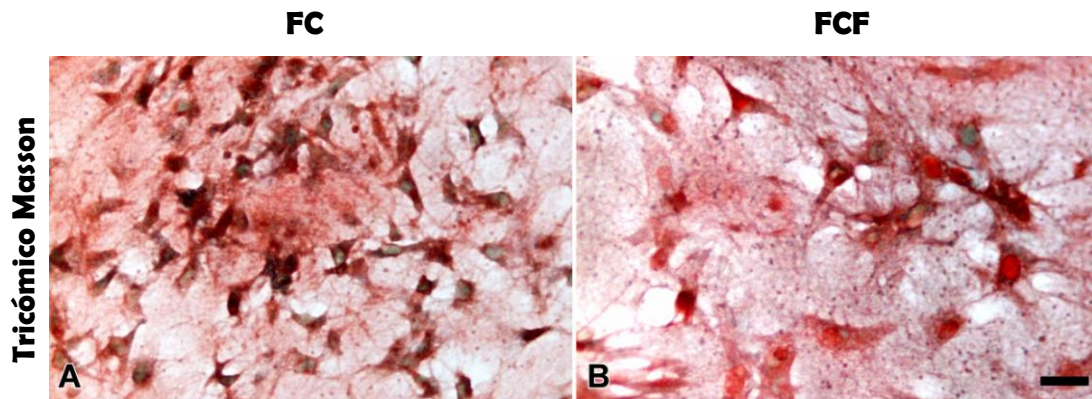


Figura 39. Tricómico de Masson en los andamiajes de fibrina con células (FC) (A) y andamiajes de fibrina con células y factores (FCF) (B), tras 14 días en cultivo. Barra de escala = 25 μ m. Publicado en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

No obstante, con la **tinción de Orceína para fibras elásticas**, no se **observaron diferencias** tras 14 días en cultivo entre los andamiajes FC y FCF (Figura 40).

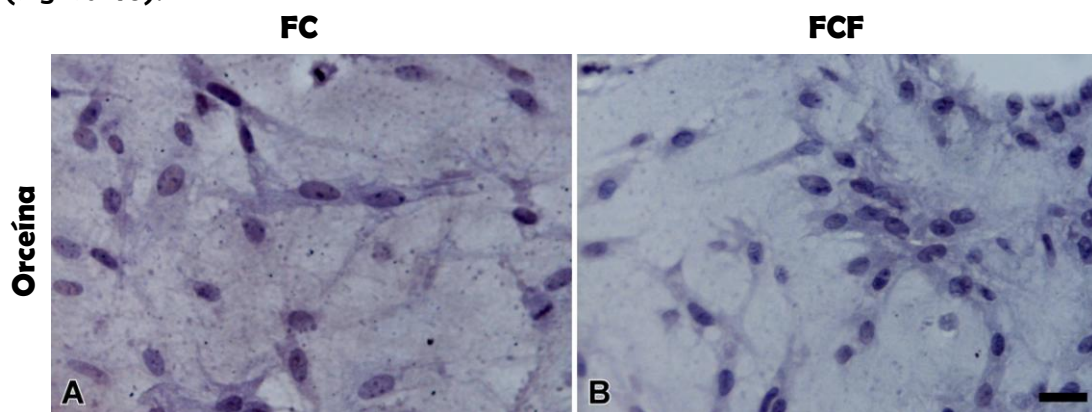


Figura 40. Tinción Orceína en los andamiajes de fibrina con células (FC) (A) y andamiajes de fibrina con células y factores (FCF) (B), tras 14 días en cultivo. Barra de escala = 25 μ m.

La tinción inmunohistoquímica para la **fibronectina**, evidenció que la matriz es rica en fibronectina, pero no se evaluaron diferencias entre los andamiajes FC y FCF (Figura 41. A y B). Sin embargo, las técnicas inmunohistoquímicas realizadas frente a la actina y el Ki-67, si mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Se observó un **importante descenso de la expresión de actina en los andamiajes FCF** en comparación con los FC (Figura 41. C y D), junto con la existencia de una clara diferencia en el estado proliferativo de las células, debido a que **el número de células activas fue más marcado en los andamiajes FCF** que en los FC (Figura 41. E y F), todo ello evaluado tras 14 días en cultivo.

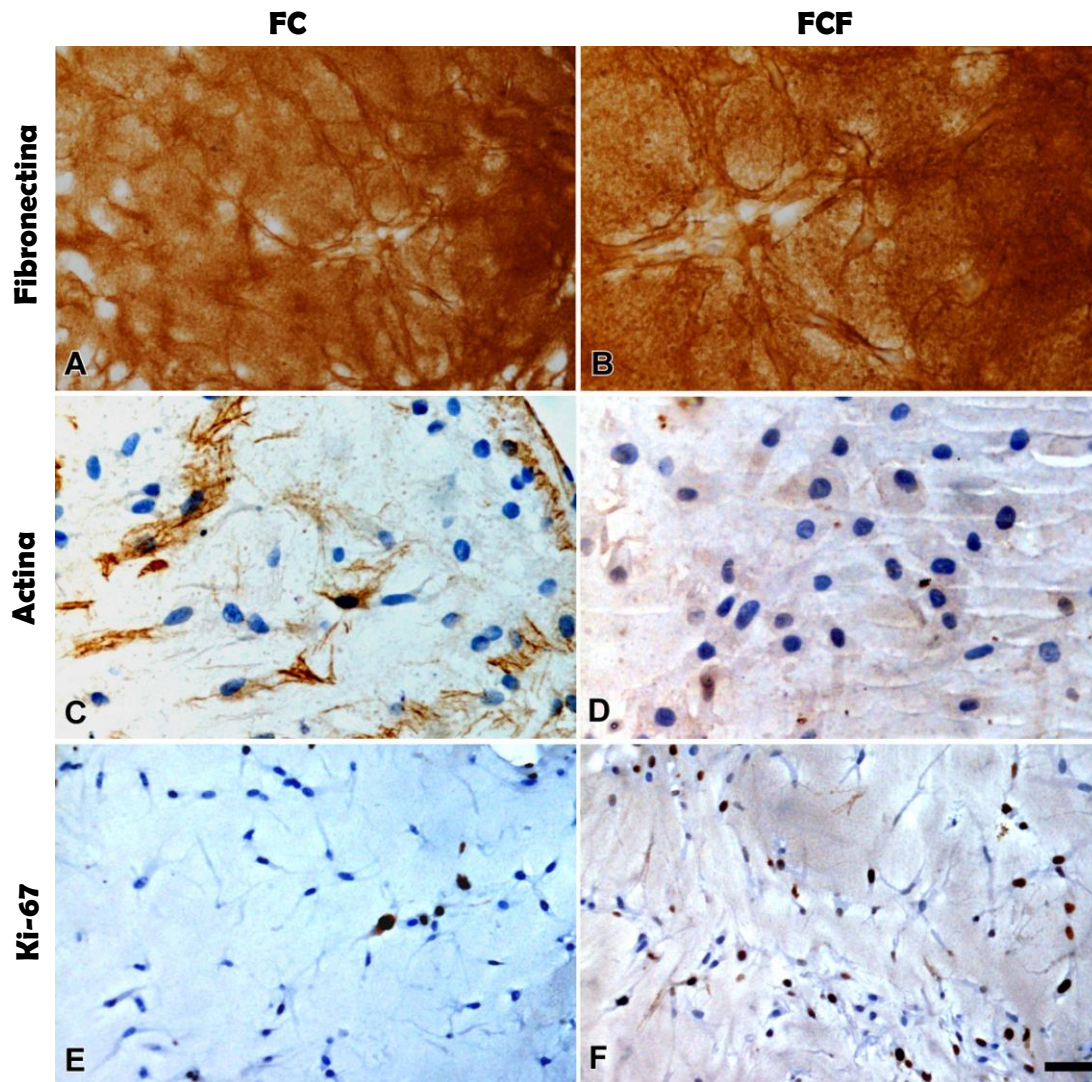


Figura 41. Inmunohistoquímica de fibronectina (A-B), actina (C-D) y Ki-67 (E-F) en los andamiajes de fibrina con células (FC) (A-C-E) y andamiajes de fibrina con células y factores (FCF) (B-D-F), tras 14 días en cultivo. Barra de escala = 25 μ m (A-D) y 50 μ m (E-F). Imágenes C a F publicadas en J Biomed Mater Res A 2011; 99: 648-54.

Por tanto, gracias a las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas se puso de manifiesto **diferencias entre los andamiajes de estudio con células (FC) y con células y factores (FCF)**, lo cual se relacionó con el efecto *in vitro* del bFGF microencapsulado.

4. 4. Caracterización celular

Los estudios de caracterización celular fueron óptimos, tanto en los ensayos de citometría de flujo, como en las técnicas de diferenciación celular en superficies plásticas y en andamiajes de fibrina, sin embargo, la diferenciación condrogénica en pellets resultó ser un método no reproducible.

4. 4. a. Citometría de flujo

Las células de dermis porcinas, fueron caracterizadas por citometría de flujo a través de la expresión de marcadores de superficie. A través del software de análisis se localizó en primer lugar que la **población celular aislada fue homogénea**, en el gráfico que representa Tamaño frente a Complejidad (Figura 42) se analizó que la población celular de estudio presentó siempre un tamaño constante (aproximadamente 10 μm) y cuya complejidad celular fue similar (células individualizadas con un único núcleo). Las células que cumplieron dichos requisitos (Región R1 de la Figura 42) fueron estudiadas en función de la expresión de ciertos marcadores de superficie específicos.

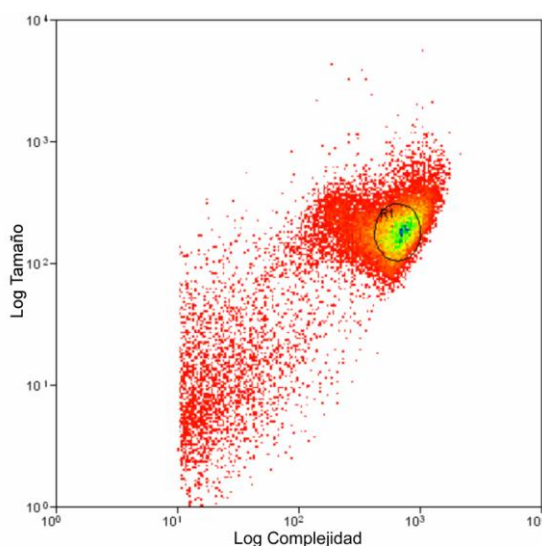


Figura 42. Población celular de estudio por citometría de flujo. Se representa el logaritmo del tamaño celular frente al logaritmo de la complejidad celular. Observándose una región R1 donde existió un gran número de células homogéneas según dichos criterios, que posteriormente fueron analizadas para los marcadores de superficie de estudio.

Más del 95% de la población celular aislada expresó marcadores característicos de los linajes mesenquimales, como el **CD90** (Tirosina-1) o el **CD29** (Integrina $\beta 1$), pero **no expresaron** (expresión menor del 2%) marcadores de superficie específicos de células del linaje hematopoyético, como el **CD45 y el CD14**, o marcadores de células endoteliales, como el **CD31** (Figura 43 y Tabla 20). La población de células de dermis porcinas aisladas, se consideró desde este momento como **células madre mesenquimales de cerdo**.

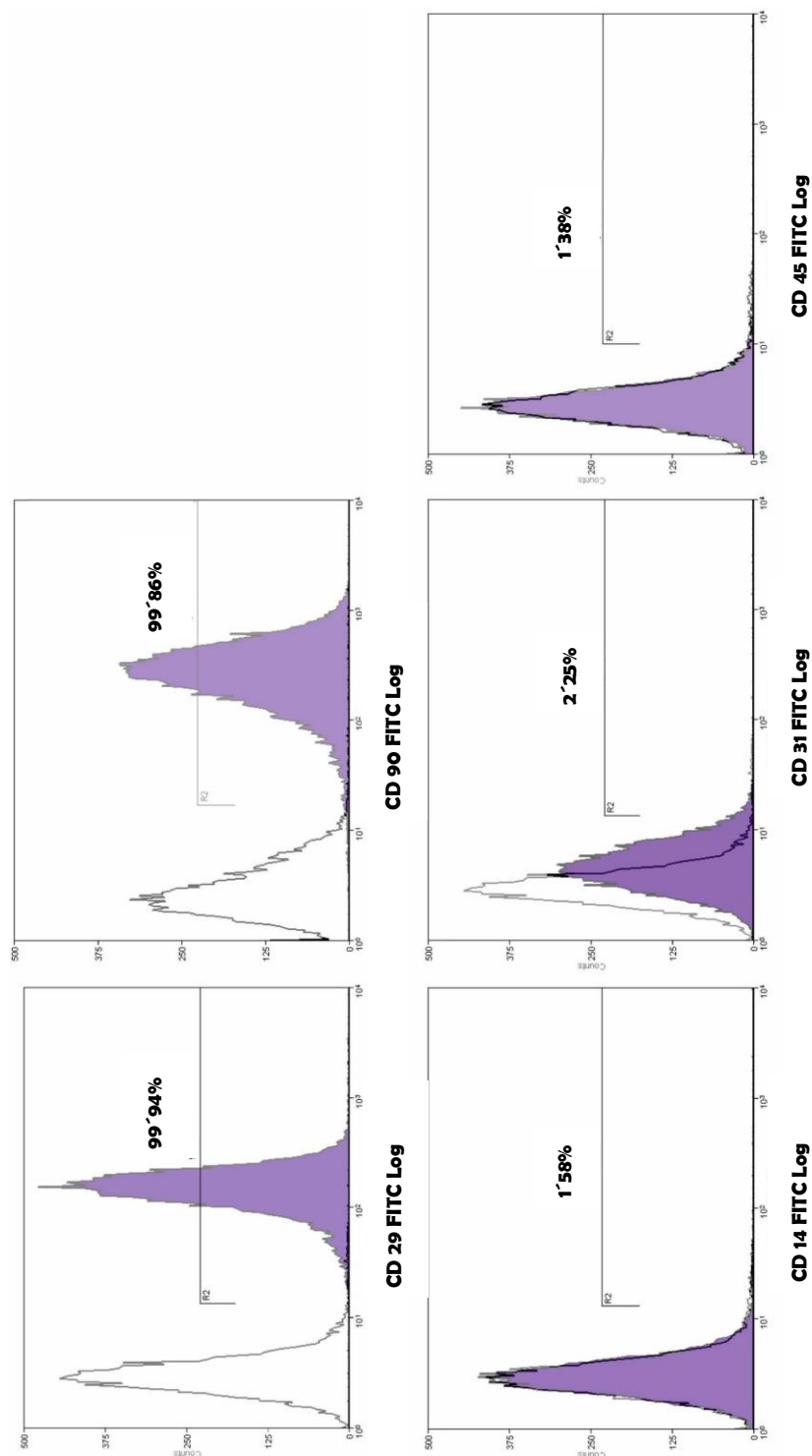


Figura 43. Citometría de flujo de los marcadores de superficie CD14, CD29, CD31, CD45 y CD90. Las células fueron positivas para CD29 y CD90, sin embargo fueron negativas para CD14, CD31 y CD45. Se representa el número de células frente al marcaje del anticuerpo primario específico/isotipo unido a un anticuerpo secundario con FITC. Las curvas moradas representan la distribución de las células incubadas con el anticuerpo primario y las líneas negras las células incubadas con el isotipo control.

Expresión de los marcadores de superficie		
Marcador	Media	SD
CD14	1´58	0´52
CD29	99´94	0´04
CD31	2´25	0´16
CD45	1´38	0´43
CD90	99´86	0´11

Tabla 20. Expresión de los marcadores de superficie en la población celular aislada medidos por citometría de flujo (n=5).

4. 4. b. Diferenciación hacia linajes mesenquimales en superficies plásticas

La tinción Oil-Red-O, confirmó la **presencia de vacuolas lipídicas intracelulares** de color rojo en las células que sufrieron diferenciación adipogénica tras 14 días en cultivo en monocapa (Monocapa de Diferenciación Adipogénica, MDA), junto con un evidente cambio de morfología hacia adipocitos (células poligonales con el núcleo desplazado a la periferia por la presencia de múltiples vacuolas lipídicas intracelulares). No obstante, en las células control no existió ni cambio en la morfología, ni presencia de vacuolas lipídicas (Monocapa de Diferenciación Adipogénica Control, MDAC) (Figura 44).

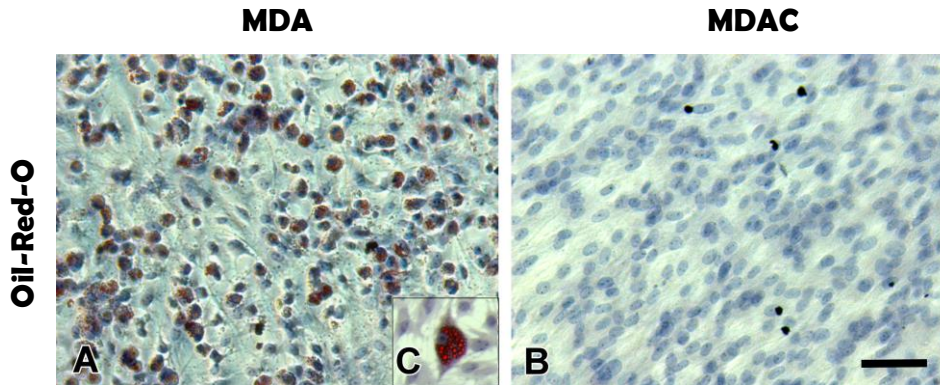


Figura 44. Tinción Oil-Red-O de células crecidas en monocapa cultivadas durante 14 días en medio de diferenciación adipogénico (MDA) (A) o mantenidas en medio de cultivo completo (MDAC) (B), con detalle de la morfología de una adipocito (C). Barra de escala = 50 μ m.

La tinción Rojo Alizarina, mostró la **presencia de depósitos de calcio** de color rojo con una **evidente mineralización de la matriz** en las células que sufrieron diferenciación osteogénica tras 14 días en cultivo en monocapa (Monocapa de Diferenciación Osteogénica, MDO), sin embargo, en las células control no existieron rasgos de dicha mineralización (Monocapa de Diferenciación Osteogénica Control, MDOC) (Figura 45).

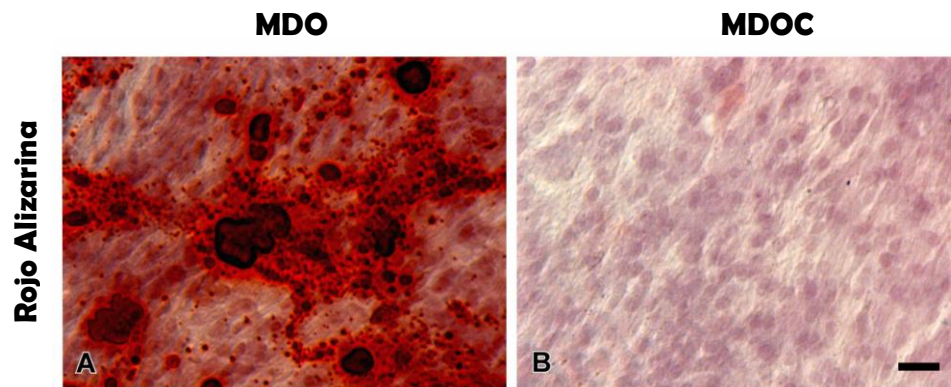


Figura 45. Tinción Rojo Alizarina de células crecidas en monocapa cultivadas durante 14 días en medio de diferenciación osteogénico (MDO) (A) o mantenidas en medio de cultivo completo (MDOC) (B). Barra de escala = 50 μ m.

4. 4. c. Diferenciación hacia linajes mesenquimales en andamios de fibrina

Los andamios de fibrina sometidos a **diferenciación adipogénica** (Fibrina Diferenciación Adipogénica, FDA) mostraron la **presencia de vacuolas lipídicas intracelulares** (Tinción Oil-Red-O), y un evidente **cambio de morfología** (H&E), como ya ocurría con las células crecidas en monocapa. Sin embargo, las células control no experimentaron ninguno de dichos cambios, manteniéndose una morfología celular típicamente fibroblástica (Fibrina Diferenciación Adipogénica Control, FDAC) (Figura 46).

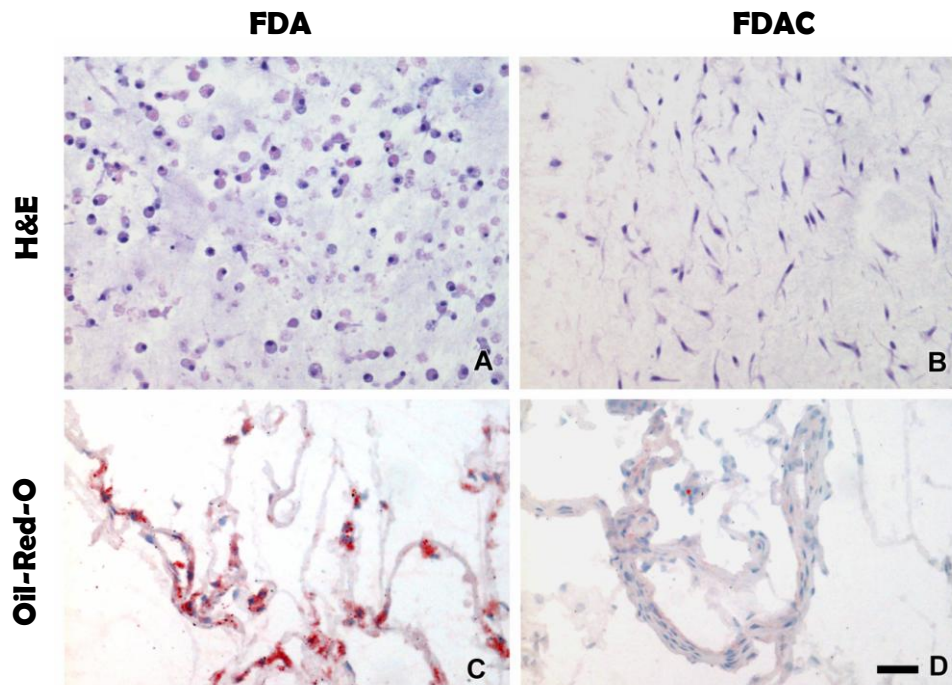


Figura 46. Andamios de fibrina cultivados durante 28 días con medios de diferenciación adipogénico (FDA) (A-C) o medio de cultivo completo (FDAC) (B-D), teñidos con H&E (A-B) y Tinción Oil-Red-O (C-D). Barra de escala = 50 μ m.

La **diferenciación osteogénica** en andamiajes de fibrina fue demostrada debido a la existencia de una textura granulada de la matriz como signo de mineralización (H&E), acompañado de la presencia de depósitos de calcio rojos como rasgo característico de la **osificación de la matriz** (Rojo Alizarina) encontrados en los andamiajes cultivados con medio específico de diferenciación (Fibrina Diferenciación Osteogénica, FDO), no obstante, los andamiajes control (Fibrina Diferenciación Osteogénica Control, FDOC) no mostraron ningún signo de mineralización característico de células osteoblásticas (Figura 47). La tinción Von-Kossa no resultó discriminativa (no se muestran los resultados).

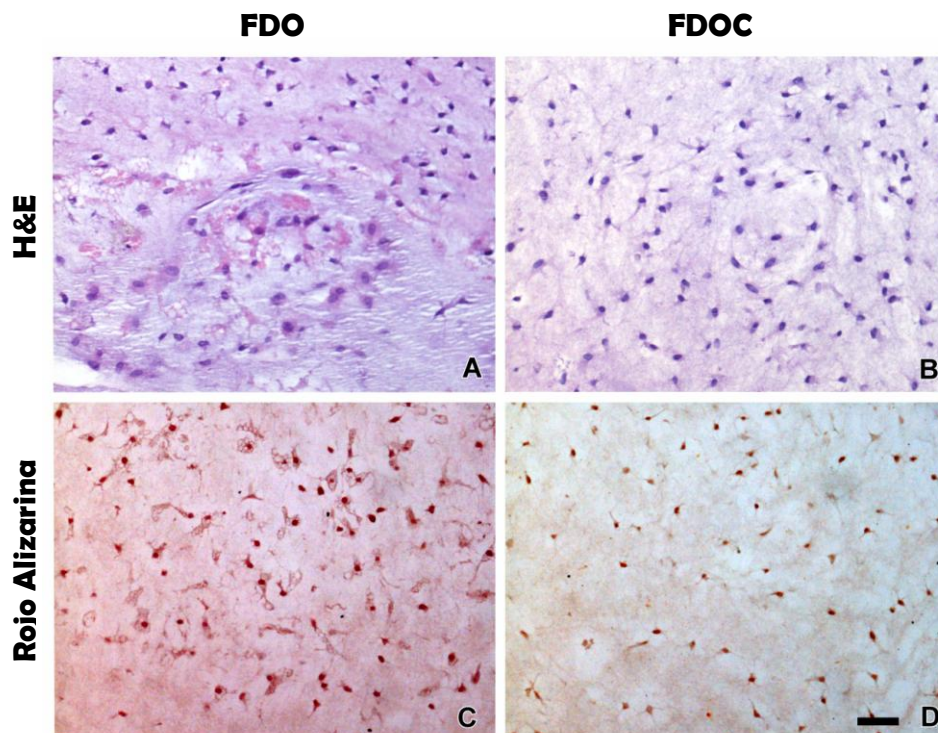


Figura 47. Andamiajes de fibrina cultivados durante 28 días con medios de diferenciación osteogénico (FDO) (A-C) o medio de cultivo completo (FDOC) (B-D), teñidos con H&E (A-B) y Tinción Rojo Alizarina (C-D). Barra de escala = 50 μ m.

Las técnicas inmunohistoquímicas, fueron definitivas en la demostración de la existencia de marcadores osteogénicos, existiendo una clara **expresión de osteopontina** (glicoproteína característica del tejido óseo), acompañada de una distribución más focal en la **osteocalcina**, las cuales fueron observadas en los andamiajes FDO y no en los FDOC (Figura 48).

La **diferenciación condrogénica**, fue puesta de manifiesto con **H&E** en los andamiajes de fibrina (Fibrina Diferenciación Condrogénica, FDC), a través del cambio en morfología que experimentaron los condrocitos, **células redondeadas que desplazan el núcleo debido a la síntesis de gran cantidad de sustancias mucopolisacáridas, y que se localizan en lagunas celulares** (Figura 49. A), cambios no existentes en los controles (Fibrina Diferenciación Condrogénica Control, FDCC) (Figura 49. B).

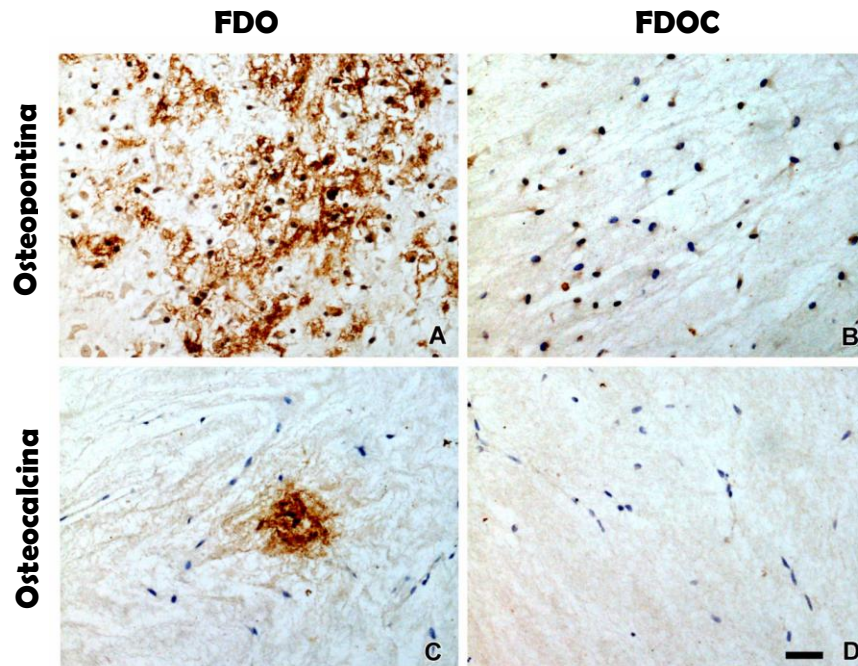


Figura 48. Inmunohistoquímica de Osteopontina (A-B) y Osteocalcina (C-D) en andamiajes de fibrina cultivados durante 28 días con medios de diferenciación osteogénico (FDO) (A-C) o medio de cultivo completo (FDOC) (B-D). Barra de escala = 50 μ m.

La tinción con **Azul Alcían** reveló la **producción de mucosustancias en las lagunas celulares** formadas en las células diferenciadas (FDC) (Figura 49. C), sin embargo, en los andamiajes control (FDCC), dichos cambios no se produjeron (Figura 49. D).

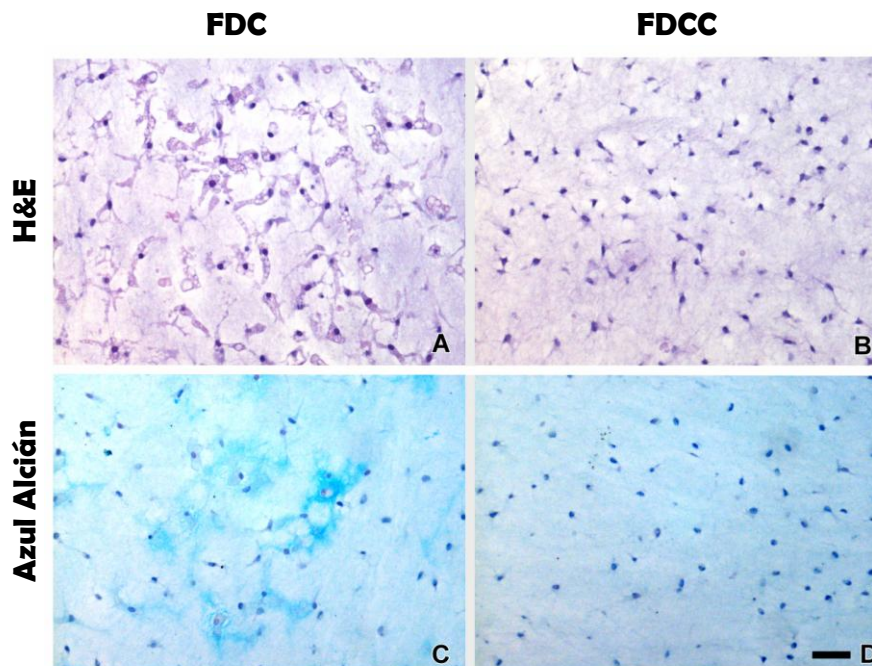


Figura 49. Andamiajes de fibrina cultivados durante 35 días con medios de diferenciación condrogénico (FDC) (A-C) o medio de cultivo completo (FDCC) (B-D), teñidos con H&E (A-B) y Tinción Azul Alcían (C-D). Barra de escala = 50 μ m (A-B) y 25 μ m (C-D).

Al mismo tiempo, los andamiajes de fibrina FDC expresaron una **evidente producción de fibras de colágeno tipo II**, características de la matriz de las células de naturaleza condroblástica, inexistentes en los andamiajes control FDCC (Figura 50).

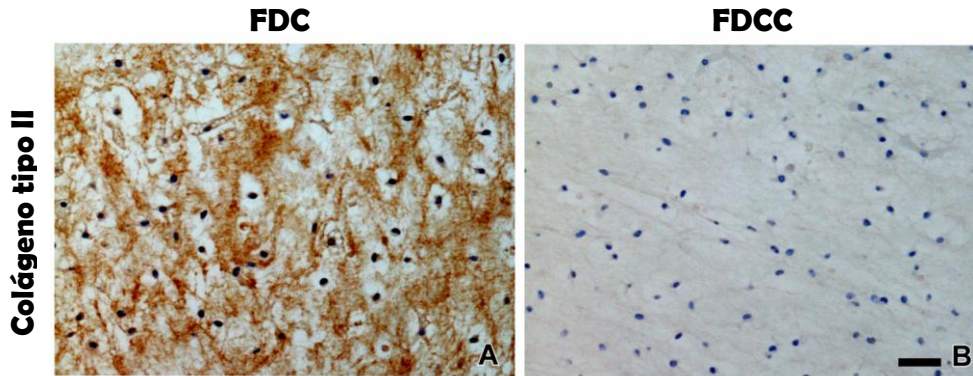


Figura 50. Inmunohistoquímica de Colágeno tipo II en andamiajes de fibrina cultivados en medio de diferenciación condrogénico (FDC) (A) o mantenidas en medio de cultivo completo (FDCC) (B) durante 35 días. Barra de escala = 25µm.

4. 4. d. Diferenciación condrogénica en pellet

El cultivo tridimensional en pellet, fue un **método poco reproducible**, difícil de manejar y en el cual las células presentaron **focos de necrosis celular** (Figura 51). El manejo de los pellets fue complicado, tanto para los cambios de medio, en los cuales con frecuencia, alguna pequeña porción de pellet era aspirada, como para su procesamiento y corte para la realización de las tinciones específicas. Aun así, fue posible poner de manifiesto la existencia de zonas con diferenciación condrogénica (Pellets Diferenciación Condrogénica, PDC), que no existían en los pellets control (Pellets Diferenciación Condrogénica Control, PDCC).

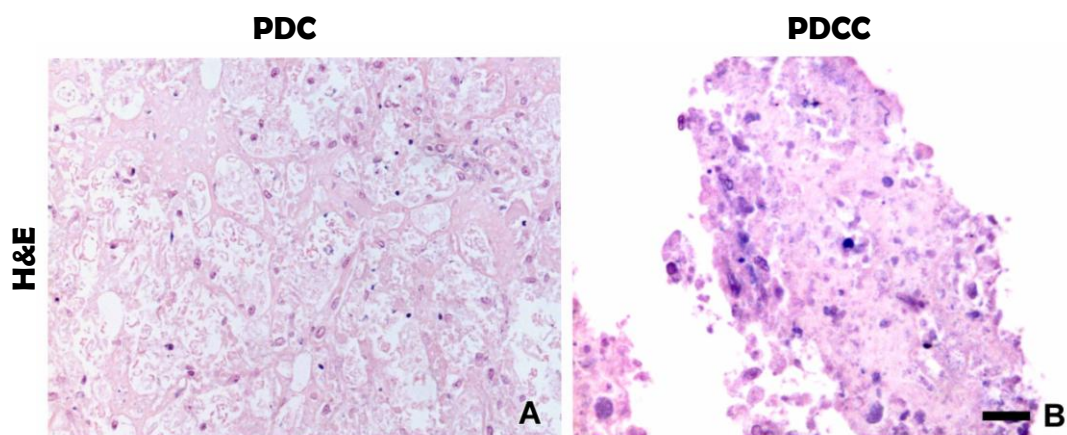


Figura 51. H&E de pellets de diferenciación condrogénica cultivados en medio de diferenciación condrogénico (PDC) (A) o mantenidas en medio de cultivo completo (PDCC) (B) durante 21 días. Nótese la existencia de zonas con necrosis celular (Núcleos picnóticos). Barra de escala = 50 µm (A) y 25 µm (B).

4. 5. Modelo animal porcino

Los 35 cerdos del estudio fueron operados correctamente, a cada animal, en función del grupo de estudio, se le implantó la matriz simple (MS) o el injerto tisular completo (ITC) autólogo elaborado con sus células y su propio plasma, o simplemente se suturó el borde bronquial en el grupo control (C). Los grupos MS e ITC, fueron cubiertos por una matriz de alginato rígida para prevenir la posible pérdida del constructo implantado (Figura 52).

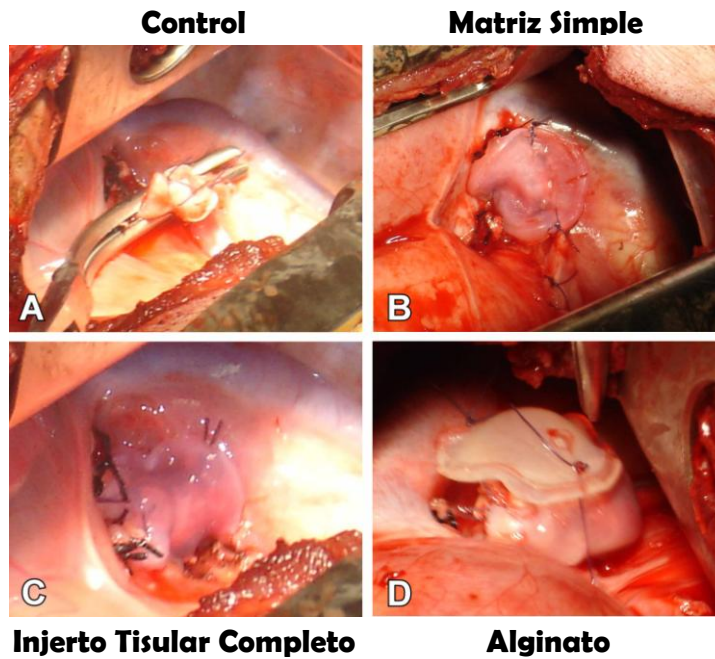


Figura 52. Grupos de implante: Control (A) el cual es simplemente suturado; Matriz Simple (B) andamiaje de fibrina cubriendo el borde bronquial; Injerto Tisular Completo (C) andamiaje de fibrina con células y factores de crecimiento cubriendo el borde bronquial; matriz de alginato rígida que recubre los grupos MS e ITC (D).

4. 5. a. Grupos de estudio de implante

La relación de los animales pertenecientes a cada grupo y subgrupos de estudio fue la siguiente (Tabla 21):

Grupos y subgrupos de estudio					
	3D	7D	14D	21D	28D
Control	C3	C1	C4	C2	C5
Matriz Simple	MS3 MS6	MS4 MS10	MS1 MS7	MS2 MS9	MS5 MS8
Injerto Tisular Completo	ITC3 ITC9 ITC11 ITC12	ITC1 ITC7 ITC13 ITC19	ITC2 ITC6 ITC18 ITC20	ITC4 ITC8 ITC16 ITC17	ITC5 ITC10 ITC14 ITC15

Tabla 21. Distribución de los 35 cerdos operados en función del grupo de implante control-matriz simple-injerto tisular completo; y del subgrupo al que pertenezcan determinado por el momento de la eutanasia post-operación 3, 7, 14, 21 y 28 días.

4. 5. b. Complicaciones postoperatorias

El 100% de las operaciones, se llevó a cabo con éxito en los diferentes grupos de estudio, aun así existieron diversas **complicaciones postoperatorias** que se enumeran en la Tabla 22.

Complicaciones postoperatorias				
Grupo de estudio	Complicaciones Postoperatorias			
	Pericarditis	Exudado Purulento	Enfisema Subcutáneo	Obstrucción Intestinal
Control (n=5)	1	-	-	-
Matriz Simple (n=10)	4	2	1	-
Injerto Tisular Completo (n=20)	1	1	1	1

Tabla 22. Complicaciones postoperatorias de los diferentes grupos de implante del modelo animal.

Un único caso falleció de forma repentina y prematura tras las 48h de la intervención quirúrgica, por obstrucción intestinal de causa desconocida (Figura 53. A).

En algunos casos de los grupos de implante de matriz simple e injerto tisular completo, aparecieron zonas peribronquiales de **exudado purulento** y en dos casos **enfisema subcutáneo, que es frecuente en las neumonectomías** (Figuras 53. B y C).

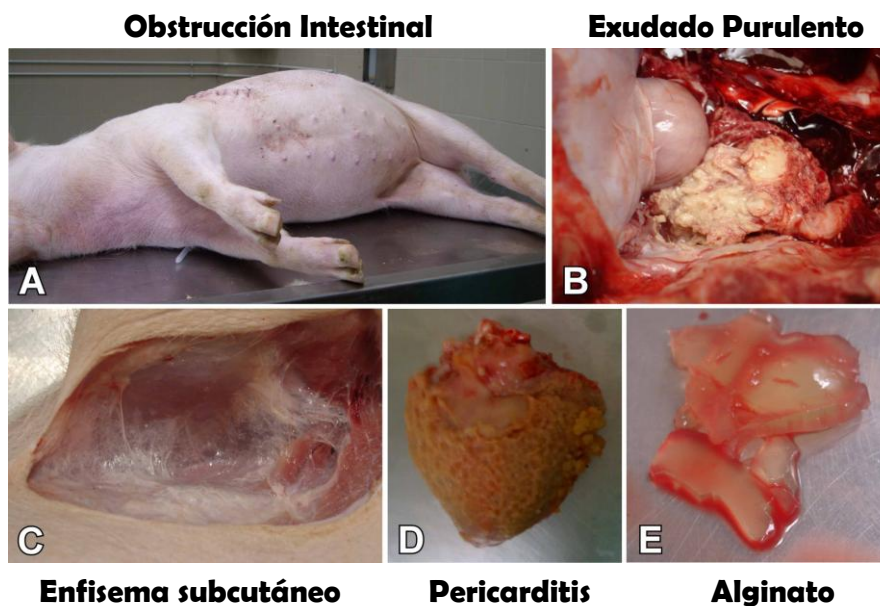


Figura 53. Complicaciones postoperatorias: Obstrucción intestinal (A); Exudado purulento (B); Enfisema subcutáneo (C); Pericarditis (D); Matriz de alginato desgarrada.

En todos los grupos de estudio existieron algunos casos de **pericarditis** (Figura 53. D), subclínica, solamente detectadas en la necropsia. La pericarditis es frecuente como hallazgo casual después de una neumectomía. Además, cabe destacar que en algunos de los animales de los grupos de implante (MS e ITC) se encontró la matriz de alginato suelta y desgarrada (Figura 53. E).

Hemos considerado que no existe ninguna relación entre las complicaciones y los objetivos de esta investigación y se ha procedido a valorar la totalidad de las intervenciones.

Las complicaciones observadas se representan en la Figura 54, analizándose un total de 35 intervenciones, se apreció que 2 de cada 3 animales (66%) no presentaron ningún tipo de complicación postoperatoria.

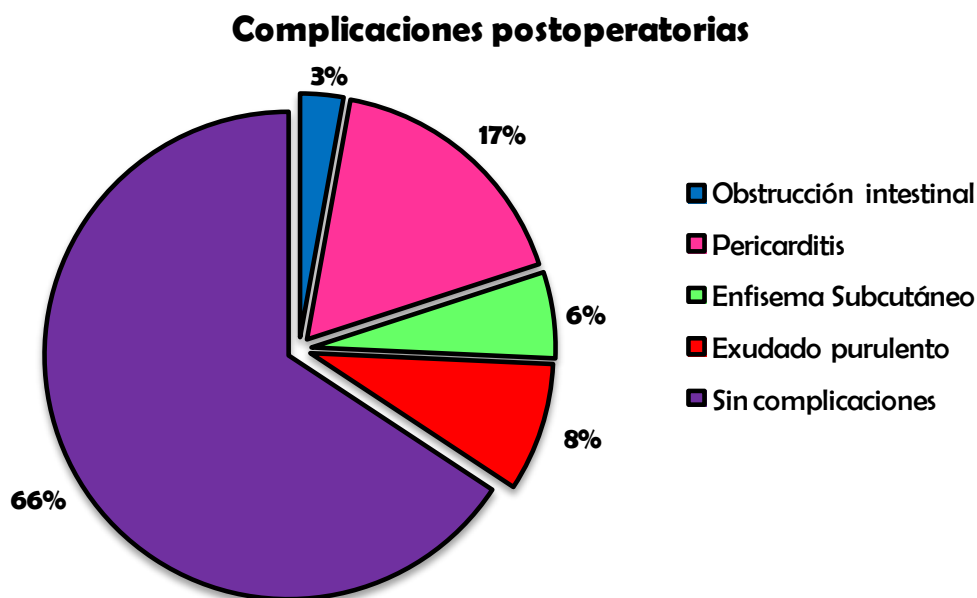


Figura 54. Representación del porcentaje de incidencia de las complicaciones postoperatorias del modelo animal. (n=35).

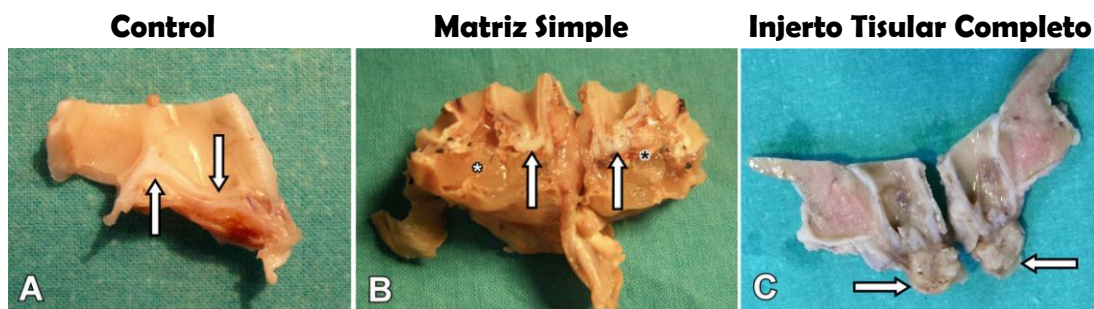
4. 6. Evaluación *in vivo* del implante

La evaluación del implante en el modelo animal, se centró en el estudio de los resultados macro y microscópicos de los muñones bronquiales de los 3 grupos de implante, se comparó la evolución tras 1 mes de estudio dentro de cada grupo y se compararon dichos resultados con los obtenidos en los demás grupos.

4. 6. a. Estudio morfológico de los muñones bronquiales

En ningún grupo de implante existió presencia de fístula broncopleurales postneumectomía, aun así, se evidenciaron diferencias macroscópicas entre los diferentes grupos (Figura 55).

En el grupo Control (C), los muñones bronquiales mostraron una pared fina y con escasa reacción inflamatoria, con una línea de sutura bronquial delgada (Figura 55. A). En el grupo experimental de Matriz Simple (MS), la pared bronquial presentó un abundante material de aspecto gelatinoso y edematoso, correspondiente a la matriz implantada que se incorporó en el muñón bronquial (Figura 55. B). Finalmente, en el grupo del **Injerto Tisular Completo (ITC)**, se evidenció una pared bronquial gruesa con intensa granulación en la línea de sutura y con un **grado de cicatrización muy elevado** (Figura 55. C).



4. 6. b. Estudio de la reacción inflamatoria

Histológicamente, los muñones bronquiales de los tres grupos de estudio presentaron un aspecto diferente según el tipo de implante y el tiempo transcurrido desde la resección pulmonar.

En el **grupo control (C)** se observó que, al **tercer día** postoperatorio existió reacción inflamatoria de tipo celular sobre la fina pared bronquial existente (Figura 56. A); cuatro días después (**día 7** postoperatorio) la reacción inflamatoria aumentó, siendo más crónica y menos celular, apreciándose una leve proliferación fibroblástica (Figura 56. B). A los **14 días** de la cirugía, la pared bronquial apareció sustancialmente engrosada debido al aumento de fibroblastos y fibras colágenas (Figura 56. C). Finalmente, en las dos últimas semanas de estudio (**días 21 y 28** postoperatorios), se apreció una cicatriz que se consolidaba progresivamente en el muñón bronquial, debido al aumento de colágeno principalmente (Figuras 56. D y E). En cuanto a la proliferación vascular fue prácticamente nula en todos los días de estudio.

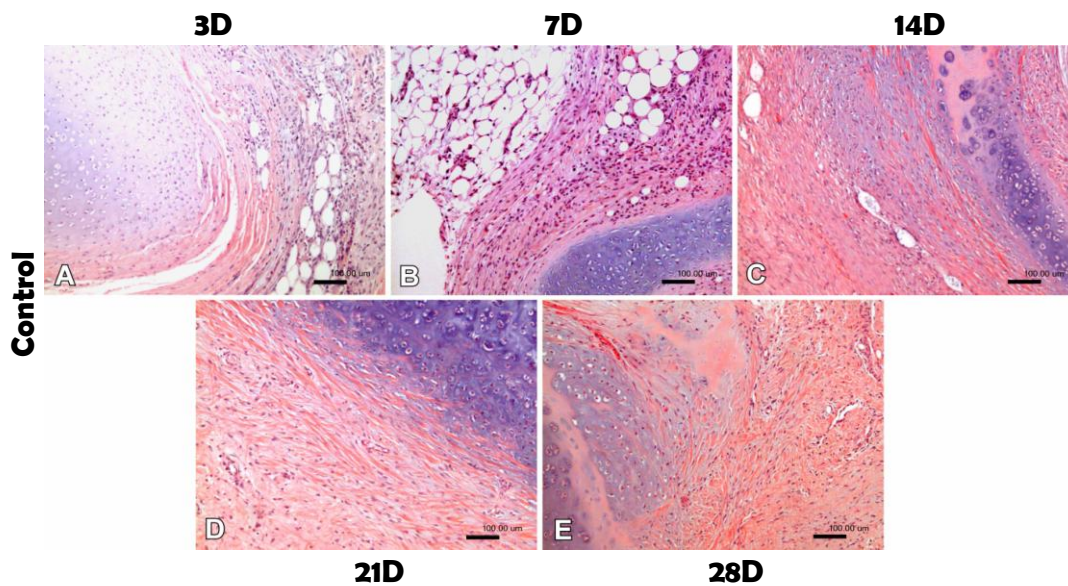


Figura 56: H&E de los muñones bronquiales del grupo control (C) de implante tras 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) y 28 (E) días de la cirugía.

En el grupo de **Matriz Simple (MS)**, se apreció una evolución similar al grupo control, en el **tercer día** postoperatorio, se observó una reacción inflamatoria aguda en la zona que recubre la pared bronquial (Figura 57. A), al **día 7** postoperatorio, se puso de manifiesto una llamativa proliferación fibroblástica (Figura 57. B), que a los **14 días** se vio disminuida, presentando mayor componente colágeno en una cicatriz incipiente (Figura 57. C). Finalmente a los **21 y 28 días** postcirugía, se evidenció una cicatriz que se consolida progresivamente, con un aumento de la cantidad de fibras colágenas cada vez más marcado (Figura 57. D y E). En cuanto a la proliferación vascular fue baja, se apreciaron algunos vasos en las últimas semanas postoperatorias, aunque en número bastante escaso.

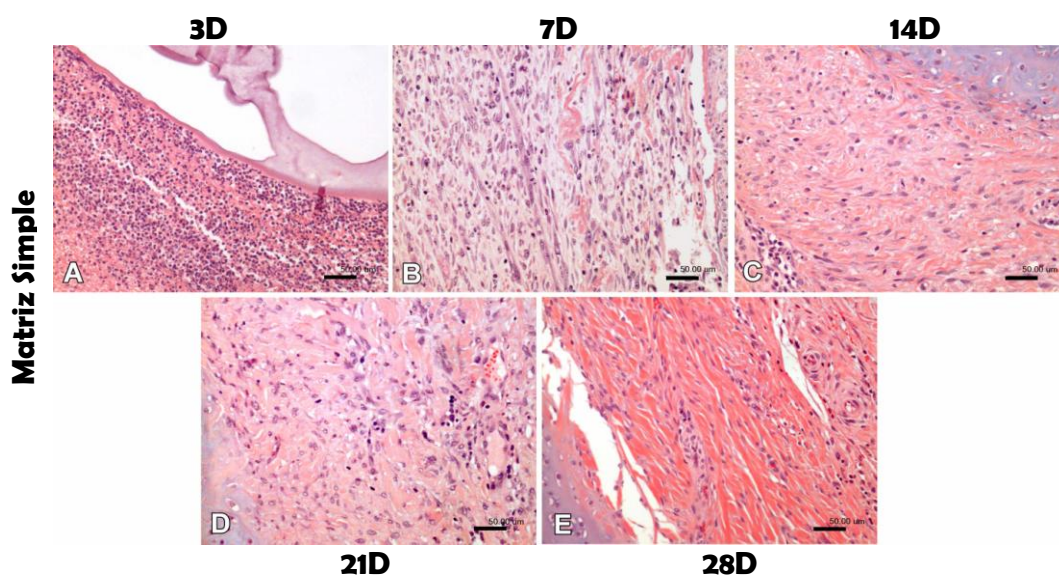


Figura 57: H&E de los muñones bronquiales del grupo matriz simple (MS) tras 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) y 28 (E) días de la cirugía.

En el último grupo de estudio donde se implantó el **injerto tisular completo (ITC)**, se puso de manifiesto al **tercer día** postoperatorio, una intensa reacción inflamatoria aguda alrededor de las microcápsulas de alginato (Figura 58. A), junto con rasgos de hemorragia y necrosis en la mucosa de la pared bronquial (Figura 58. B). En el **día 7** postoperatorio, se detectó un evidente engrosamiento de la pared bronquial, con una muy marcada proliferación fibroblástica que englobó las microcápsulas (Figura 59. A) y el cartílago bronquial (Figura 59. B), con algunos capilares dispersos entre los fibroblastos (Figura 59. C y D).

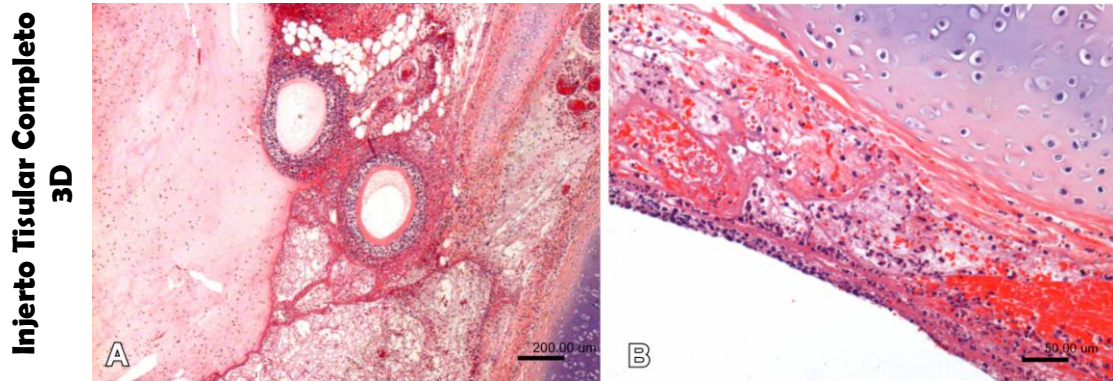


Figura 58: H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo (ITC) tras 3 días de la cirugía. Panorámica (A), detalle de la pared bronquial (B).

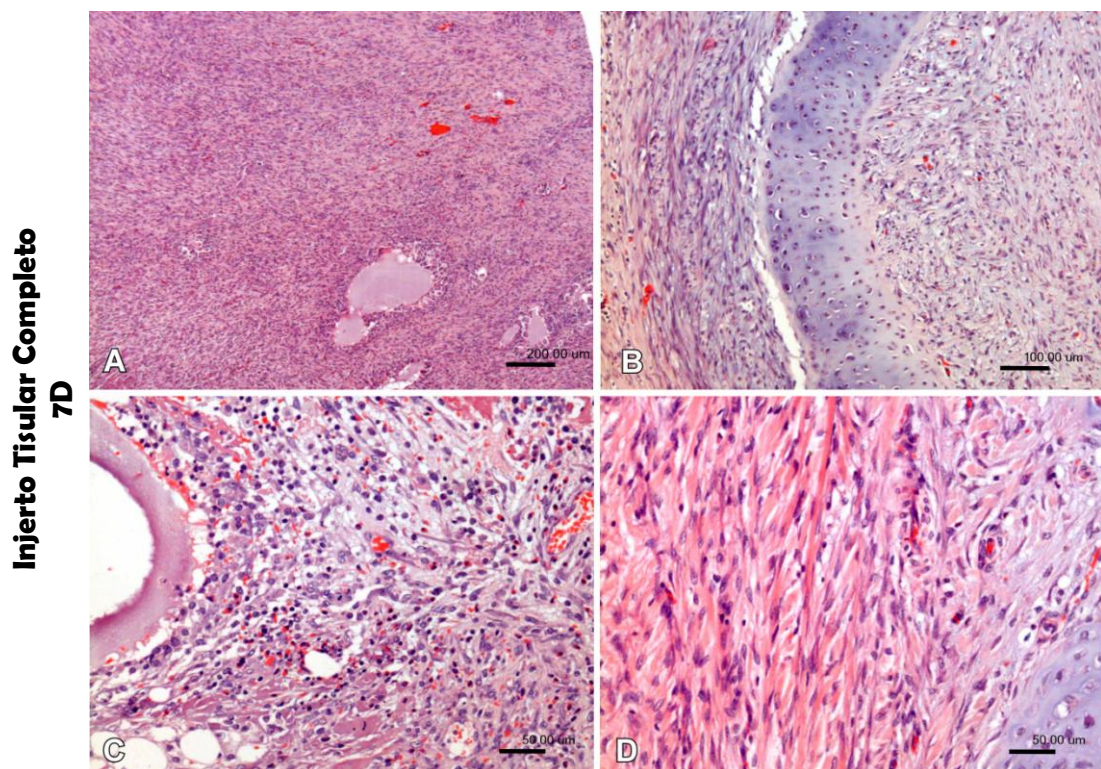


Figura 59: H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo (ITC) tras 7 días de la cirugía. Proliferación fibroblástica alrededor de las microcápsulas (A) y del cartílago bronquial (B), con detalle de zonas con capilares neoformados (C y D).

A los **14 días** de la cirugía, se observó una reacción inflamatoria de tipo crónico (Figura 60. A), donde la proliferación fibroblástica siguió en aumento pero ya no de forma tan llamativa como en el día 7, acompañada de la presencia de numerosos vasos (Figura 60. B). Una semana después a los **21 días** postimplante, se detectó reacción de cuerpo extraño frente a las cápsulas con presencia de células gigantes multinucleadas, que intentaban fagocitar el alginato, y presencia de folículos linfoides (Figura 61. A), además de mantenerse la evidente proliferación fibroblástica con predominio de fibroblastos maduros y presencia de abundantes vasos (Figura 61. B). Finalmente a los **28 días** de la cirugía, la pared bronquial mostró una cicatriz consolidada rica en fibras colágenas (Figura 62. A), donde el aumento en componente celular ya no era tan marcado y sin embargo el número de vasos sanguíneos si fue claramente representativo (Figura 62. B). En definitiva, el día 7 es el punto de inflexión en la proliferación fibroblástica, y el día 14 en la proliferación vascular, a partir de estos días el número celular y de vasos incrementó pero de forma más gradual.

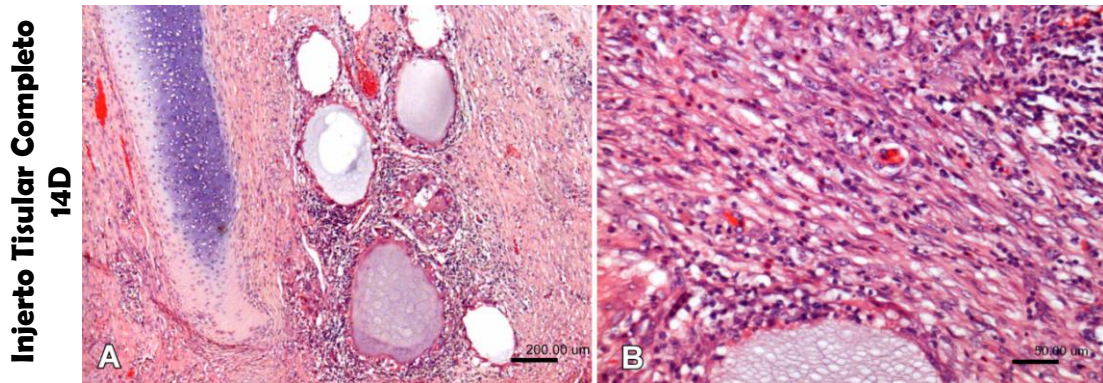


Figura 60: H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo (ITC) tras 14 días de la cirugía. Panorámica (A), detalle de la proliferación fibroblástica alrededor de las cápsulas (B).

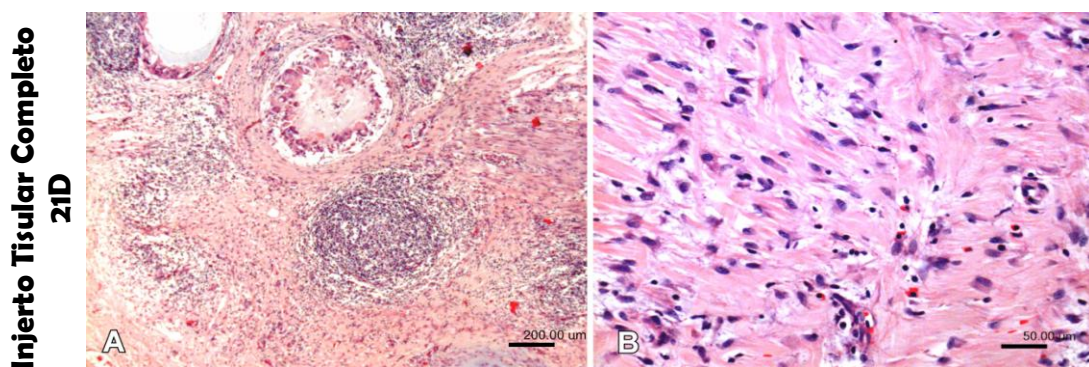


Figura 61: H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo (ITC) tras 21 días de la cirugía. Reacción de cuerpo extraño (A), proliferación vascular y fibroblástica (B).

La no presencia de infiltrados celulares perivasculares y/o peribronquiales, o rasgos de necrosis y/o isquemia en ninguno de los grupos de implante, permitió descartar el rechazo agudo de los injertos, sin embargo, si existieron algunos fenómenos de rechazo que caben ser destacados.

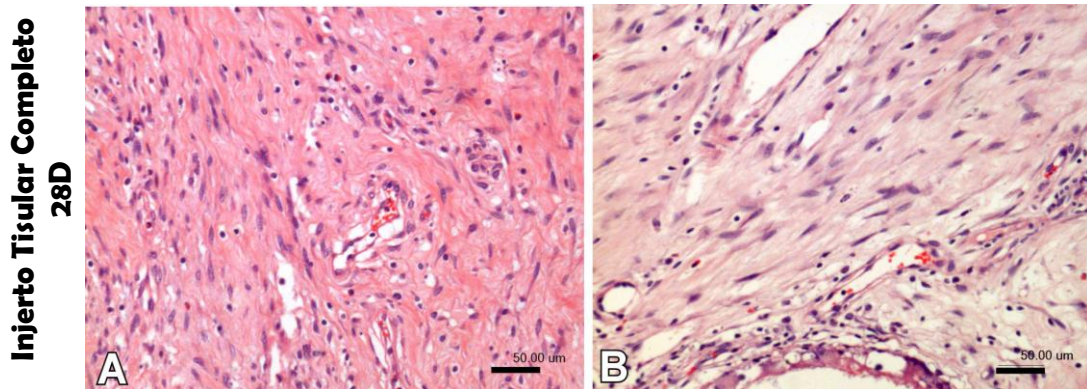


Figura 62: H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo (ITC) tras 28 días de la cirugía. Cicatriz colágena (A), y abundante proliferación vascular (B).

En los tres grupos de implante (C, MS e ITC) existió presencia de reacción inflamatoria aguda con elevado componente celular durante los tres primeros días postinjerto, que posteriormente evolucionó hacia una inflamación de tipo crónico con menor densidad celular.

Asimismo, la presencia de microcápsulas de alginato generó **reacción inflamatoria de cuerpo extraño leve** (si se compara con la generada con el hilo de sutura quirúrgica (Figura 63. A)), de lo cual se dedujo que la biocompatibilidad del material era apropiada. A medida que pasaban las semanas, se pudo ver como las células gigantes multinucleadas eran capaces de ir fagocitando las microcápsulas de alginato (Figura 63. B, C y D).

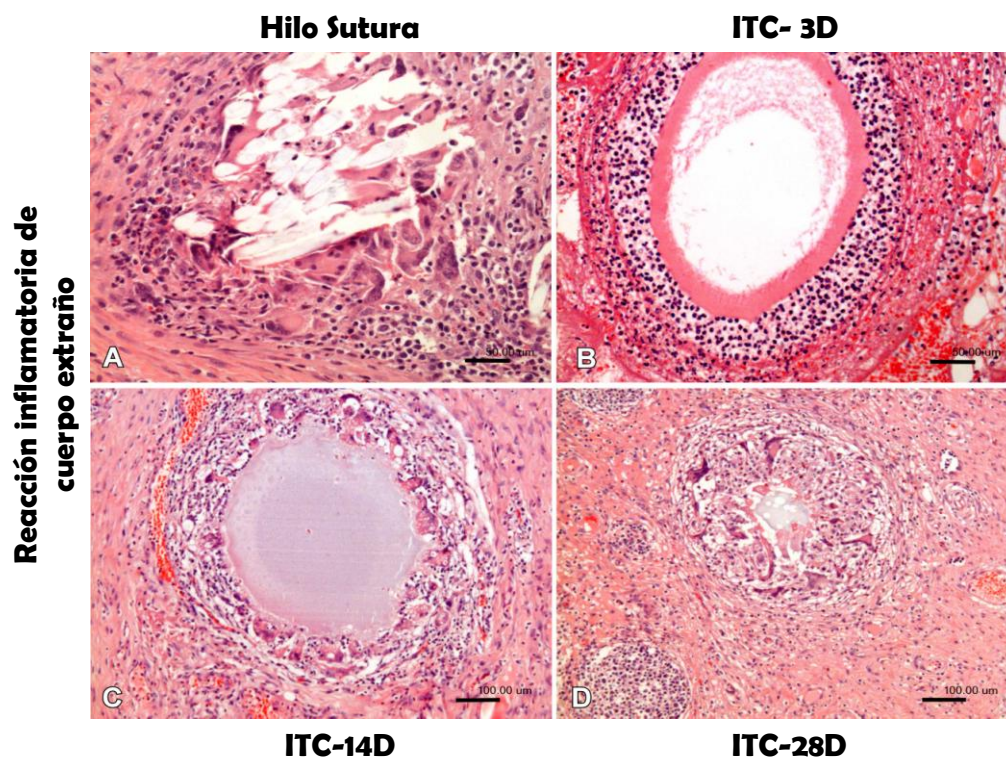


Figura 63: H&E de los muñones bronquiales del grupo injerto tisular completo (ITC) con evidencia de las reacciones inflamatorias de cuerpo extraño generadas frente al hilo de sutura quirúrgico (A), y frente a las microcápsulas tras 3 (B), 14 (C), y 28 (D) días de la cirugía.

Por último, cabe destacar que, en los animales del grupo ITC, se detectó la presencia de leve hemorragia y necrosis de la mucosa al tercer día postimplante (Figura 58. B), probablemente en relación con un proceso inicial de angiogénesis (disgregación de las paredes vasculares y de la matriz extracelular provocando como resultado la presencia de hemorragia y edema).

Comparando los tres grupos de implante (Control, Matriz Simple e Injerto Tisular Completo) entre sí en función del día de estudio, se pudo evaluar el efecto real del injerto tisular implantado, valorándose la efectividad de sus componentes.

En el **tercer día** postoperatorio se detectó que, los animales del grupo control (Figura 64. A), presentaron un edema y engrosamiento de la pared bronquial mucho menor que en los grupos de matriz simple e injerto tisular completo (Figura 64. B y C).

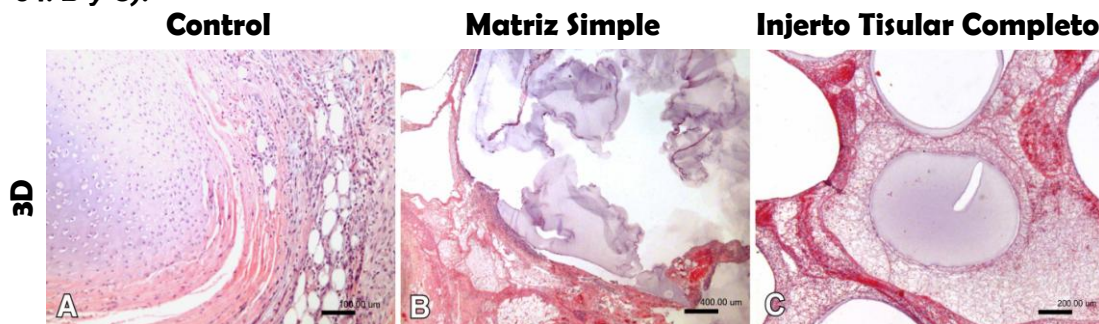


Figura 64: H&E de los muñones bronquiales tras 3 días de la cirugía de los grupos de implante: Control (A), Matriz simple (B), e Injerto tisular completo (C).

En el **día 7** postquirúrgico, la pared bronquial del grupo control (Figura 65. A) resultó ser más fina que la de los grupos MS e ITC, debido a la mayor presencia de fibroblastos en MS (Figura 65. B) y de un mayor pico de proliferación de fibroblastos y la presencia de algunas yemas vasculares en ITC (Figura 65. C).

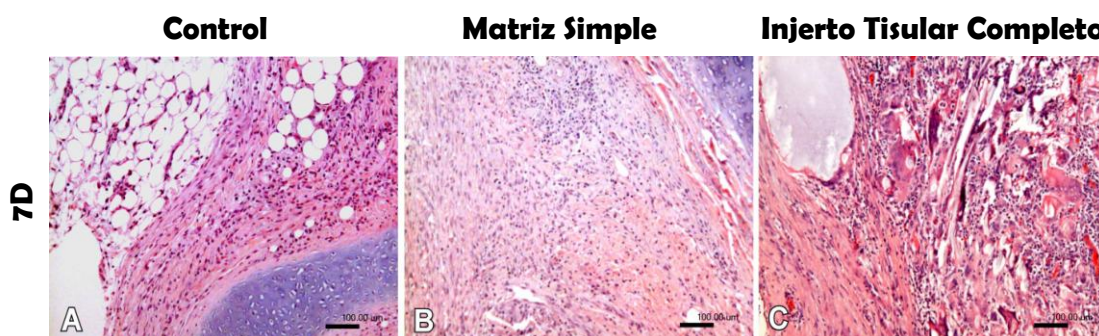


Figura 65: H&E de los muñones bronquiales tras 7 días de la cirugía de los grupos de implante: Control (A), Matriz simple (B), e Injerto tisular completo (C).

A los **14 días** de la cirugía, se analizó una cicatriz colágena en el grupo control (Figura 66. A), que fue ocupada por gran cantidad de componente celular en MS (Figura 66. B) y también por gran cantidad de vasos en el ITC (Figura 66. C).

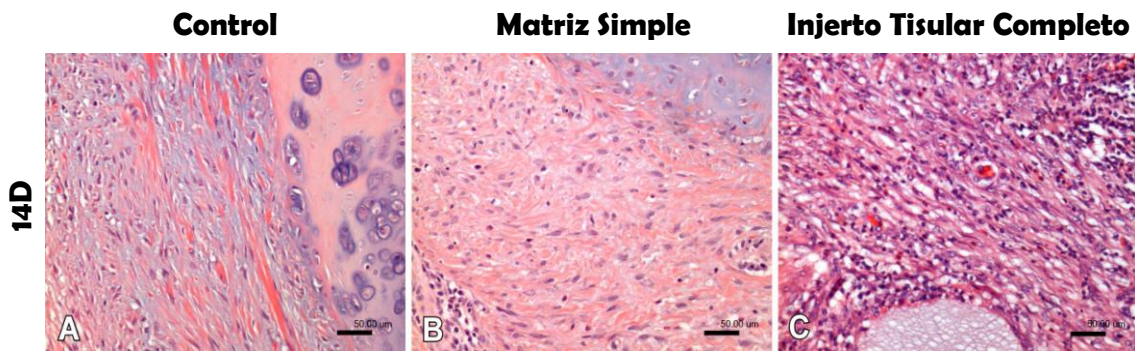


Figura 66: H&E de los muñones bronquiales tras 14 días de la cirugía de los grupos de implante: Control (A), Matriz simple (B), e Injerto tisular completo (C).

En el **día 21** postimplante, el aspecto del grupo control (Figura 67. A) y matriz simple (Figura 67. B) resultó muy similar con una cicatriz rica en colágeno y de aspecto más eosinófilo, mientras que en el grupo del injerto tisular completo, se detectó la presencia de gran cantidad de vasos sanguíneos y mayor cantidad de componente celular (Figura 67. C), diferencias que se mantuvieron tras **28 días** (Figura 68).

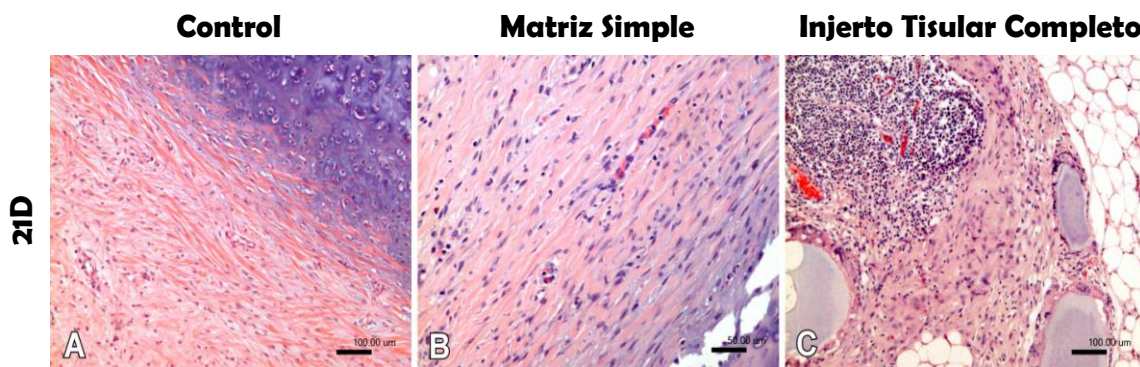


Figura 67: H&E de los muñones bronquiales tras 21 días de la cirugía de los grupos de implante: Control (A), Matriz simple (B), e Injerto tisular completo (C).

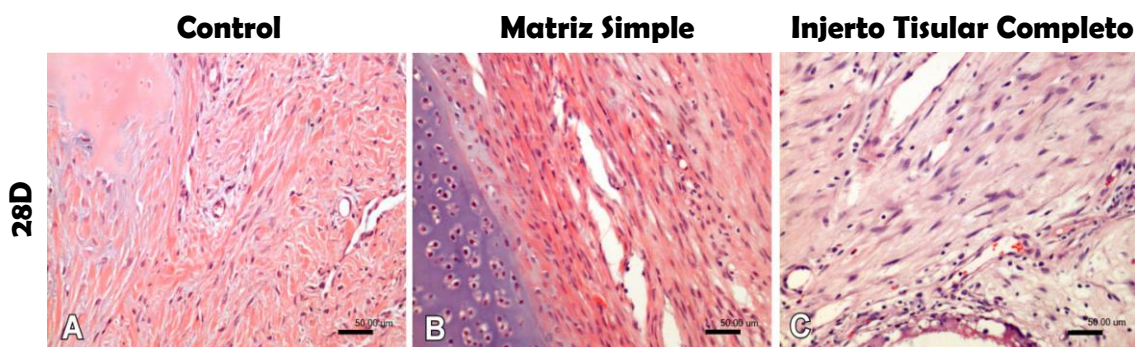


Figura 68: H&E de los muñones bronquiales tras 28 días de la cirugía de los grupos de implante: Control (A), Matriz simple (B), e Injerto tisular completo (C).

4. 6. c. Análisis de la revascularización y el grado de maduración vascular

Las técnicas de inmunohistoquímica son muy útiles para valorar la cantidad de neovasos maduros en los diferentes grupos de estudio, algunos marcadores como el CD31 y el factor VIII simplemente detectan la presencia de células endoteliales, mientras que otros, como la **actina**, se unen selectivamente a los pericitos y el músculo liso presentes en la pared de los **capilares maduros**. Con las tinciones de H&E se detectó la presencia de una vascularización creciente en los animales del grupo de injerto tisular completo, cuya maduración se verificó mediante marcación con actina.

Al comparar el **día 28** de estudio, se apreció la presencia de algunos vasos en el grupo control y en el de matriz simple (Figura 69. A y B), anecdóticos comparados con los resultados obtenidos en el injerto tisular completo, donde la presencia de vasos sanguíneos maduros fue claramente notoria y representativa con respecto a los grupos anteriores (Figura 69. C).

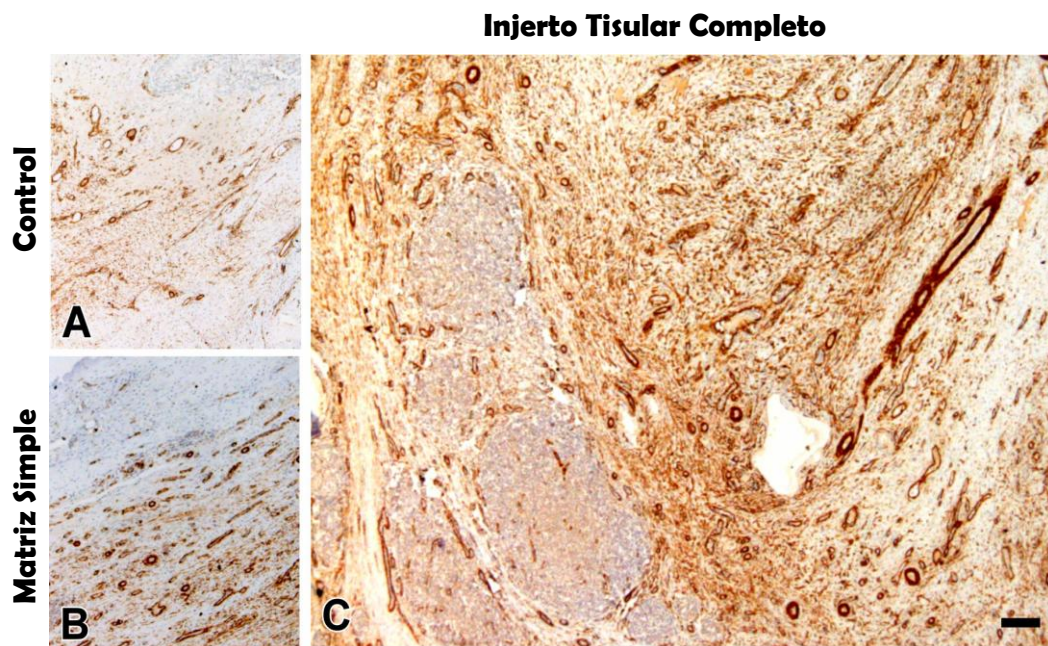


Figura 69: Inmunohistoquímica de actina de músculo liso de los muñones bronquiales tras 28 días de la cirugía de los grupos de implante: Control (A), Matriz simple (B), e Injerto tisular completo (C).

En el grupo ITC la proliferación vascular tras 3 días fue débil (Figura 70. A), no obstante, a los 14 días el aumento de vasos maduros fue muy marcado (Figura 70. B), para, a los 28 días, seguir en aumento pero de forma más gradual (Figura 70. C).

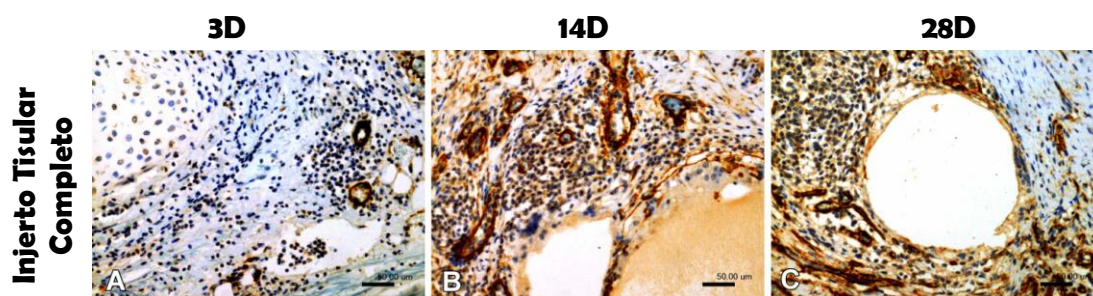


Figura 70: Inmunohistoquímica de actina de músculo liso de los muñones bronquiales del grupo Injerto Tisular Completo (ITC) tras 3 (A), 14 (B), y 28 (C) días de la cirugía.

4. 6. d. Estudios microbiológicos

La siguiente tabla (Tabla 23) muestra el crecimiento bacteriano existente en la zona del muñón bronquial en todos los animales de estudio del experimento. Destacó la existencia de microorganismos característicos de las vías respiratorias en todos los animales del estudio, con independencia del grupo de implante al que pertenecían.

Estudios microbiológicos de los muñones bronquiales I				
	Gram	Morfología	Pruebas complementarias	Identificación
C3-D3	Positivas Negativas	Cocos en cadenas Bacilos	Catalasa –	<i>Streptococcus</i> Enterobacterias
C1-D7	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
C4-D14	Positivas Negativas	Cocos en racimos Bacilos	Catalasa +, Coagulasa –	<i>Staphylococcus sp</i> Enterobacterias
C2-D21	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
C5-D28	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa +	<i>Staphylococcus aureus</i>
M53-D3	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
M56-D3	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
M54-D7	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
M510-D7	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
M51-D14	Positivas Negativas	Cocos en racimos Bacilos	Catalasa +, Coagulasa –	<i>Staphylococcus sp</i> Enterobacterias
M57-D14	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
M52-D21	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
M59-D21	Positivas	Bacilos, forma de bastón		<i>Bacillus</i>
M55-D28	Positivas Negativas	Cocos en racimos Bacilos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i> Enterobacterias
M58-D28	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>

La diversidad bacteriana se centró en **bacterias gram positivas y negativas**, que se identificaron según morfología y tinción de Gram, y en ocasiones las pruebas complementarias ayudaron a identificar el género bacteriano al que pertenecían.

Estudios microbiológicos de los muñones bronquiales II				
	Gram	Morfología	Pruebas complementarias	Identificación
ITC3-D3	Positivas Negativas	Cocos en racimos Bacilos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i> Enterobacterias
ITC9-D3	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
ITC11-D3	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
ITC12-D3	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
ITC1-D7	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
ITC7-D7	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
ITC13-D7	Positivas	Bacilos curvados		<i>Corynebacterium</i>
ITC19-D7	Positivas Negativas	Cocos en cadenas Bacilos	Catalasa -	<i>Streptococcus</i> Enterobacterias
ITC2-D14	Negativas	Bacilos		Enterobacterias
ITC6-14D	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
ITC18-14D	Positivas Negativas	Diplococos Bacilos		<i>Enterococcus</i> Enterobacterias
ITC20-14D	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
ITC4-21D	Positivas	Cocos en cadenas	Catalasa -	<i>Streptococcus</i>
ITC8-21D	Positivas Positivas	Cocos en racimos Bacilos curvados	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Corynebacterium</i>
ITC16-21D	Positivas Negativas	Cocos en cadenas Bacilos	Catalasa -	<i>Streptococcus</i> Enterobacterias
ITC17-21D	Positivas Negativas	Cocos en cadenas Bacilos	Catalasa -	<i>Streptococcus</i> Enterobacterias
ITC5-28D	Positivas	Cocos en cadenas	Catalasa -	<i>Streptococcus</i>
ITC10-28D	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>
ITC14-28D	Positivas Negativas	Cocos en racimos Bacilos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i> Enterobacterias
ITC15-28D	Positivas	Cocos en racimos	Catalasa +, Coagulasa -	<i>Staphylococcus sp</i>

Tabla 23: Resultados microbiológicos e identificación del microorganismo de los 35 animales de estudio, pertenecientes a los grupos de implante control (C), matriz simple (MS) e injerto tisular completo (ITC).

Cuando se representó el porcentaje de microorganismos existentes en la totalidad de los muñones bronquiales de estudio (Figura 71), se detectó que los **géneros más frecuentes** fueron **Estafilococos, Estreptococos y Enterobacterias** los cuales representaron en su conjunto el 91% de los casos, géneros tipo Corinebacterias, Bacilus y Enterococos, presentaron una frecuencia mucho menor. Al mismo tiempo, destacó la **colonización conjunta** por varios de estos microorganismos **en algunos de los animales** de estudio.

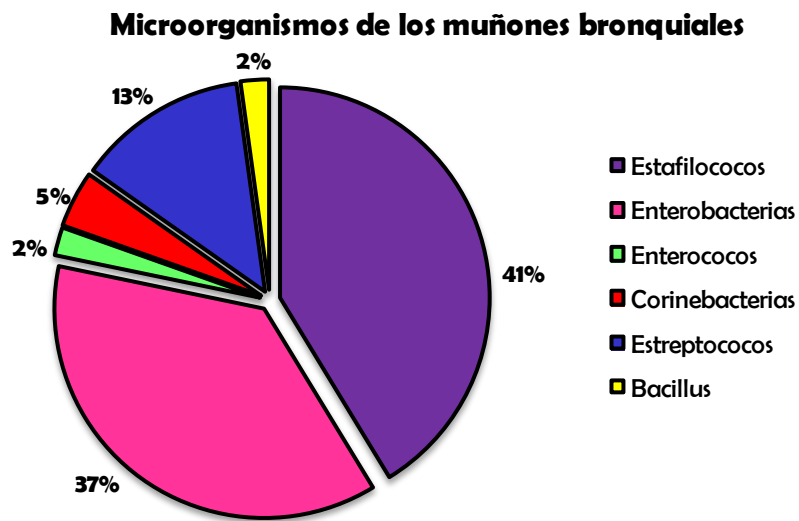
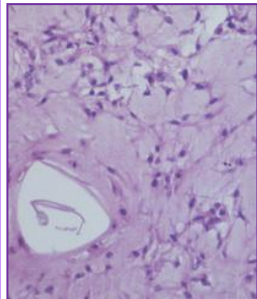


Figura 71: Representación del porcentaje de microorganismos existentes en los muñones bronquiales de los 35 animales del estudio.

5.



Discusión

5. DISCUSIÓN

5. 1. Elección de la fibrina como andamiaje

El uso de biomateriales naturales como la **fibrina**, representa una alternativa interesante, debido a que estos componentes son capaces de proporcionar una **composición y estructura más similar a la matriz extracelular nativa** donde residen las células, junto con la capacidad de emular ciertos estímulos, que se ejercen sobre las células, equivalentes a los del tejido de origen, a través de la presencia de proteínas y factores de crecimiento que **potencian las funciones celulares**.

Cuando se utiliza la **fibrina como sellador o pegamento**, se requiere **alta fuerza de tensión y adhesión**, cuyas propiedades mecánicas dependen de una **alta concentración de fibrinógeno**^{1,140}. Al aumentar la concentración de fibrinógeno, la fibrina resulta más compacta y rígida, de mayor turbidez, menos permeable y más difícil de usar¹⁸, asimismo **se reduce la capacidad de crecimiento celular** dentro del andamiaje¹⁴¹. Sin embargo, estas propiedades no son esenciales a la hora de elaborar una estructura tridimensional ideal **para el cultivo celular**, en la cual **concentraciones bajas de fibrinógeno son cruciales**¹.

Los andamiajes de fibrina autóloga con **bajas concentraciones de fibrinógeno**, presentaron **baja resistencia mecánica**, lo que implicó la necesidad de la **utilización de una matriz de alginato rígido** para conseguir suturar los andamiajes de fibrina *in vivo*, la cual no alteró los resultados del estudio, debido a que, esta matriz, no se encontraba directamente sobre el muñón bronquial, al mismo tiempo, este componente ya se utilizaba para la elaboración de las microcápsulas, el cual resultó totalmente biocompatible.

Por otro lado, la posible utilización del alginato, como andamiaje para el cultivo celular, queda descartada debido a que el **alginato no es un buen material para el crecimiento celular**¹⁴², lo que hace frecuente la necesidad de utilizar péptidos de adhesión celular tipo RGD¹⁴³ (Arginina-Glicina-Aspártico) que ayuden a la adhesión para facilitar la posterior proliferación celular, los cuales encarecerían el injerto a implantar.

La **composición óptima de fibrinógeno** de un andamiaje de fibrina para favorecer la mejor **proliferación celular**, sería aquella de aproximadamente **5 mg/ml**^{1,85,144-145}. Por ejemplo, en el cultivo *in vitro* de células estromales se comprobó que los andamiajes de fibrina autólogos representan un excelente andamiaje biológico, no obstante, las fibrinas comerciales mostraron pobre supervivencia celular¹⁴⁶.

La clave de una fibrina autóloga con concentraciones bajas de fibrinógeno, radica en que **no se emplean técnicas de concentración de fibrinógeno** como la crioprecipitación u otros métodos químicos. Simplemente se obtiene sangre autóloga, se centrifuga para separar el plasma (en el cual las concentraciones fisiológicas son 2-4 mg/ml²⁵) y se congela a -40°C hasta su uso¹.

La utilización de **cloruro cálcico** en la elaboración del andamiaje de fibrina, ayuda a que la **gelificación** sea más rápida¹⁴⁷, y el **ácido tranexámico** a la **estabilización** del gel formado. La no utilización de trombina, radica en diversos estudios que han descrito que **los valores de trombina no afectan a una mejor proliferación celular**^{54,148}. Por tanto, se trabaja con fibrinas más naturales y no modificadas (se mantiene la propia naturaleza de la fibrina, con sus concentraciones fisiológicas), cuyos métodos de elaboración son más sencillos y baratos¹.

Nuestro **andamiaje de fibrina autólogo** es barato (coste de 1 ml de fibrina de casa comercial 500€ aproximadamente, sin embargo a nosotros preparar 100 ml de fibrina autóloga nos cuesta 400€, es decir 4 €/ml), fácil de fabricar, natural (concentraciones de fibrinógeno fisiológicas), altamente disponible y **autólogo**, por tanto totalmente **biocompatible** y sin riesgos de transmisión vírica. Otra ventaja de esta técnica de elaboración, se basa en la multitud de **moléculas** presentes en el **plasma sanguíneo**, que pueden **favorecer la adhesión celular**, como la fibronectina¹⁴⁹ o el propio fibrinógeno¹⁵⁰, o **promover la proliferación fibroblástica y, estimular y acelerar la reparación tisular**, como los factores de crecimiento (TGF- β , bFGF, EGF (Factor de crecimiento epidérmico), VEGF,...), las plaquetas, las citoquinas y enzimas^{24,60,144,148,151-152}.

La **estructura tridimensional** del andamiaje de fibrina autólogo, está formada por una **red de poros interconectados**, a través de los cuales las células migran, se multiplican y se propagan por el andamiaje; la cual facilita la difusión de nutrientes y productos de desechos; y ayuda a la promoción y desarrollo de vascularización². El **fibrinógeno** es el **factor más importante** que define la **estructura del poro**¹⁵³. Una **concentración baja de fibrinógeno** (concentraciones fisiológicas) proporciona una **matriz apropiada para el crecimiento, migración y diferenciación celular**, la cual se caracteriza por presentar una red de fibras delgadas que conforman una densa estructura^{85,144,154}.

Los **andamiajes de fibrina** resultan, por tanto, excelentes para los experimentos de ingeniería tisular, debido a que **promueven la regeneración y angiogénesis**¹⁴⁴, representan una **matriz apropiada para el crecimiento y diferenciación celular**⁴⁵, y, debido a su morfología porosa, son **aptos como sistema de liberación** tanto de células⁴⁴, como de factores de crecimiento como VEGF⁴²⁻⁴³ y bFGF¹⁵⁵. Pudiendo en líneas futuras de investigación eliminarse el alginato para la microencapsulación de los factores de crecimiento, y utilizar únicamente fibrina autóloga, ya que existen zonas de unión específicas en el fibrinógeno y la fibrina, tanto para VEGF¹⁵⁶ como para bFGF¹⁵⁷.

Por tanto, la capacidad de elaborar un **andamiaje de fibrina autóloga con concentraciones de fibrinógeno bajas**, puede aumentar el uso de la fibrina como **andamiaje apto para el cultivo celular**, e indirectamente se incrementará su uso en múltiples áreas de la ingeniería de tejidos, aumentando las ya conocidas aplicaciones como sellador o pegamento (incompatibles con el crecimiento celular).

5. 2. Elección del tipo celular de estudio

Los **estudios de células dérmicas en el cerdo**, son **poco frecuentes** y se basan en el aislamiento a partir de piel fetal y no de la dermis de adultos. El hallazgo de células madre mesenquimales en la dermis del cerdo, hasta la fecha, no se había producido, por tanto se presenta la oportunidad de trabajar con MSCs en un modelo animal muy cercano al humano.

Las células de la dermis del cerdo aisladas, mostraron una típica estructura en huso, y con buena proliferación tras su cultivo en superficies plásticas. Dichas células **expresaron** marcadores celulares del linaje mesenquimal como **CD90** (Tirosina-1) o **CD29** (Integrina $\beta 1$).

La búsqueda de **antígenos de superficie específicos** para el **cerdo** resultó una **tarea complicada**, ya que los criterios para la definición de MSCs se basan en células humanas, y marcadores como el CD105 o CD73 (positivos más del 95%) no presentan clones válidos para el cerdo. Aun así, fue posible descartar la presencia de marcadores específicos de células endoteliales (CD31) y hematopoyéticas (CD45 y CD14), descartándose la contaminación cruzada del cultivo.

A partir de una **pequeña biopsia de dermis**, se pudo obtener cantidad suficiente de células (alrededor de 700 células/mg tejido), que tras un primer pase en cultivo *in vitro* en superficies plásticas cuadruplicaban su número, lo que permitió trabajar con números celulares elevados de pase 1P, en el cual se realizaron todos los estudios. Asimismo, las tasas de expansión celular en las que **cada célula se divide dos veces por pase**, se mantenían en al menos 10 pases, lo que presenta a las células de la dermis como un **tipo celular altamente proliferativo**, ideal para estudios de terapia celular e ingeniería tisular.

Las células de la dermis, representaron una **fente celular interesante**, debido a que de una pequeña biopsia de piel, la cual no causa una lesión grave, se pudo obtener *in vitro* gran cantidad de células debido a su fácil expansión en cultivo; y además, se trata de un tipo celular que **sintetiza gran cantidad de matriz extracelular**⁸² en respuesta a diversas señales, lo cual puede favorecer el proceso de maduración de vasos neoformados, a través de una respuesta angiogénica positiva.

Para la digestión de las células de la dermis, se ha seguido el protocolo de Morimoto¹⁵⁸ de forma optimizada, al utilizarse una única enzima, en vez de la combinación de dispasa y colagenasa. Todo ello gracias a la **extracción del tejido dérmico y no de la capa de piel completa**, se pudo ahorrar la digestión enzimática con dispasa que permite separar las células de la dermis y de la epidermis, abaratándose el proceso y acortándose el tiempo de digestión del tejido.

En cuanto a la técnica quirúrgica de cierre de heridas la utilización de grapas en el cerdo queda totalmente desaconsejada, ya que éstos se rascaban contra las jaulas, infectándose las heridas, por tanto, siempre deben utilizarse suturas con puntos sueltos para evitar así posibles daños en el animal.

La **capacidad proliferativa** de las células de la dermis porcina en el **interior** de los **andamiajes** de las fibrinas autólogas fue **muy buena**, ya que en apenas dos semanas la población celular incrementó en 100 veces, obteniéndose en un corto periodo de tiempo un gran número celular (para el mismo tiempo en superficies plásticas la población incrementaba en aproximadamente 20 veces).

Tras 28 días en cultivo, las células migraron a la superficie y formaron una monocapa, signo ya descrito en andamiajes de fibrina con baja concentración de fibrinógeno por Catelas¹⁴⁵, estos resultados podrían deberse al gradiente de oxígeno y nutrientes generado al añadirse el medio de cultivo sobre la superficie del gel, por tanto, deberían considerarse condiciones de cultivo en perfusión en posteriores estudios.

Los **cultivos tridimensionales** en los andamiajes de fibrina presentaron **buena adhesión celular**, una excelente **codistribución** de células y microcápsulas, junto con un **cambio morfológico** de nuestro tipo celular, en cultivos en superficie, las células de dermis presentaron morfología fusiforme típicamente fibroblástica, sin embargo en los andamiajes de fibrina, las células crecieron en volumen, aumentando sus prolongaciones, siendo éstas aun más alargadas. Además, los cultivos en andamiajes se pueden mantener hasta casi un mes, frente a periodos de 2 semanas en superficies plásticas.

El uso de **células de naturaleza fibroblástica** (morfología fusiforme, tamaño cercano a 26 μm , con síntesis de matriz celular normal y niveles de proliferación normales)¹⁵⁹ en estudios experimentales en tráquea¹⁶⁰⁻¹⁶¹, abre las puertas del uso de células no respiratorias en la regeneración pulmonar.

El uso de células epiteliales de tráquea, fibroblastos pulmonares y células de naturaleza condrocítica¹⁶², presentan una amplia experiencia al ser células presentes en la vía aérea, por tanto con menor probabilidad de rechazo, no obstante, debido a las complicaciones de obtención de estos tipos celulares de naturaleza autóloga, se amplía el uso de otros tipos celulares, fue Kobayashi¹⁶³⁻¹⁶⁴ quien propuso la utilización de **fibroblastos heterotópicos para terapias regenerativas de epitelio traqueal**, obteniendo buenos resultados en su propósito.

Las células de la dermis de cerdo representan por tanto un **atractivo tipo celular** para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa gracias a su **fácil aislamiento y manejo, accesibilidad y abundancia**, junto a los **buenos ratios proliferativos**, tanto para cultivos sobre superficies plásticas, como en andamiajes de fibrina.

En los estudios de diferenciación *in vitro* de diversos tipos celulares, la composición de los medios de cultivo representa un factor crítico¹⁶⁵. Por otro lado aunque la diferenciación celular en monocapa está bien descrita, para su implante, las células deben ser subcultivadas. El subcultivo implica la disociación celular hasta generar una suspensión de células individualizadas que pueden perder sus propiedades de diferenciación. Por tanto, para comprobar la existencia de diferenciación en el interior de una estructura tridimensional implantable, prescindiendo del inconveniente de subcultivar, se han utilizado los andamiajes de fibrina.

El andamiaje de fibrina autólogo se utiliza por tanto como **nicho celular**, siendo la matriz de fibrina la que proporciona la estructura tridimensional necesaria para la **adhesión, proliferación y diferenciación celular**. Los andamiajes de fibrina ya han sido utilizados previamente para la diferenciación de células madre embrionarias¹⁶⁶, y células estromales humanas¹⁴⁶, no obstante, poco se sabe sobre el potencial de diferenciación de las células de la dermis en el interior de los andamiajes de fibrina.

La **diferenciación adipogénica**, se obtiene con facilidad en cultivos en monocapa, pocos investigadores han intentado diferenciar usando estructuras tridimensionales¹⁶⁷. El uso de andamiajes en la diferenciación **osteogénica** es más frecuente ya que se requiere una estructura como soporte para la formación del hueso¹⁶⁸⁻¹⁶⁹. Por último, en la diferenciación **condrogénica** se utiliza el sistema de cultivo en pellet, debido a la necesidad de una estructura que ayude a la formación de cartílago¹⁷⁰⁻¹⁷².

Ohgushi, ya utilizó una superficie cerámica artificial para el cultivo de células que se diferenciaron hacia un linaje mesenquimal, y posteriormente dicha estructura fue implantada para el tratamiento de casos de osteoartritis con buenos resultados¹⁷³, en este caso la novedad radica en el uso de un elemento natural, biocompatible y autólogo para la elaboración de la estructura tridimensional a cultivar.

En nuestro estudio tras 14 días de cultivo, se obtuvieron buenos resultados de diferenciación adipogénica y osteogénica en superficies plásticas, sin embargo, tras 21 días los pellets de diferenciación condrogénica mostraron focos de necrosis celular, lo que los presenta como un método no reproducible ni fiable. Transcurrido un mes se obtuvo **diferenciación en el interior de los andamiajes de fibrina** autólogos, las células diferenciadas hacia adipocitos presentaron vacuolas lipídicas intracelulares rojas; las células diferenciadas hacia el linaje osteogénico evidenciaron mineralización con depósitos de calcio, cambio de morfología celular y presencia de marcadores osteogénicos, como la osteopontina y osteocalcina; y finalmente las células diferenciadas hacia condrocitos se localizaron en lagunas ricas en mucopolisacáridos y colágeno tipo II.

En definitiva, los andamiajes de fibrina autólogos representan, hoy en día, una **estructura apta y aconsejable** para el crecimiento y diferenciación celular, que posteriormente puede ser implantada en terapias regenerativas o ensayos de ingeniería tisular.

Además, se ha demostrado la **diferenciación *in vitro*** de las células de la dermis porcina hacia linajes mesenquimales adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos, con métodos tradicionales de diferenciación como son las **superficies plásticas** y los **pellets**, y en **andamiajes de fibrina autólogos**.

El cultivo de células en el interior de un andamiaje, requiere la utilización de nuevos métodos de medición de viabilidad celular, para ello, el ensayo de viabilidad **AlamarBlue®** es un método cuantitativo fiable, sencillo y rápido. Existen multitud de ensayos para medir proliferación celular, desde el uso de radioisótopos o moléculas marcadas radioactivamente ($[^3\text{H}]$ timidina o $[^{125}\text{I}]$ iododeoxiuridina, compuestos de tetrazolio que son reducidos a formazan por enzimas mitocondriales (MTT, XTT, MTS), incorporación de BrdU, marcaje con compuestos específicos de ADN fluorescentes, o ATP bioluminiscente. Aun así, todos estos métodos requieren el uso de productos tóxicos o radioactivos.

El AlamarBlue es un método **no tóxico** que permite medir viabilidad celular sobre las células sin producirles daño alguno. Para cada línea celular se deben determinar los parámetros experimentales, debido a las propiedades metabólicas únicas que cada línea celular presenta¹⁷⁴.

Gracias a esta técnica resulta posible medir proliferación y viabilidad celular a células que posteriormente serán implantadas en un paciente. Los diversos estudios en los cuales se han realizado ensayos con AlamarBlue, consisten en cultivos celulares sobre superficies plásticas¹⁷⁵, sobre andamiajes tridimensionales¹⁷⁶⁻¹⁷⁷, sobre tejido¹⁷⁸, o en células encapsuladas¹⁷⁹.

Sin embargo, hoy en día los cultivos de ingeniería tisular se realizan con células crecidas en el interior de andamiajes tridimensionales, y el AlamarBlue se presenta como un candidato idóneo para la **medición de viabilidad celular de cultivos tridimensionales**¹⁸⁰⁻¹⁸³. Los estudios realizados permitieron estimar que la incubación del AlamarBlue en fibrina requería 6 horas, es decir, dos horas más que en cultivos en superficie, para que el producto penetrara y llegara de forma óptima a las células crecidas en el interior del andamiaje tridimensional.

En conclusión, el desarrollo de esta técnica de **medición cuantitativa** aplicada a los andamiajes de fibrina, resulta **fiable** (los resultados de proliferación de la digestión de matrices coincide con los del Alamarblue, $p < 0,05$), y es interesante para futuros estudios, permitiendo medir de forma **sencilla y rápida** el número de células viables crecidas en el interior de un andamiaje en cualquier momento del estudio.

5. 3. Valoración del efecto de los factores de crecimiento

Entre los principales **factores de riesgo** en la formación de una fístula broncopleur postneumectomía (**FBPN**) encontramos la realización de una **devascularización extensa del muñón bronquial**^{121,127}. En estos casos particulares, una práctica ampliamente aceptada es la de reforzar la sutura bronquial con tejido

vascularizado (por ejemplo, la almohadilla de grasa pericárdica, los músculos intercostales o la vena ácigos) para favorecer la revascularización. Sin embargo, este proceso requiere varias semanas de desarrollo, por lo que existe un riesgo de deterioro de la cicatrización bronquial durante este período de tiempo. De ahí que se haya buscado la **creación de un injerto avascular** que sea **capaz de producir la revascularización** de la zona.

Los **factores de crecimiento** son **fundamentales** en la promoción de **vascularización** y regeneración tisular en cualquier estudio de ingeniería tisular. La angiogénesis es un proceso complejo y no bien conocido, en el que interactúan múltiples moléculas; factores promotores e inhibidores de la angiogénesis, células y proteínas reguladoras¹⁸⁴; los cuales ayudan a la correcta difusión de nutrientes, oxígeno y partículas de desecho.

Un único factor de crecimiento, no es capaz de generar una respuesta angiogénica suficiente para la formación de una red capilar madura y funcional, no obstante, la utilización combinada de varios factores de crecimiento que son liberados en distintos tiempos quirúrgicos, ayuda a una completa respuesta angiogénica⁹⁵. En la angiogénesis existe una **primera fase dependiente de VEGF** en la cual se **forman los nuevos vasos**, pero para la remodelación, estabilización y maduración de los vasos inmaduros se requieren **otras señales** en una **segunda fase más tardía**⁸⁷.

Entre las factores que ejercen una respuesta promotora en dicha segunda etapa de la angiogénesis, el **bFGF** es capaz de estimular la **sobreexpresión de los receptores de VEGF** para promover la maduración de estos nuevos vasos; asimismo, ejerce un **efecto mitogénico** sobre las células, favoreciendo una mayor proliferación celular que ayude a una mejor y más eficaz cicatrización de la zona de estudio.

La evaluación del efecto de dichos factores de crecimiento, se centra en sus **efectos *in vitro* e *in vivo***, cuya valoración cuantitativa es compleja, por lo que se realizaron mediciones cualitativas que permitieran discriminar diferencias entre grupos.

El efecto mitogénico del factor de crecimiento microencapsulado **bFGF**, se evidenció **tras 14 días en cultivo *in vitro***, a través del **mayor aumento celular en los andamiajes con factor** (FCF) con respecto a andamiajes sin factor (FC), lo cual se demostró con los ensayos de proliferación (digestiones de las matrices), viabilidad celular (ensayo AlamarBlue) y la mayor expresión de Ki-67 (indicador del estado proliferativo).

Además, bFGF provocó cambios en el estado de las células, debido a la detección de una disminución en la expresión de actina, acompañada de una evidente menor producción de fibras colágenas tras 14 días de cultivo, signos que definieron la no diferenciación de las células hacia miofibroblastos al encontrarse en un ambiente rico en bFGF¹⁸⁵⁻¹⁸⁶.

En la comprobación del efecto mitogénico de bFGF en el modelo *in vivo*, las imágenes de H&E, corroboraron una **mayor presencia celular** en el grupo de **injerto tisular completo**, frente a los grupos matriz simple y control sobre todo **tras 7 y 14 días**.

Que los efectos del factor de crecimiento fibroblástico básico se apreciaran tras 14 días, es importante debido a que éste tiempo de estudio, representa un punto crítico desde un punto de vista clínico, debido a que es el momento en el cual suceden los procesos de reparación tisular, cuando la formación de tejidos de granulación comienza y cuando la respuesta de inflamación aguda pasa a ser crónica¹.

Por otro lado, bFGF ejerció una doble función *in vivo* no sólo mitogénica, sino también ayudando a la remodelación de los vasos, comprobándose en el grupo injerto tisular completo (ITC) la presencia de gran cantidad de **vasos maduros y funcionales tras 28 días**, con respecto a los grupos matriz simple (MS) y control (C) con una presencia bastante escasa de vasos maduros; y todo ello debido a la liberación secuencial de bFGF una vez los vasos han sido formados, estimulando la maduración de los mismos mediante la proliferación de pericitos y deposición de matriz extracelular⁹⁵.

La valoración del efecto de **VEGF** fue estudiada únicamente en el modelo *in vivo*, ya que *in vitro* no resultó viable validar su efectividad, permitiendo encontrar diferencias entre grupos en la formación de vasos (mediante activación, proliferación, migración y adhesión en el foco lesional de células endoteliales). En los animales del grupo **injerto tisular completo** (ITC) se evidenciaron tras 3 días yemas vasculares, que, tras 2 – 3 semanas formaron **abundantes vasos sanguíneos**, si se comparaban con los grupos matriz simple (MS) y control (C), que presentaron pocos vasos.

Por último, se intentó comprobar la **actividad biológica *in vivo*** de ambos factores de crecimiento, detectada a través de la **expresión** de los **receptores** para VEGF y bFGF, a través de técnicas inmunohistoquímicas, pero existió un gran ruido de fondo, que impedía realizar una cuantificación por densitometría, aparentemente debido a que el alginato bloqueaba los receptores de ambas moléculas.

Quedaría pendiente hacer un estudio más exhaustivo de todos los componentes presentes en el injerto tisular completo (ITC), ya que debería validarse por separado el efecto de cada factor, para controlar la cantidad mínima necesaria para generar una respuesta suficiente, y si la respuesta incrementa positivamente con cambios en las concentraciones de uso.

Por tanto se debería evaluar el efecto real de las células por separado y el de la combinación de células con cada uno de los factores, para **no sólo validar el efecto global del injerto tisular completo**, sino detectar el efecto de cada componente por separado y su aplicación de dos en dos, para encontrar posibles interferencias o sinergias que queden enmascaradas en el estudio global.

La comprobación definitiva del desarrollo de una **revascularización bronquial completa** (red capilar completamente madura y funcional sobre el bronquio) requeriría de un **mayor tiempo de evolución**, por lo que su verificación histológica resulta inviable dentro de los límites de estabulación del modelo animal porcino. En definitiva, el **injerto tisular completo** (ITC) ejerce una **acción revascularizadora** en comparación con el implante de una matriz simple o de la mera sutura bronquial, a través de la generación de capilares funcionales y maduros en un injerto inicialmente avascular.

5. 4. Evaluación del modelo animal

La selección del modelo animal porcino, se basó en el intento de buscar un **modelo animal fiable de neumectomía**, que permitiera extraer conclusiones acerca de la revascularización bronquial en resección pulmonar. El implante de un biomaterial implica la realización de una herida en un órgano o tejido. Dicha herida y la consiguiente perturbación de los mecanismos homeostáticos, provocan una cascada celular de curación de la herida. La respuesta de la herida depende de múltiples factores como: su extensión, las interacciones con el material implantado, la formación de una matriz provisional, la extensión de la necrosis celular y de la respuesta inflamatoria; factores que afectarán a la formación de los tejidos de granulación, a las posibles reacciones de cuerpo extraño y a la fibrosis¹⁶.

El cerdo resultó un **modelo adecuado de neumectomía y devascularización del muñón bronquial** a pesar de que existieron algunas complicaciones en un tercio de los casos, aunque no modificaron en absoluto la evolución del proyecto, se deben tener en cuenta. La colonización bacteriana en la vía aérea del cerdo es frecuente y más abundante que en el humano, las **tasas de colonización bacteriana** encontradas en el interior de los muñones bronquiales fueron del **100%**. La infección postoperatoria en la vía aérea es un factor de riesgo por su efecto deletéreo sobre la cicatrización, lo cual deberá tenerse en cuenta en futuros estudios.

La presencia de una **cicatriz consolidada** rica en fibras colágenas, en el grupo experimental injerto tisular completo, y la ausencia de rasgos de necrosis o isquemia de la zona de implante, permite una buena cicatrización del margen bronquial, que ayudará a la regeneración del epitelio bronquial.

5. 5. Perspectivas futuras

Un paso más en este estudio consistiría en intentar conseguir la **regeneración del epitelio bronquial**. La regeneración del epitelio podría ser importante ya que, el epitelio proporciona una barrera física, que regula las funciones metabólicas de la vía aérea y participa en el transporte de iones y fluidos, lo que ayudaría a la obtención de un proceso de ingeniería tisular más completo.

Diversos estudios en tráquea, han conseguido regenerar *in vitro* el epitelio traqueal, para ello se requiere una **separación física** en el **co-cultivo** de dos tipos celulares, las **células epiteliales** y **células fibroblásticas o mesenquimales**. Las estrategias de cultivo son diversas, desde el uso de inserts de cultivo¹⁸⁷, membrana amniótica¹⁸⁸, o andamiajes tridimensionales de colágeno¹⁶³⁻¹⁶⁴.

Kobayashi, describió que los fibroblastos ejercen efectos estimulantes en la migración, proliferación, y diferenciación de células epiteliales, lo que ayuda a la regeneración epitelial¹⁶³; Le Visage, propuso la necesidad de interacciones entre células epiteliales y mesenquimales para la reconstrucción del epitelio, pero cultivados con una cierta separación física¹⁸⁷; y Goto, relató la no necesidad de factores exógenos en la reconstrucción epitelial, debido a que células de naturaleza fibroblástica secretan factores de crecimiento moduladores de la proliferación y diferenciación de células epiteliales¹⁸⁸.

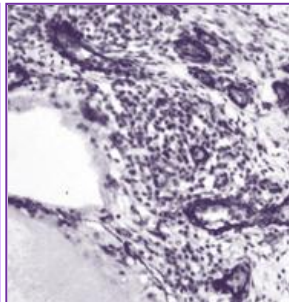
La utilización de andamiajes de fibrina autólogos, en los cuales se cultivan en el interior células de la dermis (fibroblastos con fenotipo mesenquimal) y células epiteliales en su superficie, podría representar una estructura apropiada para proporcionar la separación física necesaria que permita las interacciones celulares entre los dos tipos celulares, todo ello para conseguir la regeneración epitelial de la zona de estudio.

Sería interesante probar otras técnicas de cultivo, como los **cultivos en perfusión** a través de la utilización de biorreactores¹⁸⁹, que aseguren una óptima distribución de los nutrientes y el oxígeno a todas las células del interior de los andamiajes tridimensionales.

Igualmente como ya se ha descrito previamente, deberían estudiarse los **efectos individuales de cada componente del injerto tisular completo** (fibrina, células, bFGF y VEGF) en el modelo *in vivo*, para determinar el efecto real individual y su contribución en el estudio global, junto con el intento de utilizar la fibrina como sistema liberador de bFGF¹⁵⁵, para **prescindir de la utilización del alginato**, el cual aun siendo biocompatible no es un producto autólogo como la fibrina. Y en esta línea deberían buscarse métodos que permitan encontrar un punto intermedio entre la suturabilidad del injerto y la óptima concentración de fibrinógeno para el cultivo celular, para que no sea necesaria la matriz de alginato rígida.








Finalmente, los buenos resultados obtenidos en la formación de una red capilar madura a partir de un injerto totalmente avascular, abre las puertas de su utilización en el **tratamiento de otras patologías** en las que la revascularización sea clave para la resolución del proceso.

6.

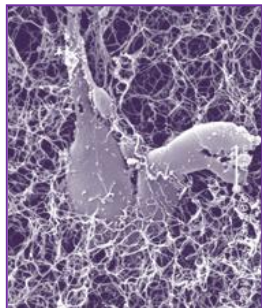


Conclusiones

6. CONCLUSIONES

-  La nueva técnica de elaboración de andamiajes de fibrina, con concentraciones fisiológicas de fibrinógeno, es sencilla y reproducible, la cual influye en la biología de las células permitiendo una óptima adhesión, proliferación y diferenciación celular en el interior del andamiaje tridimensional.
-  Los andamiajes de fibrina autóloga representan una estructura porosa, implantable, biocompatible y apta para la ingeniería tisular y las terapias regenerativas, suponiendo una alternativa a las fibrinas comerciales.
-  Las células de la dermis porcina presentaron fenotipo de célula madre mesenquimal, hasta ahora no descrito, lo que las presenta como una fuente celular interesante de MSCs, fácilmente accesible, abundante, altamente proliferativa y con la capacidad de diferenciar in vitro hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos, tanto en superficies plásticas como en el interior de andamiajes tridimensionales de fibrina.
-  El novedoso ensayo del AlamarBlue resultó un método fiable, sencillo y rápido para la medición de proliferación, citotoxicidad y viabilidad de células crecidas en el interior de andamiajes de fibrina.
-  La neovascularización producida por la liberación temporal del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), dio lugar a la formación de vasos maduros.
-  La composición del injerto tisular completo (ITC) resulta idónea para favorecer la revascularización tisular. Las células madre mesenquimales de dermis, además de ayudar en la cicatrización, sintetizan gran cantidad de matriz extracelular necesaria en la maduración vascular. La fibrina promueve la vascularización gracias a la presencia de moléculas estimuladoras de la reparación tisular en el plasma. Y finalmente, los factores de crecimiento actúan como señales inductoras de la angiogénesis.
-  El injerto tisular completo (ITC) es un producto biocompatible y autólogo que, siendo inicialmente avascular, es capaz de inducir el desarrollo de una red capilar madura y funcional, además de promover una cicatrización consolidada, factores necesarios para impedir las complicaciones derivadas de una isquemia por devascularización.

7.



Difusión de
resultados

7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Artículo científico internacional	
Autores:	Pilar de la Puente, Dolores Ludeña, Ana Fernández, Jose L. Aranda, Gonzalo Varela, Javier Iglesias.
Título:	<i>Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering.</i>
Revista:	J Biomed Mater Res Part 2011; 99A: 648-654.
Impacto:	3,044 (año 2011)

Congreso Europeo	
Autores:	Puente, P., Ludeña, D., López, M., Ramos, J., Aranda, J. L., Varela, G., Iglesias, J.
Título:	<i>Differentiation of porcine dermal cells inside autologous fibrin scaffolds.</i>
Congreso:	<i>6th World Congress on tissue banking. 20th Congress of the European Association of Tissue Banks. 12^o Congreso de la Asociación Española de Bancos de Tejidos.</i>
Ciudad:	Barcelona, Spain.
Fecha:	9-11 Noviembre 2011
Participación:	Comunicación Oral (O-59)

A continuación, se adjunta una copia del artículo publicado en la revista internacional *Journal of Biomedical Materials Research*, así como una copia del resumen de la comunicación oral presentada al *6^o Congreso Mundial de Bancos de Tejidos*, junto con la acreditación de participación:



Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering

Pilar de la Puente,¹ Dolores Ludeña,² Ana Fernández,¹ Jose L. Aranda,³ Gonzalo Varela,³ Javier Iglesias¹

¹Tissue Establishment San Francisco Clinic Foundation, León, Spain

²Pathology Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

³Thoracic Surgery Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

Received 18 March 2011; revised 30 May 2011; accepted 2 August 2011

Published online 27 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.33231

Abstract: Autologous fibrin scaffolds (AFSs) enriched with cells and specific growth factors represent a promising biocompatible scaffold for tissue engineering. Here, we analyzed the *in vitro* behavior of dermal fibroblasts (DFs) (cellular attachment, distribution, viability and proliferation, histological and immunohistochemical changes), comparing AFS with and without alginate microcapsules loaded with basic fibroblast growth factor (bFGF), to validate our scaffold in a future animal model *in vivo*. In all cases, DFs showed good adhesion and normal distribution, while in scaffolds with bFGF at 14 days, the cell counts detected in proliferation and viability assays were greatly improved, as was the proliferative state,

and there was a decrease in muscle specific actin expression and collagen synthesis in comparison with the scaffolds without bFGF. In addition, the use of plasma without fibrinogen concentration methods, together with the maximum controlled release of bFGF at 14 days, favored cell proliferation. To conclude, we have been able to create an AFS enriched with fully functional DFs and release-controlled bFGF that could be used in multiple applications for tissue engineering © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 99A: 648–654, 2011.

Key Words: fibrin, dermal fibroblast, scaffold, fibroblast growth factor, encapsulation

How to cite this article: de la Puente P, Ludeña D, Fernández A, Aranda JL, Varela G, Iglesias J. 2011. Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A* 2011;99A:648–654.

INTRODUCTION

Tissue engineering is an interdisciplinary scientific field that attempts to repair or improve the biological functions of tissue that is damaged or has ceased to perform its role through the use of three critical components: a biocompatible scaffold, a cellular component, and bioactive molecules.

A three-dimensional scaffold is required for cellular adhesion, proliferation, and maturation. Scaffolds should be biocompatible and biodegradable, with a porous structure, and should be nontoxic and nonimmunogenic. There are many natural polymers (collagen, fibrin, alginate, and chitosan) and synthetic polymers (polyglycolic acid, polylactic acid, polyorthoesters, polyanhydrides, and polyfumarates) for generating scaffolds for tissue engineering.^{1–3}

Under physiological conditions, when a lesion occurs a complex framework of proteins appears to prevent blood loss in which fibrin is very important. Fibrinogen is a plasma protein that is converted by thrombin into fibrin during blood coagulation. Factor XIIIa cross-links monomers of fibrin to form a clot. Then, fibrin forms a complicated network of fibers. Fibrin has long been used as an effective scaffold in tissue engineering, but the great majority of

authors have used commercial fibrin.^{3–6} This carries a potential risk of viral transmission, and commercial fibrin has high fibrinogen concentrations (60–115 mg/mL) and is very expensive.⁴ In light of these disadvantages, we propose an alternative; the manufacture of an autologous fibrin scaffold (AFS), where it is produced from autologous blood, physiological fibrinogen concentrations are preserved (1–5 mg/mL), cost is reduced, and the risk of viral transmission is absent.

Fibrin scaffold can be used in many clinical applications, including cardiovascular, thoracic, and dental surgery, neurosurgery, and plastic and reconstructive surgery.^{3–5}

In tissue engineering, the cellular component is involved in the regeneration and scarring of tissues, and a controlled and sequential delivery of growth factors would enhance stimulating effects in regeneration and blood vessel formation and maturation. We used autologous dermal fibroblasts (DFs) and encapsulated bFGF within alginate microcapsules to achieve controlled delivery.

Here, we describe a method for elaborating AFS without fibrinogen concentration methods or the use of commercial fibrin. Only autologous plasma was used. We evaluated the

Correspondence to: P. de la Puente; e-mail: ppuente@bantecyl.es
Contract grant sponsor: GRS/213/A/08

viability, proliferation, adhesion, and distribution of the cells in our scaffold and the effect of microencapsulated bFGF.

MATERIALS AND METHODS

Cell isolation and culture

DFs were isolated from pig dermis obtained from 12 Large-White crossbreed pigs of between 1 and 3 months of age and 15–35 kg in weight. All animals received humane care in compliance with the 86/609/CEE European Economic Community Directive and the 1201/2005 Spanish Royal Decree at the Veterinary School of the University of León. The experimental protocol was reviewed and approved by the Hospital Research Committee of the University of Salamanca.

The animals were premedicated intramuscularly with Midazolam (Normon, Madrid, Spain) 0.35 mg/kg and Ketamine (Imalgene, Marquez, Mexico) 5 mg/kg. Anesthesia was maintained with inhaled isoflurane 2% (Isoflo, Abbot, Chicago, USA). The animals were not euthanized after the study because they were used for other experiments that did not affect our study directly.

Dermis biopsies were obtained from the top zone of the back of the right leg; the skin was shaved, disinfected, and cut to remove a layer of skin after which the dermis was separated from the epidermis. The dermis was maintained at 4°C in antibiotic solution for less than 6 h after which it was cut into small pieces. The pieces were incubated with collagenase type I, from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 2 mg/mL in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA, Pasching, Austria) for 22–24 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

DFs were cultured at 10⁴ cell/cm² in 25-cm²-flat bottomed tissue culture flasks (BD Falcon™, Bedford, USA) in growth medium DMEM (PAA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (PAA, Pasching, Austria). The growth medium was refreshed every 2–3 days. First-passage fibroblasts were used in all experiments.

Preparation of AFSs

At the time of extracting, the dermal biopsies blood was obtained in citrate-loaded tubes (BD, Plymouth, UK). Initial blood samples of 15–25 mL from each animal were centrifuged at 1620 g for 10 min. Plasma represented 40% of the total volume, and it was frozen until it was used to prepare the AFS. An analysis of the fibrinogen concentration using an automatic coagulation analyzer (Sysmex A-500 Series, Embee Diagnostics) revealed a concentration of 2–3.5 mg fibrinogen/mL of plasma.

AFSs were formed by mixing the different components to achieve final concentrations of 400 µL/mL plasma, 4 mg/mL tranexamic acid (Rottapharm, Valencia, Spain), and 4 mg/mL calcium chloride (Braun, Barcelona, Spain) diluted in growth medium to form 1 mL of AFS (2.2 cm in diameter and 2.4 mm in thickness) [Fig. 1(A)]. The scaffolds were allowed to gel for 2 h in 12-well plates in an incubator at 37°C, 5% CO₂, before being covered with growth medium.

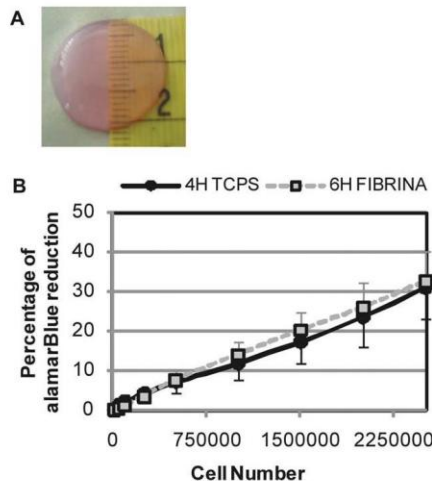


FIGURE 1. (A) Gross view of the morphology of the fibrin scaffold. The scaffold was prepared at a size of about 2.2 cm in diameter. (B) Calibration curve percentage of AlamarBlue reduction versus cell numbers of dermal fibroblast culture in TCPS (tissue culture polystyrene) and the fibrin scaffold with different incubation times. All values are the means \pm SD; $N = 10$. TCPS: $y = 0.0000131x + 0.3605570$; $R^2 = 0.9983441$, and fibrin, $y = 0.0000115x + 0.9003924$; $R^2 = 0.9958427$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.intelibrary.com).]

Cell seeding and three-dimensional cultures

We created three-dimensional cultures with the use of fibrin as a scaffold. Preconfluent autologous DFs (primary culture) were resuspended in a fibrin solution at final cell concentration of 10⁴ cells/mL. Cells were added before the agents responsible for fibrin clotting (tranexamic acid and calcium chloride). The medium was changed at 2- or 3-day intervals during the culture period. The scaffolds were collected at 3, 7, 14, 21, and 28 days of culture. The 12 samples collected at those times were used for viability assays, and after several washes with phosphate buffer saline (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), six of them were used for proliferation studies, four of them for histological and immunohistochemical staining, and two of them were examined by scanning electron microscopy (SEM).

Encapsulation of bFGF in alginate microspheres and incorporation into fibrin scaffolds

A total of 1 µg/mL of human bFGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) encapsulated in alginate microcapsules (diameter 250 µm) in Tris-buffer, pH 8, were obtained from the Department of Chemical Engineering (Salamanca) and were included in the complete AFSs (Fibrin-Cells-Factors, FCF). As controls we used fibrin scaffolds without growth factors (Fibrin-Cells, FC).

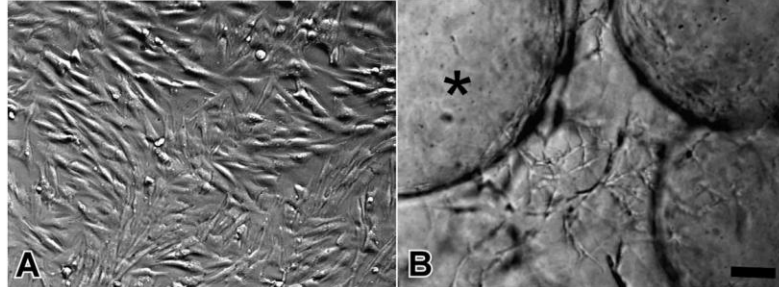


FIGURE 2. (A) Morphology of adherent fibroblast-like cells, isolated from pig dermis at 3 days after the initial plating. (B) Micrographs of dermal fibroblasts cultured on FCF scaffolds. Note the morphology of the alginate microcapsules (*). Scale bar: 100 μm .

The generation of such microcapsules has been described by Herrero et al.⁷ Briefly, bFGF in Tris-buffer, pH 8, was added to a 2 wt % sodium-alginate solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). This alginate-bFGF solution was added dropwise onto the 3 wt % calcium chloride solution (Scharlau, Gillman, Australia). Mass transfer studies allowed those authors to observe the release of bFGF after about 1 week.⁸

Cell morphology, attachment, and distribution

Morphological observations of cells entrapped in the AFS were performed with an inverted microscope (Leica DMIL Microscope and Leica DFC 300FX Camera) every day during *in vitro* culture and cell distribution throughout the scaffold together with the internal structure of the scaffolds were observed by SEM. The scaffolds were cut and fixed with 2.5% glutaraldehyde, dehydrated in a graded ethanol series, and sputter-coated with gold for visualization by SEM (JEOL 6100).

Viability and proliferation assays

Cell proliferation and viability were assessed using the Alamar Blue colorimetric indicator assay (AbD Serotec, Oxford, UK). This is a useful technique for measuring proliferation, viability, or cytotoxicity in a cell culture quantitatively.⁹ Proliferating cells elicit a chemical reduction of Alamar Blue, an indicator based on the detection of metabolic activity. Alamar Blue is a nontoxic fluorescent dye that does not affect the viability or proliferation of cells.¹⁰

On the above days of the study (3, 7, 14, 21, and 28 days), 10% v/v Alamar Blue was added to each plate containing seeding scaffolds and the plates were incubated for 6 h at 37°C. A calibration curve generated from a known number of DFs seeded onto TCPS (Tissue Culture Polystyrene) and in the AFSs allowed the optimal incubation time for which the percentages of indicator Alamar Blue coincided in these substrates to be determined (4 h for TCPS, 6 h for fibrin scaffolds) [Fig. 1(B)]. Aliquots of 100 μL were placed in a 96-well plate, and fluorescence was monitored

at 530 nm excitation and 590 nm emission using a fluorescence plate reader (Synergy HT, Bio-Tek).

The medium from the cultures was removed, and the AFS were treated enzymatically with collagenase type I from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) at 2 mg/mL in DMEM (PAA) for 24 h at 37°C. Finally, cells were counted using the Trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) exclusion method to obtain a growth curve of the cells in the AFSs.

Histological and immunohistochemical studies

The scaffolds were collected, fixed in 4% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 4- μm sections. The sections were stained with Hematoxylin & Eosin (H&E, Merck, Darmstadt, Germany) to reveal the histological structure and with Masson Trichrome Goldner with light green stain (Bio-Optica, Milan, Italy) to determine the production of collagen by the cells.

To rule out the possible presence of myofibroblasts, the sections were immunostained with a muscle-specific actin mouse monoclonal antibody (MSA, Clone HHF35, diluted 1:200, Novocastra, Newcastle, UK). With a rabbit monoclonal antibody against KI-67 (Clone SP6, diluted 1:100, Master Diagnostica, Granada, Spain), a protein expressed during cell proliferation, it was possible to observe the differences in the proliferative state between the fibrin scaffolds with or without growth factor. We used a Bond Polymer Refine Detection (DS9800, Vision BioSystems, Newcastle, UK), involving a polymeric horseradish peroxidase (HRP)-linker antibody conjugated system for the detection of the different antibodies, according to the instructions of the manufacturer. All micrographs were taken with an Axiophot Zeiss Microscope and Nikon Digital Sight D5-U1 camera.

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm standard deviation. SPSS Statistics 17.0 was used to determine the statistical significance between groups, $p < 0.05$ being considered significant. The study of parametric normality and homoscedasticity assumptions were used, respectively, in the Kolmogorov-

ORIGINAL ARTICLE

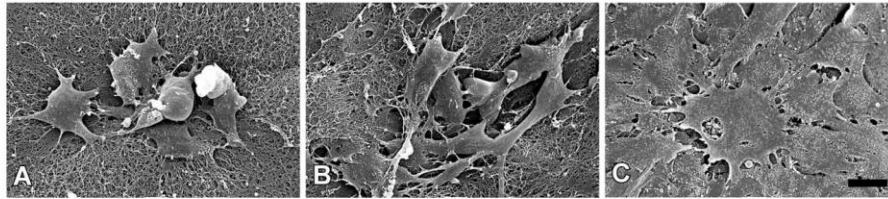


FIGURE 3. SEM images of attachment and distribution of porcine dermal fibroblasts on autologous fibrin scaffold at 7 days (A), 14 days (B), and 28 days (C) of culture. Scale bar: 10 μ m.

Smirnov test and Levene test, after checking the criteria for parametric analysis, which was performed using Student's *t* test for independent samples.

RESULTS

Cell morphology, attachment, and distribution

The typical fibroblast-like morphology, characterized by spindle-shaped cells with elongated prolongations, was observed in the plate cultures [Fig. 2(A)]. This cell morphology was characterized by an increase in volume, which increased the number of prolongations and multiplied the number of directions used by them. Additionally, we observed a homogeneous codistribution of cells and microcapsules [Fig. 2(B)].

SEM images revealed that our AFSs had a porous structure with a network of interconnected fibers at 7 days of culture [Fig. 3(A)]. DF adhesion to the fibrin scaffold, an evident increase in the number of cells, and a homogeneous distribution with the incubation time were observed at 14 days of culture [Fig. 3(B)]. After 28 days of culture, the scaffold showed a layer of thin, flat cells [Fig. 3(C)] because the cells had migrated from the inside to the surface.

Proliferation assays

Cell numbers in the FC and FCF scaffolds increased between 3 and 21 days of culture, but during the last days of study a point of inflexion was observed [Fig. 4(A)]. DF proliferation on fibrin showed a lag period after cell seeding (between 0 and 3 days in culture), which was followed by a period of exponential growth, called the log phase (between 3 and 21 days of culture). Between 21 and 28 days of culture, cell numbers decreased. An initial seeding of 10^4 cells increased to almost 2×10^6 cells over a period of 21 days. At 14 days of culture, significant differences were observed between the groups (FC group: $1,366,666.67 \pm 85,479.04$ vs. FCF group: $1,640,000 \pm 173,435.87$, $p = 0.006$).

Viability assays

At 3 days, cell numbers in both groups increased slightly; at 7 days, the cell population was increased 10-fold, and at 14 days, significant differences were found between groups (FC group: $1,400,425.2 \pm 86,235.66$ vs. the FCF group: $1,629,392.5 \pm 69,116.62$, $p = 2.737 \times 10^{-7}$). At 21 days, cell numbers reached the maximum that the fibrin matrix was able to hold, and at 28 days, there was a slight drop in

cell numbers [Fig. 4(B)]. Cell numbers in the proliferation and viability assays more or less coincided ($p > 0.05$) for the different incubation times.

Histological studies

Cell proliferation increased with the time of *in vitro* culture. Thus, at 7 days, with H&E staining we observed that there were some cells [Fig. 5(A)]; at 14 days [Fig. 5(B)], an important increase in the number of cells was observed, and at 21 days [Fig. 5(C)], cell numbers increased, but less markedly so. At 28 days of culture, we observed cell necrosis

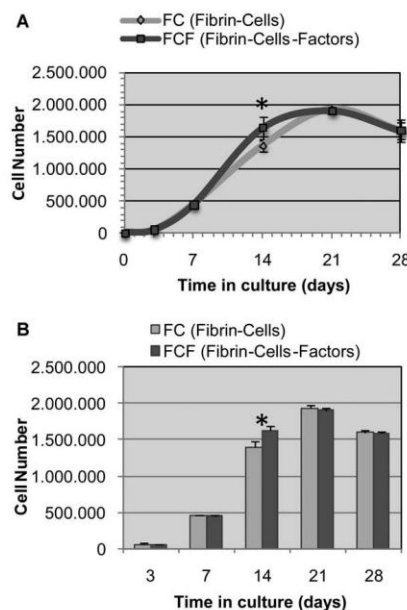


FIGURE 4. (A) Proliferation of porcine dermal fibroblasts ($n = 6$) and (B) Alamar Blue assay ($n = 12$) of the proliferation in the FC and FCF scaffolds along 28 days in culture. The incubation time with Alamar Blue for the scaffolds was 6 h. All values are means \pm SD. (*significant differences, $p < 0.05$).

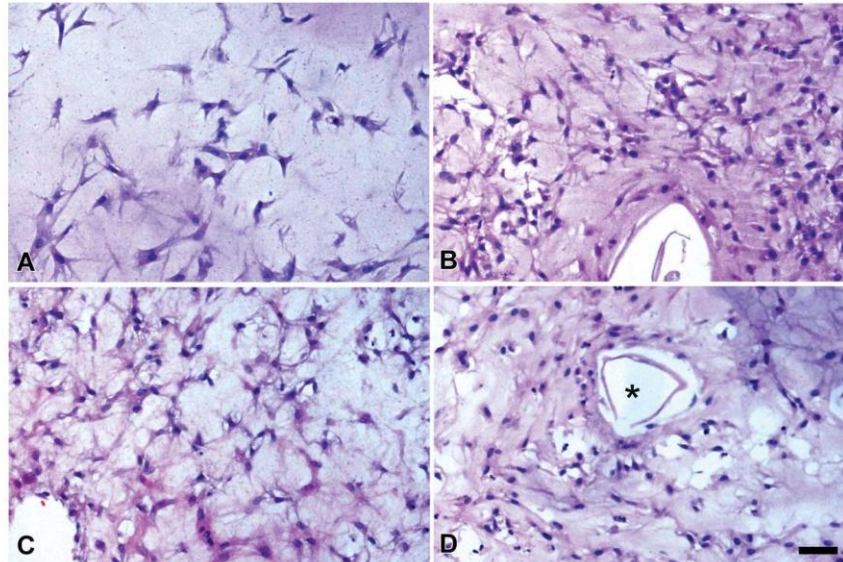


FIGURE 5. H&E staining of autologous fibrin scaffolds at 7 days (A), 14 days (B), 21 days (C), and 28 days (D) of culture. Note the morphology of the alginate microcapsules and their incorporation into the scaffold (*). Scale bar: 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

focused in some zones of the scaffold [Fig. 5(D)]. The cell distribution within the scaffold was homogeneous at the different times, and we noted the incorporation of the alginate microcapsules into the scaffold [Fig. 5(D)].

In Masson Trichrome Goldner stain, we detected the cellular production of collagen fibers, with an evidently greater presence in the FC than in the FCF scaffolds at 14 days of culture *in vitro* [Fig. 6(A,B)].

Immunohistochemistry

SMA staining revealed an important decrease in actin expression in the FCF scaffolds when compared with the FC scaffolds [Fig. 6(C,D)], and KI-67 staining revealed a clear difference in the proliferative state of the cells; the number of active cells was more marked in the FCF scaffolds [Fig. 6(E,F)] at 14 days in culture.

DISCUSSION

Tissue engineering consists of a process in which growth factors and cells are embedded in a scaffold for *in vitro* culture, after which the scaffold is implanted in the patients. An ideal biomaterial should be biocompatible and should have appropriate surface properties to favor cell attachment and proliferation.

When used as sealants or glues, commercial fibrins are expected to have a high tensile and adhesion strength; these

mechanical properties being a function of high fibrinogen concentrations. By contrast, tensile strength was not essential for our study because we were only seeking an ideal structure for cell growth, in which a low fibrinogen concentration is crucial.

Some authors have used autologous fibrin in which the fibrinogen was isolated from blood using centrifugation in combination with cryoprecipitation or other chemical methods to concentrate it.¹¹⁻¹³ When we developed our AFS, we used plasma that had not been subjected to concentrating methods.

Our AFS is readily available, easy to process, and totally autologous. Thus, there is no risk of viral transmission. It is made from autologous plasma, which contains some molecules that help cellular adhesion, such as fibronectin, and it is a reservoir for growth factors, platelets, cytokines, and enzymes, which can promote fibroblast proliferation and stimulate and accelerate tissue healing.¹⁴⁻¹⁶

The three-dimensional structure of AFS comprises a network of interconnecting pores, such that cells can migrate, multiply, and spread throughout the scaffold [Fig. 3]. Fibrinogen is the most important factor as regards the porous structure. It has been reported that a low-fibrinogen concentration (physiological concentrations) provides a suitable matrix for cell migration and differentiation, characterized by a network of thick fibers that generate a dense

ORIGINAL ARTICLE

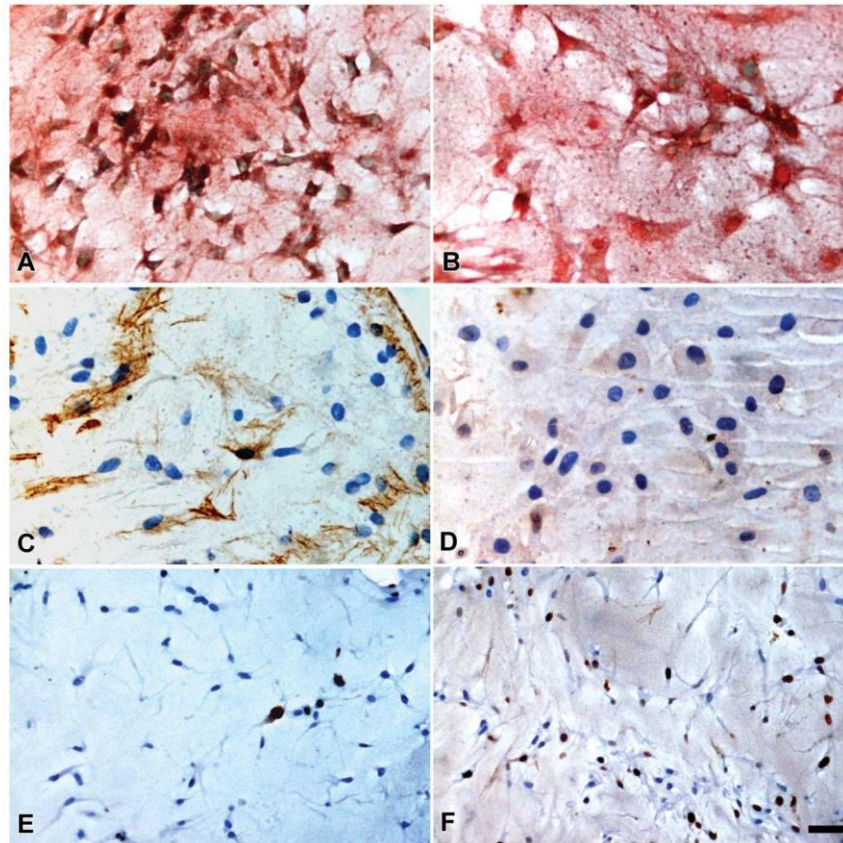


FIGURE 6. Masson Trichrome Goldner stain (A, B), immunohistochemistry of MSA (C, D), and KI-67 (E, F) of the FC (A,C,E) and the FCF scaffolds (B,D,F) at 14 days of culture. Scale bar: 25 μ m (A-D) and 50 μ m (E-F).

structure.¹⁶⁻¹⁹ Our autologous fibrin was seen to have a fibrinogen concentration of 2-3.5 mg/mL, ensuring a good incorporation, adherence, and proliferation of DFs.

The DFs showed an important degree of exponential growth in the first 21 days of culture. On day 21, the scaffold was totally occupied by cells; this leading to the emergence of foci of necrosis by day 28 because the cell concentration exceeded the capacity of the scaffold. Thus, the number of viable cells finally decreased and growth ceased.

Autologous porcine DFs are an attractive cell type for use in tissue engineering because of their simple handling, ready accessibility, and good proliferation features. Furthermore, a strong response to the stimulatory effects of hetero-

topic fibroblasts on epithelial cell migration, proliferation, and differentiation has been reported.²⁰

bFGF has different angiogenic and mitogenic properties. It stimulates the proliferation and differentiation of endothelial cells, fibroblasts, and many other cell types.^{21,22} Although only very small quantities of growth factors are necessary to generate a cellular response, these are rapidly degraded, such that the use of polymeric vehicles (such as microspheres) to achieve a controlled release that will increase the therapeutic efficacy of these growth factors is highly desirable.^{21,23,24}

The bFGF microcapsules in the AFS scaffold resulted in an increase in cell proliferation and KI-67 expression and a

decrease in collagen fiber production, and actin and MSA expression at 14 days in culture. Hypothetically, the latter may represent symptoms of a dedifferentiation of the DFs cultured in a bFGF-rich environment.^{25,26}

This time-frame (14 days) is critical from a clinical point of view because it is the moment in the tissue repair process when the formation of granulation tissues begins and when the acute inflammatory response starts to become chronic.

The ability to create an AFS with low-fibrinogen concentrations may open the use of fibrin as a scaffold for culturing cells and indirectly increase its use in many areas of tissue engineering, not only as a sealant or glue.

CONCLUSIONS

We have developed a biocompatible and implantable AFS, using autologous porcine plasma without fibrinogen concentration methods, as an alternative to commercial fibrin. These AFS were loaded with bFGF microspheres (with an optimal release time-frame from a clinical point of view) and DFs (which proved to have good cellular distribution, viability, adhesion, and proliferation). Further translational studies will be needed to clarify the definitive usefulness of this product in daily clinical practice.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff from the Laboratory of Microscopy of the University of León, Angustias Pérez a technician at the Pathology Services of University Hospital of Salamanca, Marta Regueiro at The School of Veterinary Sciences in León for her excellent care of the animals used in the study, and Eva M. Del Valle from the Chemical Engineering Department of the University of Salamanca for providing the alginate microspheres for our study.

REFERENCES

1. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Trans IChemE Part A Chem Eng Res Des* 2007;85:1051-1064.
2. Li Z, Ramay HR, Hauch HD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26:3919-3928.
3. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14: 199-215.
4. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg* 2001;182:15-75.
5. Silver FH, Wang MC, Pins GD. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials* 1995;16:891-903.
6. Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28:5298-5306.
7. Herrero EP, Del Valle EM, Galán MA. Development of a new technology for the production of microcapsules based in atomization processes. *Chem Eng J* 2006;117:137-142.
8. Del Valle EM, Galán MA, Herrero EP. System for producing microcapsules and use thereof. *Eur Pat EP101533198*, 2010.
9. Nieto A, Areva S, Wilson T, Viitala R, Vallet-Regi M. Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomater* 2009;5:3478-3487.
10. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 1997;204:205-208.
11. Reiss RF, Oz MC. Autologous fibrin glue: Production and clinical use. *Transfus Med Rev* 1996;10:85-92.
12. Alston SM, Solen KA, Sukavaneshvar S, Mohammad SF. New method to prepare autologous fibrin glue on demand. *Transl Res* 2007;149:187-195.
13. Buchta C, Hedrich HC, Macher M, Höcker P, Redl H. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal® and Vivostat® in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissuoco/Tisseel. *Biomaterials* 2005;26:6233-6241.
14. Clark RA. Fibrin is a much splendored thing. *J Invest Dermatol* 2003;121:xxi-xxii.
15. Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu Bm. The behaviour of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: Dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 2006;12:1587-1595.
16. Yang YI, Seol DL, Kim HI, Cho MH, Lee SJ. Composite fibrin and collagen scaffold to enhance tissue regeneration and angiogenesis. *Curr Appl Phys* 2007;7S1:e103-e107.
17. Cox S, Cole M, Tawil B. Behaviour of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: Dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng* 2004;10:942-954.
18. Vavken P, Joshi SM, Murray MM. Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis. *The Knee* 2011;18:42-46.
19. Zhao H, Ma L, Zhou J, Mao Z, Gao C, Shen J. Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed Mater* 2008;3:015001.
20. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Nakamura T, Omori K. Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. *Tissue Eng* 2007;13:2175-2184.
21. Jeon O, Ryu SH, Chung JH, Kim BS. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. *J Control Release* 2005;105: 249-259.
22. Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* 2007;28:1123-1131.
23. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res* 2003;65A:489-497.
24. Chen RR, Mooney DJ. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm Res* 2003;20:1103-1112.
25. Akasaka Y, Ono I, Tominaga A, Ishikawa Y, Ito K, Suzuki T, Imaizumi R, Ishiguro S, Jimbow K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor in an artificial dermis promotes apoptosis and inhibits expression of α -smooth muscle actin, leading to reduction of wound contraction. *Wound Repair Regen* 2007;15:378-389.
26. Ishiguro S, Akasaka Y, Kiguchi H, Suzuki T, Imaizumi R, Ishikawa Y, Ito K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor induces down-regulation of α -smooth muscle actin and reduction of myofibroblasts areas in open skin wounds. *Wound Repair Regen* 2009;17:617-625.

6th
WORLD CONGRESS
ON TISSUE BANKING

20th
Congress of the European
Association of Tissue Banks

12º
Congreso de la Asociación
Española de Bancos de Tejidos

BARCELONA

2011
November, 9-10-11

ORAL
PRESENTATIONS


O-59

DIFFERENTIATION OF PORCINE DERMAL CELLS INSIDE AUTOLOGOUS FIBRIN SCAFFOLDS

*PUENTE, P.; LUDEÑA D.; LÓPEZ M.; RAMOS J.; ARANDA LUIS J.; VARELA G.; IGLESIAS J.
Tissue Bank San Francisco Clinic Foundation*

Abstract:

Mesenchymal stem cells (MSCs) are an ideal candidate cell type for tissue engineering and regenerative medicine. Our aim has been to evaluate multilineage potential of porcine dermal cells to differentiate inside autologous fibrin scaffolds. Fibrin scaffold provide a 3D structure for the cells to adhere, proliferate and differentiate. Porcine Dermal Cells have showed the ability of differentiation in vitro towards adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes inside autologous fibrin scaffolds. Oil Red O staining confirmed the presence of intracellular red lipid droplets in adipogenic differentiated cells, Von-Kossa staining showed an evident mineralization of the matrix with calcium deposits in osteoblasts differentiated cells and osteogenic marker osteopontin was detected, and Alcian Blue staining revealed mucopolysaccharides synthesized and immunohistochemistry of collagen type II evidenced the production of collagen fibers by chondrogenic differentiated cells. In approximately a month we have been able to obtained differentiated cells in a 3D scaffold, which it is totally autologous, biocompatible and implantable. Autologous fibrin scaffolds represent a suitable structure for cell growth and tri-lineage mesenchymal differentiation, suggesting that fibrin scaffolds may be useful for tissue engineering.



6th
WORLD CONGRESS
ON TISSUE BANKING

20th
Congress of the European
Association of Tissue Banks

12º
Congreso de la Asociación
Española de Bancos de Tejidos


Barcelona, 9th November 2011


The Scientific Committee of the 6th World Congress on Tissue Banking; the 20th Congress of the European Association of Tissue Banks & the 12^º Congreso de la Asociación Española de Banco de Tejidos held in Barcelona November 9-11, 2011


CERTIFIES THAT:


the following oral paper has been accepted and presented in the congress

Differentiation of porcine dermal cells inside autologous fibrin scaffolds
Puente , P.; Ludeña D.; López M.; Ramos J.; Aranda Luis J.; Varela G.; Iglesias J.
Tissue Bank San Francisco Clinic Foundation


E. Trias
President EATB
Co President Organising Committee


D. Fehily
President of the Scientific Committee


JM. Segur
President AEBT
Co President Organising Committee

**BARCELONA**
November 9-11-11

8.



Anexos

8. ANEXOS

Listado de material

Producto	Casa Comercial	Referencia
Ácido Ascórbico	Biomedica	A-4544
Ácido Tranexámico (Amchafibrin® 500mg)	Rottapharm	936708.4
Agua destilada 1L	Braun	387875
Agujas 0,9mmx25mm	BD Microlance	304827
AlamarBlue®	AbDSerotec	BUF012B
Alcohol isopropílico	Sigma Aldrich	I9030
Alcohol 96°	Noriega	321471.1
Alginato sódico	Sigma Aldrich	W201502
Amphotericina β	Sigma Aldrich	A9528
Atropina	Braun	-
Asas de siembra	Copan	8177CS10H
Azul Alcían 8GX	Sigma Aldrich	A3157
Azul Tripán 0,4%	Sigma Aldrich	T8154
Bond Polymer Refine detection®	Visio BioSystem	DS9800
Betadine	Mundipharma	-
Bupivacaina	Richmond VetPharma	-
BSA	PAA	K41-001
Cámara Neubauer	Paul Marienfeld GMBH & Co	-
Cassete histología	Deltalab	554143
Catalasa	Sigma Aldrich	CAT-100
Cloruro Cálcico	Braun	635656
Cloruro Cálcico	Scharlau	CA01951000
Cobactan®	Intervet	SAGARPA:Q-0273-127
Colagenasa tipo I	Sigma Aldrich	CO130
Colistimetato 1MUI	GES	838185.2
Criovial 1ml	Nunc	366656
Cubreobjetos 24x60mm	Menzel-Glaser	AC1575
Desinpov	Dismedical	170-201
Dexametasona	Sigma Aldrich	D4902
DMEM	PAA	E15-005
DMSO	Sigma Aldrich	D2650
Dormicum® (Midazolam)	Rochefarma	-
Durogesic® (parche transdérmico fentanilo)	Janssen-Cilag	-
DPX	Sigma Aldrich	44581
Eosina	Merck	1024392500
Eppendorf 2ml	Labbox	PCRP-020-500
Eppendorf 1,5ml	Labbox	PCRP-015-500
Eppendorf 0,5ml	Labbox	PCRP-005-1K0
Etanol 96°	Panreac	121085.1211
Etanol Absoluto	Panreac	121086.1211
Etanol Absoluto	Merck	1009836025
Falcon 15ml	Labbox	CTGP-E15-050

Producto	Casa Comercial	Referencia
Falcon 50ml	Labbox	CTGP-E50-050
bFGF	Sigma Aldrich	F0291
Filtros 1L: 0,22µm	Millipore	SCGPU10RE
Filtros 500ml: 0,22µm	Millipore	SCGPU05RE
Filtros 250ml: 0,22µm	Millipore	SCGPU02RE
Filtros 150ml: 0,22µm	Millipore	SCGPU01RE
Filtros 50ml: 0,22µm	Millipore	SCGP00525
Filtros jeringa 33mm: 0,22µm	Millipore	SLGP033RS
Formaldehido 4%	Panreac	252931.1211
Formaldehido	Merck	104001
Frascos T-25	BD Falcon	353108
Frascos T-75	BD Falcon	353135
Frascos T-175	BD Falcon	353112
Furacin®	Seid	-
β- Glicerolfosfato	Sigma Aldrich	G9891
L-Glutamina (200mM)	PAA	M11-004
Glutaraldehido	Sigma Aldrich	G5882
Gram (Kit de tinción)	Sigma Aldrich	HT90A-1KT
HAM'S F12	PAA	E15-016
Hematoxilina	Merck	1051752500
Hematoxilina Gill nº 2	Sigma Aldrich	GHS216
Hisopos AMIES	Copan	108C.USE
Histofix	Panreac	256462
Hojas bisturí Nº 10	Braun	BB510
Hojas bisturí Nº 22	Braun	BB522
Imalgene® (Ketamina)	Merial	Imalgene® 1000
Indometacina	Sigma Aldrich	I7378
Insulina	Sigma Aldrich	I9278
Isobutilmetaxantina	Sigma Aldrich	I7018
Isoflo® (Isoflurano)	Dr.Esteve	-
Jeringa 10ml	Braun	4606108V
Jeringa 50ml	Tyco	1100-660305
Metanol 98%	Sigma Aldrich	534013
Midazolam (Dormicum®)	Rochefarma	-
Mr. Frosty	Nalgene	C1562
Nuclear Fast Red	Sigma Aldrich	N3020
Oil-Red-O	Sigma Aldrich	O0625
Orceína	IHC-NovoUltra	IW3018
Parafilm	Pechiney	PM-966
Parafina (Histosec Pastillas)	Merck	1151619025
Pastorex-Staph Plus (Test Coagulasa)	Biorad	56356
PBS (1X)	PAA	H15-002
PBS	Sigma Aldrich	P3813
Penicilina/Estreptomina 100X	PAA	P11-010
Pipeta serológica 1ml	BD Falcon	357520

Producto	Casa Comercial	Referencia
Pipeta serológica 5ml	BD Falcon	357543
Pipeta serológica 10ml	BD Falcon	357551
Pipeta serológica 25ml	BD Falcon	357525
Placa Columbia Agar Sangre 5%	DIFCO	770418
Placa Columbia CNA Agar Sangre 5%	DIFCO	770228
Placa MacConkey Agar	DIFCO	770267
Placas multipocillo 6	BD Falcon	353046
Placas multipocillo 12	BD Falcon	353043
Placas multipocillo 24	BD Falcon	353047
Placas multipocillo 48	BD Falcon	353078
Placas multipocillo 96	BD Falcon	353072
Placas multipocillo 96 sin tapa	Nunc	256510
Placas Petri 96mm	Deltalab	200200
Portaobjetos	Leica Microsystem	-
Povidona Iodada 10%	Yodicura	0191809
Propanodiol	Sigma Aldrich	13,436-8
Propofol® (Propovet)	Abbot	-
Puntas 0,5-10µl sin filtro	Labbox	TIPP-011-1KO
Puntas 2-200µl sin filtro	Labbox	TIPP-200-1KO
Puntas 100-1000µl sin filtro	Labbox	TIPP-1K1-1KO
Puntas 0,5-10µl con filtro	Eppendorf	0030 000 811
Puntas 2-200µl con filtro	Cmb Bioline	871422LB
Puntas 100-1000µl con filtro	Biopointe	361-4050
Rodamina B isotiocianato	Sigma Aldrich	R1755
Rojo Alizarina	Sigma Aldrich	A5533
Seda 0	Lorca Marin	55483
Soltrim	Almofarma	656754.8
Suero Bovino Fetal	Linus	S01805
Suero Fisiológico 10ml	Braun	641860.4
Suero Fisiológico 250ml	Braun	3570380
ThinPrep®	Cytoy Corporation	70303-001
Tioglicolato	MAIM	2063
TGF-β	Sigma Aldrich	L3408
Tissue-Tek OCT®	Sakura	4583
Tracrium®	Wellcome Farmacéutica	-
Tricómico de Masson	Bio-Optica	04-011802
Tripsina/EDTA 0,05/0,02%	PAA	L11-003
Tris -buffer	Sigma Aldrich	93374
Trobamicina 1mg/ml	Braun	600551
Tubos de sangre 9NC	BD Vacutainer	367704
T-61	Intervet	-
Urinocultivos	Soria Genlab	FRM100EU
Vancomicina	Normon	618694.7
Vicryl 4/0 (Ác poliglicólico)	Ethicon	VCP496

Producto	Casa Comercial	Referencia
Von -Kossa	Polysciences Inc	24633-1
VEGF	Sigma Aldrich	V7259
Xilol	Merck	8187549025

9.



Bibliografía

9. BIBLIOGRAFÍA

1. de la Puente P, Ludeña D, Fernández A, Aranda JL, Varela G, Iglesias J. Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. **J Biomed Mater Res A** 2011; 99: 648-54.
2. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Eng** 2001; 7: 679-89.
3. Klin B, Weinberg M, Vinograd I, Sandbank J, Siman-Tov Y, Astachov L, Ayalon O, Rochkind S, Shahar A, Nevo Z. Experimental repair of tracheal defects using a new biodegradable membrane. **J Laparoendosc Adv Surg Tech** 2007; 17: 342-9.
4. Walles T, Giere B, Hofmann M, Schanz J, Hofmann F, Mertsching H, Macchiarini P. Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2004; 128: 900-6.
5. Macedo A, Fadel E, Mazmanian GM, Montpréville V, German-Fattal M, Mussot S, Chapelier A, Darteville PG. Heterotopic en bloc tracheobronchial transplantation with direct revascularization in pigs. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2004; 127: 1593-601.
6. Olmos R, Eguiza V, Jasso R, Sotres A, Gaxiola M, Santibañez JA, Baltazares M, Santillán P, Villalba J. Trasplante experimental de tráquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos. **Rev Inst Nal Enf Resp Mex** 2006; 19: 172-179.
7. Delaere PR, Liu ZY, Hermans R, Sciot R, Feenstra L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1995; 110: 728-37.
8. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Trans IChemE, Part A, Chem Eng Res Design** 2007; 85: 1051-64.
9. Li Z, Ramay HR, Hauch HD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials** 2005; 26: 3919-28.
10. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. **Tissue Eng Part B Rev** 2008; 14: 199-215.
11. Ng KW, Khor HL, Hutmacher DW. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. **Biomaterials** 2004; 25: 2807-18.
12. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater** 2004; 71B: 343-354.

13. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. **Biomaterials** 2004; 25: 2997-3004.
14. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, Messmer BJ, Turina M. Fibrin gel-advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. **Eur J Cardithorac Surg** 2001; 19: 424-430.
15. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. **J Cell Physiol** 2005; 203: 465-470.
16. Anderson JM. Biological responses to materials. **Annu Rev Mater Res** 2001; 31: 81-110.
17. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin polymerization and functions. **Blood Coagul Fibrinolysis** 1999; 10 Suppl 1: S45-8.
18. Lauricella AM. Fibrin network variability. **Acta Bioquim Clin Latinoam** 2007; 41: 7-19.
19. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. **Adv Protein Chem** 2005; 70:247-99.
20. Erickson HP, Fowler WE. Electron microscopy of fibrinogen, its plasmonic fragments and small polymers. **Ann N Y Acad Sci** 1983; 408: 146-63.
21. Weisel JW, Stauffacher CV, Bullitt E, Cohen C. A model for fibrinogen: domains and sequence. **Science** 1985; 230: 1388-91.
22. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. **Biochemistry** 1996; 35: 10448-53.
23. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 1894-904.
24. Clark RA. Fibrin is a many splendored thing. **J Invest Dermatol** 2003; 121: xxi-xxii.
25. Henschen A, McDonagh J. **Blood Coagulation**. 1986. Amsterdam. Elsevier. p. 171
26. Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. **J Thromb Haemost** 2007; 5: 116-24.
27. Makogonenko E, Tsurupa G, Ingham K, Medved L. Interaction of fibrin (ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site. **Biochemistry** 2002; 41: 7907-13.
28. Preissner KT, Jenne D. Vitronectin: a new molecular connection in haemostasis. **Thromb Haemost** 1991; 66: 189-94.

29. Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. **J Cell Sci** 1997; 110: 861-70.
30. Bergel S. Über wirkungen des fibrins. **Dtsch Med Wochenschr** 1909; 35: 633.
31. Cronkite EP, Lozner EL, Deaver JM. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. **JAMA** 1944; 124: 976-8.
32. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. **Am J Surg** 2001; 182: 1S-7S.
33. Kjaergard HK, Velada JL, Pedersen JH, Fleron H, Hollingsbee DA. Comparative kinetics of polymerization of three fibrin sealants and influence of timing of tissue adhesion. **Thromb Res** 2000; 98: 221-8.
34. Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? **Transfusion** 1990; 30: 741-7.
35. Tredwell SJ, Sawatzky B. The use of fibrin sealant to reduce blood loss during Cotrel-Dubouset instrumentation for idiopathic scoliosis. **Spine** 1990; 15: 913-5.
36. Berg PL, Barina W, Born P. Endoscopic injection of fibrin glue versus polidocanol in peptic ulcer hemorrhage: a pilot study. **Endoscopy** 1994; 26: 528-30.
37. McGill V, Kowal-Vern A, Lee M, Greenhalgh D, Gomperts E, Bray G, Gamelli R. Use of fibrin sealant in thermal injury. **J Burn Care Rehabil** 1997; 18: 429-34.
38. Silver FH, Wang MC, Pins GD. Preparation and use of fibrin glue in surgery. **Biomaterials** 1995; 16: 891-903.
39. Reiss RF, Oz MC. Autologous fibrin glue: production and clinical use. **Transfus Med Rev** 1996; 10: 85-92.
40. Alston SM, Solen KA, Sukavaneshvar S, Mohammad SF. New method to prepare autologous fibrin glue on demand. **Transl Res** 2007; 149: 187-195.
41. Jackson MR, MacPhee MJ, Drohan WN, Alving BM. Fibrin sealant: current and potential clinical applications. **Blood Coagul Fibrinolysis** 1996; 10: 737-46.
42. Briganti E, Spiller D, Mirtelli C, Kull S, Counoupas C, Losi P, Senesi S, Di Stefano R, Soldani G. A composite fibrin-based scaffold for controlled delivery of bioactive pro-angiogenic growth factors. **J Control Release** 2010; 142: 14-21.
43. Zisch AH, Schenk U, Schense JC, Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Covalently conjugated VEGF-fibrin matrices for endothelialization. **J Control Release** 2001; 72: 101-13.

44. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. **Biomaterials** 2003; 24: 2497-502.
45. Barsotti MC, Magera A, Armani C, Chiellini F, Felice F, Dinucci D, Piras AM, Minnocci A, Solaro R, Soldani G, Balbarini A, Di Stefano R. Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. **Cell Prolif** 2011; 44: 33-48.
46. Cho SW, Kim SS, Rhie JW, Cho HM, Choi CY, Kim BS. Engineering of volume-stable adipose tissue. **Biomaterials** 2005; 26: 3577-85.
47. Borges J, Mueller MC, PAdron NT, Tegtmeier F, Lang EM, Stark GB. Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels. **Tissue Eng** 2003; 9: 1263-70.
48. Le Nihouannen D, Le Guehennec L, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, Daculsi G. Microarchitecture of calcium granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. **Biomaterials** 2006; 27: 2716-22.
49. Peled E, Boss J, Bejar J, Zinman C, Seliktar D. A novel poly (ethylene glycol)-fibrinogen hydrogel for tibial segmental defect repair in rat model. **J Biomed Mater Res A** 2007; 80: 874-84.
50. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, Messmer BJ, Turina M. Fibrin gel-advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. **Eur J Cardiothorac Surg** 2001; 19: 424-30.
51. Birla RK, Borschel GH, Dennis RG, Brown DL. Myocardial engineering in vivo: formation and characterization of contractile, vascularized three-dimensional cardiac tissue. **Tissue Eng** 2005; 11: 803-13.
52. Ahmed TA, Griffith M, Hincke M, Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. **Tissue Eng** 2007; 13: 1469-77.
53. Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. **Biomaterials** 2007; 28: 55-65.
54. Rowe SL, Lee S, Stegemann JP. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. **Acta Biomater** 2007; 3: 59-67.
55. Huang YC, Dennis RG, Larkin L, Baar K. Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels. **J Appl Physiol** 2005; 98: 706-13.

56. Sakiyama SE, Schense JC, Hubbell JA. Incorporation of heparin-binding peptide into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. **FASEB J** 1999; 13: 2214-24.
57. Willerth SM, Arendas KJ, Gottlieb DI, Sakiyama-Elbert SE. Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. **Biomaterials** 2006; 27: 5990-6003.
58. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using fibrin-agarose scaffold. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006; 47: 3311-7.
59. Han B, Schwab IR, Madsen TK, Isseroff RR. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. **Cornea** 2002; 21: 505-10.
60. Geer DJ, Swartz DD, Andreadis ST. Fibrin promotes in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration. **Tissue Eng** 2002; 8: 787-98.
61. Hankemeier S, van Griensven M, Ezechieli M, Barkhausen T, Austin M, Jagodzinski M, Meller R, Bosch U, Krettek C, Zeichen J. Tissue engineering of tendons and ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix in immunodeficient rats: results of a histologic study. **Arch Orthop Trauma Surg** 2007; 127: 815-21.
62. Cummings CL, Gawlitta D, Nerem RM, Stegemann JP. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. **Biomaterials** 2004; 25: 3699-706.
63. Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Res Rev** 2011; 10: 93-103.
64. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells** 2007; 25: 2739-49.
65. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem** 2006; 98 :1076-84.
66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy** 2006; 8: 315-7.
67. Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. **Biol Reprod** 2006; 74: 46-57.

68. Comite P, Cobianchi L, Avanzini MA, Zonta S, Mantelli M, Achille V, De Martino M, Cansolino L, Ferrari C, Alessiani M, Maccario R, Gandolfo GM, Dionigi P, Locatelli F, Bernardo ME. Isolation and ex vivo expansion of bone marrow-derived porcine mesenchymal stromal cells: potential for application in an experimental model of solid organ transplantation in large animals. **Transplant Proc** 2010; 42: 1341-3.
69. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittinger M. Porcine mesenchymal stem cells: Induction of distinct mesenchymal cell lineages. **Cell Tissue Res** 2002; 307: 321-7.
70. Rho GJ, Kumar BM, Balasubramanian SS. Porcine mesenchymal stem cells—current technological status and future perspective. **Front Biosci** 2009; 1: 3942-61.
71. Wilschut K, Jaksani S, van Den Dolder J, Haagsman HP, Roelen BA. Isolation and characterization of porcine adult muscle-derived progenitor cells. **J Cell Biochem** 2008; 105: 1228-39.
72. Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 316: 651-8.
73. Chunmeng S and Tianmin C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. **Med Hypotheses** 2004; 62: 683-8.
74. Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T. Stem cells and their applications in skin cell therapy. **Trends Biotechnol** 2006; 24: 48-52.
75. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat Cell Biol** 2001; 3: 778-84.
76. Barstch G, Yoo JJ, De Coppi P, Siddiqui MM, Schuch G, Pohl HG, Fuhr J, Perin L, Soker S, Atala A. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. **Stem Cells Dev** 2005; 14: 337-38.
77. Toma J, Akhavan M, Fernandes K, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan D, Miller F. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat Cell Biol** 2001; 3: 778-84.
78. Chunmeng S and Tianmin C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. **Med Hypotheses** 2004; 62: 683-8.
79. Chunmeng S, Ying Z, Yongping S, Tianmin C. Stem cells and their applications in skin cell therapy. **Trends Biotechnol** 2006; 24: 48-52.

80. Chen FG, Zhang WJ, Bi D, Liu W, Wei x, Chen FF, Zhu L, Cui L, Cao Y. Clonal analysis of nestin- vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. **J of Cell Science** 2007; 120: 2875-83.
81. Sellheyer K and Krahl D. Cutaneous mesenchymal stem cells: status of current knowledge, implications for dermatopathology. **J Cutan Pathol** 2010; 37: 624-34.
82. Lee DY, Lee JH, Yang JM, Lee ES, Park KH, Mun GH. A new dermal equivalent: the use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials. **J Dermatol Sci** 2006; 43: 95-104.
83. Liu W, Chen B, Deng D, Xu F, Cui L, Cao Y. Repair of tendon defect with dermal fibroblast engineered tendon in a porcine model. **Tissue Eng** 2006; 12: 775-88.
84. Zhang YQ, Zhang WJ, Liu W, Hu XJ, Zhou GD, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of corneal stromal layer with dermal fibroblasts: Phenotypic and functional switch of differentiated cells in cornea. **Tissue Eng Part A** 2008; 14: 295-303.
85. Cox S, Cole M, Tawil B. Behaviour of human dermal fibroblasts in three dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. **Tissue Eng** 2004; 10: 942-54.
86. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. **Tissue Eng** 2003; 9: 55-15.
87. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature** 2000; 407: 242-8.
88. Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. **Biomaterials** 2007; 28: 1123-31.
89. Chen RR, Silva EA, Yuen WW, Mooney DJ. Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation. **Pharm Res** 2007; 24: 258-64.
90. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. **Nat Biotechnol** 2001; 19: 1029-34.
91. Edelman ER, Nugent MA, Karnovsky MJ. Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90: 1513-7.

92. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta SE, Epstein SE, Unger EF. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial responds to injury. **Circulation** 1996; 94: 1074-82.
93. Chen RR, Mooney DJ. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. **Pharm Res** 2003; 20: 1103-12.
94. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. **J Biomed Mater Res** 2003; 65A: 489-97.
95. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. **J Clin Invest** 1999; 103: 157-8.
96. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 161: 851-8.
97. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol** 1995; 146: 1029-39.
98. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. **J Biol Chem** 1995; 270: 12607-13.
99. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. **J Neurosurg** 1995; 82: 864-73.
100. Finklestein SP, Apostolides PJ, Caday CG, Prosser J, Philips MF, Klagsbrun M. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. **Brain Res** 1988; 460: 253-9.
101. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. **Science** 1987; 235: 442-7.
102. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **J Cell Biol** 1998; 141: 1659-73.

103. Mondrinos MJ, Koutzaki SH, Poblete HM, Crisanti MC, Lelkes PI, Finck CM. In vivo pulmonary tissue engineering: contribution of donor-derived endothelial cells to construct vascularization. **Tissue Eng Part A** 2008; 14: 361-8.
104. Sun XT, Ding YT, Yan XG, Wu LY, Li Q, Cheng N, Qiu YD, Zhang MY. Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an in vitro quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. **World J Gastroenterol** 2004; 10: 2524-8.
105. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. **Circulation** 1995; 92: 365-71.
106. Jay SM, Saltzman WM. Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic crosslinking. **J Control Release** 2009; 134: 26-34.
107. Freeman I, Cohen S. The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. **Biomaterials** 2009; 30: 2122-31.
108. Tanihara M, Suzuki Y, Yamamoto E, Noguchi A, Mizushima Y. Sustained release of basic fibroblast growth factor and angiogenesis in a novel covalently crosslinked gel of heparin and alginate. **J Biomed Mater Res** 2001; 56A: 216-21.
109. Orive G, Castro M, Kong HJ, Hernández RM, Ponce S, Mooney DJ, Pedraz JL. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. **J Control Release** 2009; 135: 203-10.
110. Stanford ECC. New substance obtained from some of the commoner species of marine algae. **Algin Chem News** 1883; 47: 254-69.
111. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Lett** 1973; 32: 195-8.
112. Smidsrod O, Draget KI. Alginates: chemistry and physical properties. **Carbohydr Eur** 1996; 14: 6-13.
113. Bishop AE, Polak JM. *Lungs. Principles of Tissue Engineering*. 2007. 3ª edición. Elsevier. Capítulo 74: 1125-1133.
114. Macchiarini P, Wallis T, Biancosino C, Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2004; 128: 638-41.
115. Junqueira, L.C. & Carneiro J. **Histología básica, texto y atlas**. 2005. 6ª edición. Barcelona. Editorial Masson.

116. Lois M, Noppen M. Bronchopleural Fistulas: An overview of the problem with special focus on endoscopic management. **Chest** 2005; 128: 3955-65.
117. Rocco G, La Rocca A, De Rosa V, Accardo R. The use of a bone substitute composite in the management of a post-pneumonectomy bronchopleural fistula. **Eur J Cardiothorac Surg** 2009; 36: 415-6.
118. Shekar K, Foot C, Fraser J, Ziegenfuss M, Hopkins P, Windsor M. Bronchopleural fistula: An update for intensivists. **J Crit Care** 2010; 25: 47-55.
119. Sirbu H, Busch T, Aleksic I, Schreiner W, Oster O, Dalichau H. Bronchopleural fistula in the surgery of non-small cell lung cancer: incidence, risk factors, and management. **Ann Thorac Cardiovasc Surg** 2001; 7: 330-6.
120. Wright CD, Wain JC, Mathisen DJ, Grillo HC. Postpneumonectomy bronchopleural fistula after sutured bronchial closure: incidence, risk factors, and management. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1996; 112: 1367-71.
121. Cerfolio RJ. The incidence, etiology and prevention of postresectional bronchopleural fistula. **Semin Thorac Cardiovasc Surg** 2001; 13: 3-7.
122. Novoa N, Aranda JL, Jiménez MF, Varela G. Utilidad de la transposición muscular en el cierre de la fístula broncopleural postneumonectomía y de la toracostomía en un único tiempo quirúrgico. **Cir Cardiovasc** 2008; 15: 153-58.
123. Hollaus PH, Lax F, el-Nashef BB, Hauck HH, Lucciarini P, Pridun NS. Natural history of bronchopleural fistula after pneumonectomy: a review of 96 cases. **Ann Thorac Surg** 1997; 63: 1391-6.
124. Algar FJ, Álvarez A, Aranda JL, Salvatierra A, Baamonde C, López-Pujol FJ. Prediction of early bronchopleural fistula after pneumonectomy: a multivariate analysis. **Ann Thorac Surg** 2001; 72: 1662-7.
125. Chae EJ, Seo JB, Kim SY, Do KH, Heo JN, Lee JS, Song KS, Song JW, Lim TH. Radiographic and CT findings of thoracic complications after pneumonectomy. **Radiographics** 2006; 26: 1449-68.
126. Sonobe M, Nakagawa M, Ichinose M, Ikegami N, Nagasawa M, Shindo T. Analysis of risk factors in bronchopleural fistula after pulmonary resection for primary lung cancer. **Eur J Cardiothorac Surg** 2000; 18: 519-23.
127. Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Horiike A, Ohyanagi F, Nishio M, Horai T, Ishikawa Y. Postoperative ischemic change in bronchial stumps after primary lung cancer resection. **Eur J Cardiothorac** 2006; 30: 172-6.
128. Darling GE, Abdurahman A, Yi QL, Johnston M, Waddell TK, Pierre A, Keshavjee S, Ginsberg R. Risk of a right pneumonectomy: role of bronchopleural fistula. **Ann Thorac Surg** 2005; 79: 433-7.

129. Varoli F, Roviario G, Grignani F, Vergani C, Maciocco M, Rebuffat C. Endoscopic treatment of bronchopleural fistulas. **Ann Thorac Surg** 1998; 65: 807-9.
130. Ridgway E, DeCamp M, Morris D. Bronchopleural fistula repair using combined breast parenchymal and pectoralis major musculocutaneous flap. **Ann Thorac Surg** 2008; 86: 1022-5.
131. Hirata T, Ogawa E, Takenaka K, Uwokawa R, Fujisawa I. Endobronchial closure of postoperative bronchopleural fistula using vascular occluding colis and n-butyl-2-cianocrylate. **Ann Thorac Surg** 2002; 74: 2174-6.
132. Wertz H, Wagner B, Hasse J, Lange W, Freudenberg N. Experimental gluing of the bronchial stump after pneumonectomy in rats. **Eur J Cardiothorac Surg** 1997; 12: 88-91.
133. Herget GW, Kassa M, Riede UN, Lu Y, Brethner L, Hasse J. Experimental use of an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive for sealing pulmonary parenchyma and bronchial anastomoses. **Eur J Cardiothorac Surg** 2001; 19: 4-9.
134. Fürst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. **Ann Thorac Surg** 2005; 79: 1522-8.
135. Tao H, Araki M, Sato T, Morino S, Kawanami R, Yoshitani M, Nakamura T. Bronchoscopic treatment of postneumonectomy bronchopleural fistula with a collagen screw plug. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2006; 132: 99-104.
136. Onotera RT, Unruh HW. Closure of a post-pneumonectomy bronchopleural fistula with fibrin sealant (Tisseel). **Thorax** 1988; 43: 1015-6.
137. Kjaergard HK, Weis-Fogh US, Sorensen H, Thiis J, Rygg I. Autologous fibrin glue-preparation and clinical use in thoracic surgery. **Eur J Cardiothorac Surg** 1992; 6: 52-4.
138. Deschamps C, Bernard A, Nichols FC, Allen MS, Miller DL, Trastek VF, Jenkins GD, Pairolero PC. Empyema and bronchopleural fistula after pneumonectomy: factors affecting incidence. **Ann Thorac Surg** 2001; 72: 243-8.
139. Leo F, Galetta D, Spaggiari L. The pleural and human fibrin glue sandwich: a quick and effective post-pneumonectomy bronchial stump coverage technique. **Am J Surg** 2008; 196: e35-7.
140. Sierra DH, Eberhardt AW, Lemons JE. Failure characteristics of multiple-component fibrin-based adhesives. **J Biomed Mater Res** 2002; 59: 1-11.
141. Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. **Biomaterials** 2007; 28: 5298-306.

142. Pokrywczynska M, Drewa T, Jundzill A, Lysik J. Alginate is not a good material for growth of rapidly proliferating cells. **Transplant Proc** 2008; 40: 1664-7.
143. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials** 1999; 20: 45-53.
144. Yang YI, Seol DL, Kim HI, Cho MH, Lee SJ. Composite fibrin and collagen scaffold to enhance tissue regeneration and angiogenesis. **Current Appl Physics** 2007; 7S1: e103-7.
145. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. **Tissue Eng** 2006; 12: 2385-96.
146. Zurita M, Aguayo C, Vaquero J. Usefulness of platelet-rich plasma as a scaffold for stromal cells in regenerative therapies of the Nervous System. **Trauma Fund Mapfre** 2011; 22: 38-46.
147. Wang M-C, Pins GD, Silver FH. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. **Materials science and engineering** 1995; C3: 131-5.
148. Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu Bm. The behaviour of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. **Tissue Eng** 2006; 12: 1587-1595.
149. Shiba Y, Yamada S, Kanno Y. Survival of 3T3-L1 cells induced by fibroblast growth factor depends on cell density and adhesion to the substratum. **Cell Struct Funct** 1989; 14: 473-83.
150. Gailit J, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW, Clark RA. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha(v)beta3. **Exp Cell Res** 1997; 232: 118-26.
151. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. **J Biomed Mater Res A** 2006; 77: 285-93.
152. Geer DJ, Andreadis ST. A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. **J Invest Dermatol** 2003; 121: 1210-6.
153. Zhao H, Ma L, Zhou J, Mao Z, Gao C, Shen J. Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. **Biomed Mater** 2008; 3: 015001.

154. Vavken P, Joshi SM, Murray MM. Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis. **The Knee** 2011; 18: 42-46.
155. Jeon O, Ryu S, Chung JH, Kim BS. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. **J Control Release** 2005; 105: 249-59.
156. Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. **Blood** 2000; 96: 3772-8.
157. Sahni A, Odrliin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. **J Biol Chem** 1998; 273: 7554-9.
158. Morimoto N, Saso Y, Tomihata K, Taira T, Takahashi Y, Ohta M, Suzuki S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. **J Surg Res** 2005; 125: 56-67.
159. Ramos C, Becerril C, Cisneros-Lira JG, Montaña M. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. **Rev Inst Natl Enf Resp Mex** 2004; 17: 215-31.
160. Okano W, Nomoto Y, Wada I, Kobayashi K, Miyake M, Nakamura T, Omori K. Bioengineered trachea with fibroblasts in a rabbit model. **Ann Otol Rhinol Laryngol** 2009; 118: 796-804.
161. Inoue H, Oshima H, Matsuzaki K, Kumagai N. Application for regenerative medicine of epithelial cell culture-vistas of cultured epithelium. **Congenit Anom (Kyoto)** 2006; 46: 129-34.
162. Pfenninger C, Leinhase I, Endres M, Rotter N, Loch A, Ringe J, Sittinger M. Tracheal remodeling: comparison of different composite cultures consisting of human respiratory epithelial cells and human chondrocytes. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 2007; 43: 28-36.
163. Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K. Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. **Tissue Eng** 2006; 12: 2619-28.
164. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Nakamura T, Omori K. Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. **Tissue Eng** 2007; 13: 2175-84.
165. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta Biomater** 2011; 2: 463-77.
166. Willerth SM, Rader A, Sakiyama-Elbert SE. The effect of controlled growth factor delivery on embryonic stem cell differentiation inside fibrin scaffolds. **Stem Cell Res** 2008; 1: 205-18.

167. Mandal BB, Kundu SC. Osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow cells on non-mulberry and mulberry silk gland fibroin scaffolds. **Biomaterials** 2009; 30: 5019-30.
168. Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, Pérez-Bouza A, Neuss S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodeling in three-dimensional collagen scaffolds. **Biomaterials** 2010; 31: 467-80.
169. Rentsch C, Rentsch B, Breier A, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, Biewener A, Zwipp H. Evaluation of the osteogenic potential and vascularization of 3D poly(3)hydroxybutyrate scaffolds subcutaneously implanted in nude rats. **J Biomed Mater Res** 2010; 92A: 185-95.
170. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, Kadosawa T, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet culture system. **Exp Hematol** 2004; 32: 502-9.
171. Im G-I. Chondrogenesis from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue on the fibrin scaffold. **Current Appl Physics** 2005; 5: 438-43.
172. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds. **Biomaterials** 2004; 25: 3211-22.
173. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, Takakura Y. Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. **Biomaterials** 2005; 26: 4654-61.
174. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J Immunol Methods** 1997; 204: 205-8.
175. White MJ, DiCaprio MJ, Greenberg DA. Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. **J Neurosci Methods** 1996; 70: 195-200.
176. Chen QZ, Ishii H, Thouas GA, Lyon AR, Wright JS, Blaker JJ, Chrzanowski W, Boccaccini AR, Ali NN, Knowles JC, Harding SE. An elastomeric patch derived from poly(glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart. **Biomaterials** 2010; 31: 3885-93.
177. Salerno A, Guarnieri D, Iannone M, Zeppetelli S, Di Maio E, Iannace S, Netti PA. Engineered mu-bimodal poly(epsilon-caprolactone) porous scaffold for enhanced hMSC colonization and proliferation. **Acta Biomater** 2009; 5: 1082-93.

178. Moharamzadeh K, Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. **J Dent** 2008; 36: 331-6.
179. Yow SZ, Quek CH, Yim EK, Lim CT, Leong KW. Collagen-based fibrous scaffold for spatial organization of encapsulated and seeded human mesenchymal stem cells. **Biomaterials** 2009; 30 :1133-42.
180. Nieto A, Areva S, Wilson T, Viitala R, Vallet-Regi M. Cell viability in a wet silica gel. **Acta Biomater** 2009; 5: 3478-87.
181. Cui ZF, Xu X, Trainor N, Triffitt JT, Urban JP, Tirlapur UK. Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. **Toxicol In Vitro** 2007; 21 :1318-24.
182. Tierney CM, Haugh MG, Liedl J, Mulcahy F, Hayes B, O'Brien FJ. The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. **J Mech Behav Biomed Mater** 2009; 2: 202-9.
183. Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. **Biomaterials** 2006; 27: 4434-42.
184. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. **J Biol Chem** 1992; 267: 10931-4.
185. Akasaka Y, Ono I, Tominaga A, Ishikawa Y, Ito K, Suzuki T, Imaizumi R, Ishiguro S, Jimbow K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor in an artificial dermis promotes apoptosis and inhibits expression of α -smooth muscle actin, leading to reduction of wound contraction. **Wound Repair Regen** 2007; 15: 378-89.
186. Ishiguro S, Akasaka Y, Kiguchi H, Suzuki T, Imaizumi R, Ishikawa Y, Ito K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor induces down-regulation of α -smooth muscle actin and reduction of myofibroblasts areas in open skin wounds. **Wound Repair Regen** 2009; 17: 617-25.
187. Le Visage C, Dunham B, Flint P, Leong KW. Coculture of mesenchymal stem cells and respiratory epithelial cells to engineer a human composite respiratory mucosa. **Tissue Eng** 2004; 10: 1426-35.
188. Goto Y, Noguchi Y, Nomura A, Sakamoto T, Ishii Y, Bitoh S, Picton C, Fujita Y, Watanabe T, Hasegawa S, Uchida Y. In vitro reconstitution of the tracheal epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1999; 20: 312-8.
189. Ohashi R, Singh V, Hamel J-FP. Perfusion cell culture in disposable bioreactors. **17th ESACT Meeting** 2001, Sweden.

