

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

GRADO EN MEDICINA



TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2016/2017

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA APLICACIÓN DE
DIFERENTES HIDROGELES PARA LA REGENERACIÓN DEL
MÚSCULO ESQUELÉTICO

AUTORES: Laura Sánchez Delgado, María Segovia González

TUTOR: Dr. Héctor J. Aguado Hernández

RESUMEN

Las lesiones musculares son muy frecuentes en la práctica clínica, siendo su tratamiento actual limitado, por lo que ha surgido la necesidad de realizar estudios para la búsqueda de alternativas terapéuticas, presentándose la medicina regenerativa y la ingeniería tisular como potenciales soluciones.

El objetivo de nuestro estudio es comparar la idoneidad de diferentes terapias basadas en el uso de biomateriales para mejorar la regeneración de tejido muscular dañado. Para ello, se han utilizado ocho ratas en las que se ha realizado un defecto muscular volumétrico sobre el músculo tibial anterior de ambas patas traseras, rellenándolo posteriormente con ocho terapias diferentes combinando biomateriales basados en recombinámeros tipo elastina y células madre mesenquimales. La capacidad regenerativa ha sido evaluada dos semanas después de la cirugía, mediante microscopía óptica, tras el procesamiento de las muestras con técnicas histológicas. Además, se ha utilizado una rata no intervenida previamente como control.

La respuesta regenerativa muscular se ha evaluado histológicamente mediante los siguientes parámetros: diámetro de las miofibrillas, número de células con núcleos centrales, cantidad de hidrogel en el defecto y área de interfase.

En todos los casos se ha observado algún signo de regeneración, en comparación con el grupo control. Sin embargo, no todas las terapias han mostrado ser igual de eficaces, dado que, por sus características particulares, los defectos han respondido de manera diferente cumpliendo o no los requisitos establecidos. Por todo ello, los hidrogeles biodegradables por la actividad enzimática de las metaloproteinasas han resultado ser los más idóneos.

PALABRAS CLAVE: músculo esquelético, tibial anterior (TA), defecto muscular volumétrico (VML), regeneración, células satélite (CS), células madre mesenquimales (CMM), biomateriales, hidrogeles, recombinámeros tipo elastina (ELRs), medicina regenerativa, ingeniería tisular.

INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético representa hasta el 40% de la masa corporal total [1, 2, 3], siendo sus lesiones muy comunes en la práctica clínica [4], particularmente en atletas [5], aunque también se presentan en otros ámbitos, como en los accidentes automovilísticos, laborales, los conflictos bélicos o en secuelas de procedimientos quirúrgicos, entre otros [1]. Existen diversos tipos de lesiones musculares, entre los que se incluye el defecto muscular volumétrico (Volumetric Muscle Loss, VML, en inglés) [6], definido como una pérdida de al menos el 20% de su masa, resultando en un déficit funcional significativo y una deformidad estética importante [1, 7].

La regeneración muscular es un proceso fisiológico complejo [1, 5], que tiene lugar en tres fases: fase de destrucción, fase de reparación y fase de remodelación. La respuesta inflamatoria acompaña a todo el proceso proporcionando una óptima reparación, por el contrario, una exacerbación o no resolución de la misma dificulta la reparación [6]. La primera fase se inicia con la rotura del sarcolema, provocando una entrada masiva de calcio que induce la necrosis de las miofibrillas. Inmediatamente, se produce una respuesta inflamatoria, con migración de neutrófilos que fagocitan los detritus y secretan citocinas que atraen a los macrófagos, convirtiéndose éstos en las células predominantes [1, 6, 8, 9]. En la segunda fase, se produce el reclutamiento, proliferación y diferenciación de las células satélite (CS) – células madre endógenas –, a mioblastos. Las CS son en su mayoría quiescentes en condiciones normales [2, 10], y durante la diferenciación presentan núcleos centrales que, según van madurando y generando proteínas contráctiles, se van trasladando hacia la periferia [1, 11]. Por último, en la fase de remodelación, tiene lugar un equilibrio entre la finalización de la diferenciación y la infiltración de fibroblastos. Estos facilitan la regeneración mediante la reparación y sustitución del tejido conectivo proporcionando estabilidad. Sin embargo, un exceso de depósito de proteínas (sobre todo colágeno I) forma tejido cicatricial y restringe la difusión de nutrientes y la migración y fusión de mioblastos. El equilibrio entre estas dos respuestas antagonistas es clave para una regeneración funcional adecuada [6]. Por lo tanto, el músculo esquelético

tiene buena capacidad regenerativa a priori, pero la presencia de lesiones extensas con pérdida de volumen, suponen una limitación de este proceso produciendo una reparación en forma de fibrosis cicatricial con una falta de recuperación funcional [5, 12], pudiendo contribuir a la recurrencia de las lesiones [13] y a la atrofia muscular irreversible [5].

En consecuencia, aún no se ha definido claramente el mejor tratamiento en las lesiones con VML. Actualmente, las terapias recomendadas son en su mayoría conservadoras y de rutina [13]. Quirúrgicamente, la mejor opción disponible para su tratamiento consiste en el trasplante autólogo de tejido utilizando colgajos de músculos [1, 7, 12]. Sin embargo, este procedimiento presenta múltiples limitaciones, como son la ausencia de disponibilidad y elevada comorbilidad del tejido donante [14, 15], sobre todo en VML grandes o en extremidades inferiores, que dependen de injertos de grandes músculos [7], pérdida de fuerza y función muscular, generalmente debido a la formación de tejido cicatricial [3, 14]. Asimismo, este tratamiento fracasa en un 10% debido a complicaciones como infección o necrosis [1].

Ante esta situación planteada, surge la necesidad de estudiar alternativas terapéuticas, presentándose la medicina regenerativa y la ingeniería tisular como potenciales herramientas para incrementar la regeneración de defectos musculares esqueléticos [1, 5, 16]. Existen múltiples estudios sobre el trasplante de células madre y/o biomateriales que han obtenido resultados prometedores. Sin embargo, su aplicación es aún limitada, debido a las dificultades técnicas y éticas en su obtención [4, 5, 12, 17].

Las células madre son células indiferenciadas, con capacidad de autorenovación, proliferación sostenida y diferenciación multilinaje. Se pueden clasificar en tres categorías: células madre hematopoyéticas, mesenquimales y embrionarias [5, 18]. La fuente celular de referencia para la obtención de células madre ha sido la médula ósea, pero la dificultad de su cultivo y la comorbilidad del tejido donante han impulsado la búsqueda de nuevas fuentes [4, 10]. En lo tocante a las células madre mesenquimales (CMM), éstas forman parte de todos los tejidos, aunque su número es limitado en el músculo esquelético [10, 18]. Son consideradas inmuno-privilegiadas, gracias a la

ausencia de expresión de HLA-II, que aumenta la compatibilidad donante-receptor, además de presentar propiedades inmunomoduladoras, permitiendo prescindir de fármacos inmunosupresores [5, 10, 12]. Por su parte, las CMM del tejido adiposo pueden ser cultivadas con mayor facilidad, seguridad, rapidez y en mayores cantidades, ya que contiene de 100 a 300 veces más células, que la médula ósea [4].

Al mismo tiempo, se han desarrollado múltiples tipos de biomateriales [10, 12], cuyas características consisten en proporcionar un soporte estructural y bioquímico, una dirección para la alineación de las miofibrillas en formación [1, 10] y crear un microambiente que facilita una liberación gradual de células y factores de crecimiento [12] y estimula la vascularización y la inervación [1]. Un tipo específico de biomateriales son los hidrogeles, constituidos por polímeros hidrófilos que forman redes tridimensionales, con alto contenido en agua, alta permeabilidad, biocompatibilidad y posibilidad de ser aplicados en defectos críticos de forma mínimamente invasiva [12]. Pueden formarse a partir de materiales naturales o sintéticos [1, 5, 16]. Los naturales tienen propiedades similares a las matrices extracelulares, pero son rápidamente degradados cuando se ponen en contacto con fluidos corporales, no siendo reproducibles de una muestra a otra y presentan riesgo de transferencia de infecciones y reacciones inmunológicas. Los hidrogeles sintéticos ofrecen un mejor control de la arquitectura y la composición química, presentan alta reproducibilidad, sin inmunogenicidad pero tienden a tener una menor actividad biológica [5, 19]. Por otra parte, los biomateriales, y por tanto los hidrogeles, pueden incorporar diferentes elementos en su matriz, como células madre y/o factores de crecimiento, potenciando la proliferación de células en la lesión [1, 20].

Entre los hidrogeles con elevado interés en ingeniería de tejidos se encuentran los recombinámeros tipo elastina (elastin-like recombinamers, ELRs, en inglés). Estos ELRs son polipéptidos de elevado peso molecular derivados de la elastina, obtenidos biotecnológicamente a partir de un ADN sintético [21]. Su secuencia de nucleótidos puede modificarse para obtener las características deseadas, como secuencias de adhesión celular o dianas de proteasas específicas. La composición de los ELRs les confiere propiedades

raramente presentes en otras familias de polímeros: elevada biocompatibilidad (no tóxicos, no inmunógenos) [19, 20, 21, 22], alta versatilidad [20], fuerte capacidad de respuesta a estímulos externos [23, 24], auto-ensamblado [22, 25] y adecuadas propiedades mecánicas [5].

Los ELRs utilizados en este proyecto tienen la capacidad de gelificar una vez introducidos en el defecto, de manera que pueden ser inyectados como líquidos. Se han utilizado dos tipos de ELRs según el método de gelificación: físicos y químicos. Los ELRs físicos gelifican al superar la temperatura conocida como temperatura de transición, estabilizándose mediante enlaces no covalentes, principalmente interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno; además, están reforzados con una región pseudo-cristalina formada por secuencias peptídicas derivadas de la fibroína de la seda del gusano *Bombyx mori*. En cambio, los hidrogeles basados en ELRs químicos están formados por dos tipos de elastómeros con secuencias de grupos reactivos complementarios que gelifican al combinarse por enlaces covalentes. El tiempo de gelificación es muy corto, lo que evita la dilución del hidrogel en el entorno una vez implantado.

Los ELRs han demostrado tener una gran aplicación y relevancia en el sector biomédico [22, 23] cumpliendo los estándares de pureza establecidos por la ASTM (*American Society for Testing and Materials*) para el uso de proteínas recombinantes en terapias en humanos [22, 26].

Nuestro objetivo es realizar un estudio descriptivo para comparar la idoneidad de ocho terapias distintas utilizando ELRs y células madre en la regeneración muscular creando un VML en el músculo TA de rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Todas las ratas fueron alojadas en el Animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid, con los adecuados cuidados veterinarios y recibieron comida y agua *ad libitum*.

Se han utilizado dos grupos de ratas, el primero para la extracción de células madre mesenquimales alogénicas y el segundo en las cuales se realizó el defecto en el músculo TA y la reparación con los hidrogeles y las células.

Para la extracción de CMM de tejido graso, se utilizaron cuatro ratas Wistar de tres meses de edad y de 250 gramos de peso, hembras.

Para la creación del VML se utilizaron 8 ratas Wistar macho de unos 9 meses de edad y un peso de 500 gramos en el momento de la cirugía. Se utilizaron las dos patas traseras de cada rata, sumando un total de 16.

Este proyecto (Nº: 5402485) ha sido aprobado por el CEEBA - Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal - de la Universidad de Valladolid.

Anestesia

Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo anestesia general con ketamina-medetomidina intraperitoneal a dosis de 0,125 ml/100g de peso. La monitorización de la profundidad anestésica se realizó mediante valoración visual de respuesta motora ante estímulos dolorosos.

Analgesia

Para el bienestar de los animales se utilizó analgesia postoperatoria con tramadol 1mg/Kg/día durante 48 horas en un recipiente con nocilla® e ibuprofeno 10 ml/1 litro de agua, colocado en el bebedero de la jaula.

Eutanasia

Todas las ratas fueron sacrificadas mediante inyección intracardiaca de fenobarbital (500 mcl) siendo previamente anestesiadas para evitar el mínimo sufrimiento.

Creación del defecto muscular volumétrico en TA

Bajo condiciones de asepsia, se realiza una incisión longitudinal lateral a la tibia con un bisturí (hoja nº 24). Mediante un disector se separa piel de fascia y se corta ésta longitudinalmente separándola del TA. Con una regla milimetrada metálica se marca con un rotulador estéril una línea horizontal en el músculo

TA a una distancia de 10 mm de la tuberosidad tibial. Posteriormente se mide 10 mm de longitud y se marca una segunda línea horizontal. Con el bisturí se realiza el defecto muscular entre ambas marcas con una profundidad media de 3 mm y una anchura de 7 mm, obteniendo una porción muscular de 10x7x3mm (Anexo 1 Figura 1A). El defecto creado se pesa en una báscula (Figura 1A-1C).

El peso medio de la muestra obtenida del defecto muscular se estima con una ecuación de regresión ($y = 0.0017 \cdot \text{body wt.} - 0.0716$) [7] que relaciona el peso de músculo TA con el de la rata, obteniendo para todas las ratas un peso húmedo medio de 190 mg (que se corresponde con el 20% del músculo total).

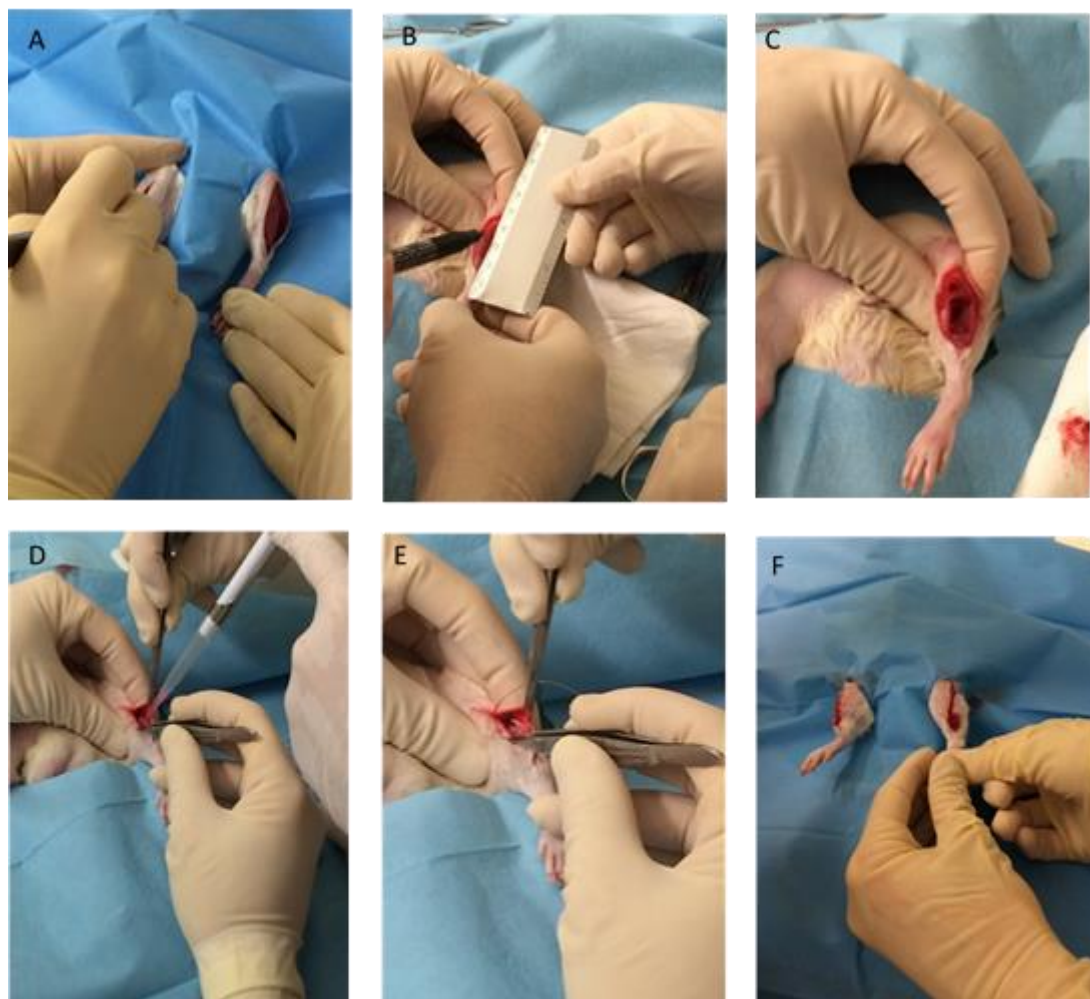


FIGURA 1: Creación del defecto volumétrico en TA de rata (A-C). Inyección con pipeta del hidrogel en el VML (D). Cierre cutáneo mediante sutura continua con Prolene® 4/0 (E-F).

Reparación del defecto muscular en TA

Para evaluar el efecto de los geles sobre el VML se han utilizado hidrogeles ELRs, obtenidos de forma recombinante en *E. coli* en el G.I.R BIOFORGE de la Universidad de Valladolid.

Como se ha comentado previamente, se han utilizado dos tipos distintos de ELRs, físicos y químicos, haciendo cuatro grupos al incluir o no dominios de reconocimiento por metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que permiten su degradación una vez implantado, dividiéndolos a su vez en si contienen o no células mesenquimales, dando lugar a ocho terapias diferentes.

Dividimos las 16 patas en 8 grupos (n=2/grupo). En todos los grupos se realizó el defecto muscular, pero en cada uno de ellos la reparación se realizó con una de estas ocho combinaciones, siendo la asignación aleatoria (Tabla 1).

Tabla 1: Esquemización de las ocho terapias utilizadas en el estudio y sus características.

	GELIFICACIÓN	DEGRADACIÓN	CÉLULAS
GEL A	Químico	No	Si
GEL B	Químico	No	No
GEL C	Físico	No	Si
GEL D	Físico	No	No
GEL E	Químico	Si	Si
GEL F	Químico	Si	No
GEL G	Físico	Si	Si
GEL H	Físico	Si	No

Inmediatamente después de inyectar con una pipeta el hidrogel (Figura 1D) en la zona del defecto se realiza una sutura continua en la piel con Prolene® 4/0 (Figura 1E-1F).

Procesado de las muestras

Dos semanas después de la creación del defecto muscular y tras realizar la eutanasia, se procede a la extracción del TA de todas las ratas intervenidas y de una sana, no intervenida previamente, de las mismas características, que se utiliza como grupo control. Cada TA se divide en dos mitades mediante una

sección transversal en la zona media del defecto, y para obtener secciones diferentes en el estudio histológico se montan en posición horizontal y vertical, sobre discos de corcho utilizando una pequeña cantidad de OCT (Optimum Cutting Temperature) en la base (Anexo 1 Figura 1B). Posteriormente se introducen en una solución de isopentano enfriado en nitrógeno líquido a -196°C y se almacenan a -80°C . Se realizan los cortes y se tiñen con hematoxilina-eosina (H-E) y tricrómico de Masson según el protocolo estándar.

Evaluación histológica

Se ha realizado una evaluación macroscópica y microscópica. El estudio microscópico se ha llevado a cabo mediante un análisis computarizado de las imágenes histológicas digitalizadas utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ.

Previamente al análisis, se han definido dos áreas diferentes en las muestras con defecto (Anexo 1 Figura 2):

- Hidrogel: aquella en la que no existen células musculares definidas, con alto infiltrado inflamatorio y matriz extracelular, con alta afinidad por la hematoxilina.
- Interfase hidrogel-músculo sano: Es la zona límite de la lesión, adyacente al músculo sano, donde empiezan a aparecer miofibrillas en regeneración, con presencia de núcleos internos y un infiltrado menor de células inflamatorias. Es una zona más basófila que el músculo sano.

La capacidad de regeneración muscular ha sido evaluada en secciones transversales teñidas con H-E mediante:

- Cuantificación del área total, utilizando la herramienta "Threshold colour" del software ImageJ.
- Medición del área de hidrogel y de interfase en cada muestra.
- Recuento del número total de células y con núcleos internos de la interfase en muestras con defecto y de campos aleatorios en las muestras control.

- Medida del diámetro Minferet de 100 fibras musculares en campos aleatorios de la interfase en las muestras con VML y del control. El Minferet es una medida diseñada para superar la distorsión que se produce cuando una fibra muscular no está perfectamente orientada en el plano transversal y se corta oblicuamente, produciendo un aspecto oval en la fibra, pudiendo dar lugar a un error de medición [11].

Dos observadores, independientes y ciegos a los grupos experimentales, realizaron todas las mediciones. La muestra control se ha analizado dos veces para obtener la media y su desviación estándar (DS) y aumentar la precisión.

Todos los datos han sido reunidos y analizados usando Microsoft Excel©. Se establece como nomenclatura de cada gel su letra correspondiente (Tabla 1) y la letra O para la muestra control. Los resultados se expresan como medias \pm DS.

RESULTADOS

En el examen macroscópico no se observa infección evidente en ninguna de las ratas (Anexo 1 figura 3). En las muestras correspondientes al gel A y B se observa una falta de integración del hidrogel con bordes muy definidos (Anexo 1 figura 3-2A,3A,4A). En una de las muestras del gel H se aprecia un gran hematoma intramuscular sin reconocer claramente la zona del VML (Anexo 1 Figura 3-16A). En el resto de muestras se aprecia en diferente grado el VML, desde una profunda pérdida de tejido (Anexo 1 figura 3-12A,13A) hasta una dificultad para reconocer la zona del VML (Anexo 1 figura 3-14A,15A).

Microscópicamente, en la figura 2 se muestra el porcentaje de núcleos internos. Claramente se observa un mayor porcentaje de núcleos internos en las muestras en las que se realizó defecto muscular con relleno de hidrogel, respecto a la muestra control sin defecto.

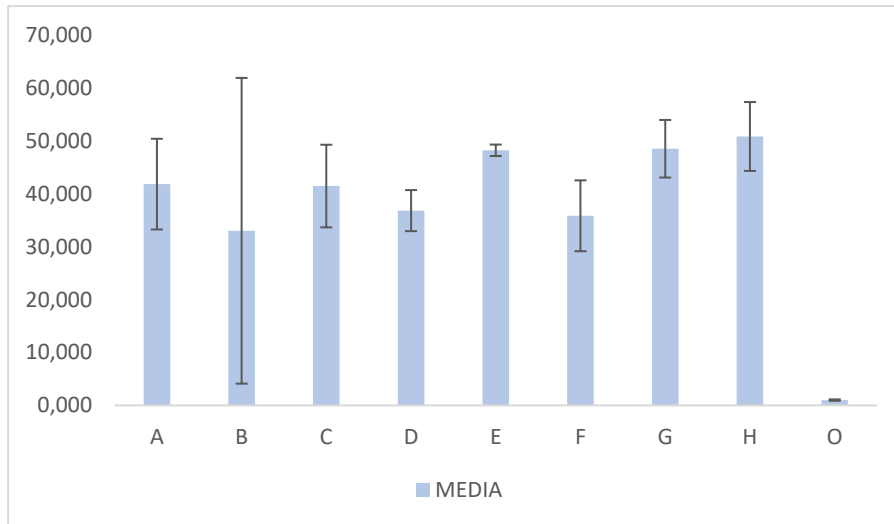
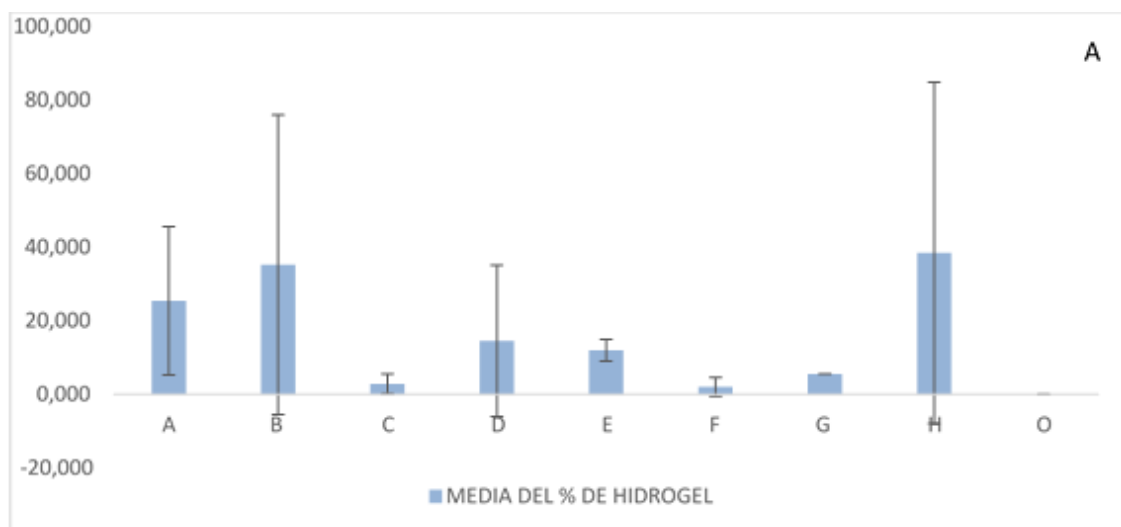


FIGURA 2: Histograma representando las medias del % de núcleos internos de las miofibrillas de la interfase de ambas muestras de cada grupo, incluyendo el control (O), y su DS.

En cuanto al porcentaje de hidrogel respecto al área muscular total se observan grupos en los que persiste una gran cantidad de hidrogel y grupos en los que prácticamente ha desaparecido. Dentro de los grupos con mayor porcentaje de hidrogel existe una elevada DS entre ambas muestras (Figura 3A). El porcentaje de interfase respecto al músculo total es muy variable entre los grupos, y dentro de estos, entre las muestras, presentando una elevada DS (Figura 3B).



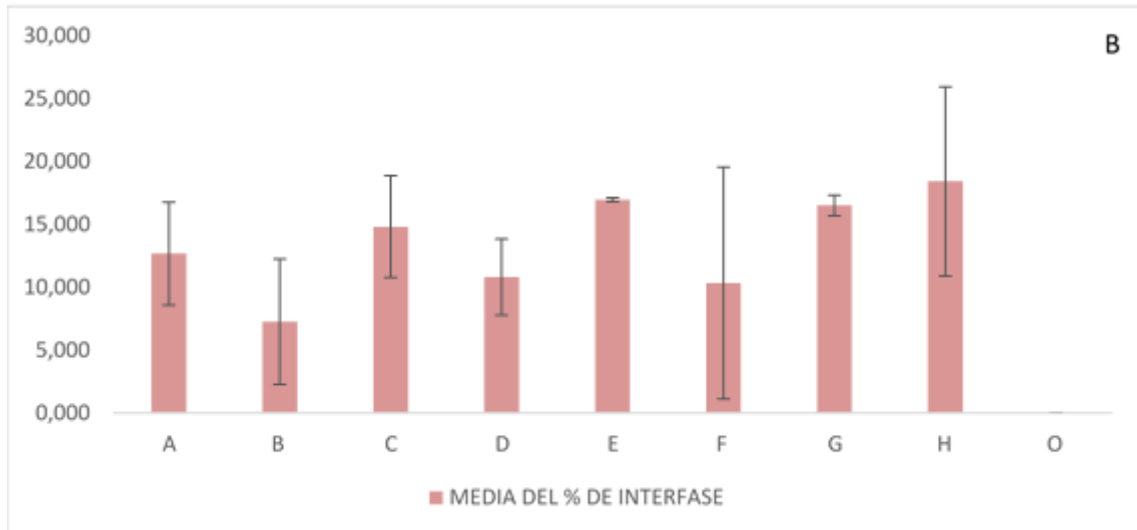


FIGURA 3: Representación gráfica de la media de cada grupo del % de área de hidrogel (A) e interfase (B) respecto al área muscular total.

En este mismo orden, se ha realizado la medición del diámetro Minferet de 100 células presentes en la interfase en las muestras con defecto y células aleatorias de las muestras control, observándose que la mayoría de células de las muestras con defecto tienen un tamaño menor que el de las miofibras del grupo control (Figura 4).

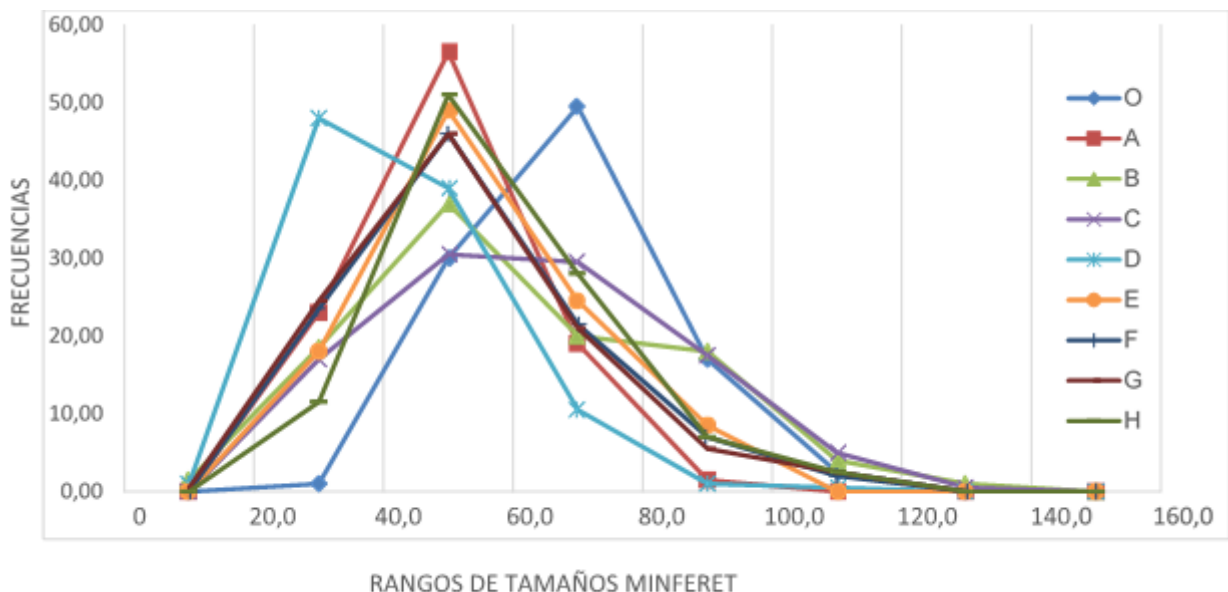


FIGURA 4: Polígono de frecuencias absolutas de los rangos de tamaños Minferet de todos los grupos.

Se han comparado los hidrogeles atendiendo a sus características. No se observan diferencias evidentes entre los grupos de defectos tratados con geles físicos y químicos (Anexo 1 figura 4) ni entre los grupos tratados con geles que incluyen o no células madre (Anexo 1 figura 5). Sin embargo, en la comparación de los hidrogeles degradables y no degradables sí se aprecian diferencias, teniendo las fibras de los defectos musculares tratados con hidrogeles degradables, un rango de tamaño mayor que las de los defectos musculares tratados con hidrogeles no degradables (Anexo 1 figura 6).

DISCUSIÓN

Las lesiones del músculo esquelético son muy frecuentes en la práctica clínica actual [4], por lo que es de especial importancia desarrollar nuevas estrategias para mejorar la regeneración del músculo. En este sentido, nuestro estudio ha servido para comparar la idoneidad de ocho terapias distintas utilizando ELRs y CMM en la regeneración de un VML en TA de ratas, siendo este defecto el modelo comúnmente elegido para los estudios de regeneración de músculo esquelético [7, 13, 9, 27].

Con el objetivo de seleccionar los tratamientos que mejor promueven la regeneración muscular, se han valorado los siguientes parámetros en la evaluación histológica: tamaño de las miofibrillas (las miofibrillas recién formadas son de menor calibre), número de células con núcleos localizados centralmente (característico de fibras en regeneración) y presencia de fibras basófilas (debido a una mayor síntesis de proteínas en fibras de nueva formación [5]).

Resulta oportuno mencionar que se ha realizado tinción con tricrómico de Masson para evaluar la posible fibrosis que pudiera acompañar a la reparación del VML, pero la técnica no ha mostrado resultados concluyentes debido al corto tiempo de seguimiento (dos semanas), ya que el proceso de fibrosis comienza durante la segunda semana tras la lesión y no es valorable hasta la cuarta [4, 9, 13]. Para resolver esta limitación y poder predecir el desarrollo de fibrosis tan a corto plazo existe el marcaje inmunohistoquímico de macrófagos

M1 y M2 [3, 9], ya que, inicialmente, en el infiltrado inflamatorio de la lesión predominan los macrófagos M1 (proinflamatorios), siendo sustituidos, durante los 3-7 días posteriores, por macrófagos M2, que mejoran la respuesta regenerativa mediante la estimulación de la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de mioblastos. La persistencia de los macrófagos M1 inhibe la diferenciación y el reclutamiento de los macrófagos M2 y favorece el desarrollo de fibrosis [1, 6, 8, 9].

Con los resultados obtenidos durante el estudio, y teniendo en cuenta que el aumento de las células con núcleos centrales indica una regeneración del tejido dañado [11, 13], podemos concluir que, en todas las muestras con defecto rellenadas con hidrogel existe regeneración, aunque se observa una menor cantidad de células con núcleos centrales en una de las muestras del hidrogel B, constituyendo una razón para descartarlo. No obstante, una limitación de este estudio es que se han comparado con músculo sano y no con un VML sin relleno con hidrogel, por lo que no se puede afirmar que esta reparación sea debida exclusivamente a la acción de los hidrogeles sin que influya la capacidad reparativa intrínseca del músculo dañado.

Tras las consideraciones anteriores, resulta oportuno plantear si el origen de estos mioblastos en diferenciación son las CMM incluidas en algunos hidrogeles. Podemos ver un número ligeramente mayor de núcleos centrales en los hidrogeles con células que en los hidrogeles sin células madre, a excepción del hidrogel H. Al no ser una gran diferencia, se puede inferir que estos hidrogeles pueden proporcionar el soporte necesario para que las CS del músculo se activen y comiencen a diferenciarse a mioblastos sin necesidad de aportar CMM. Si se quiere conocer con exactitud el origen de las células en diferenciación se puede realizar marcaje inmunohistoquímico mediante anticuerpos específicos contra CMM y CS [5, 13].

De igual importancia, para una buena reparación y regeneración muscular es esencial el restablecimiento temprano de la vascularización [4, 13, 28]. Por ello, es necesario que los biomateriales tengan una estructura tridimensional, sean porosos para el transporte de nutrientes y desechos y sean biodegradables [5, 28]. En base a esto, la tendencia natural del hidrogel debe ser a la degradación

e integración con el tejido adyacente a la par que se produce la regeneración [27]; por tanto, consideramos que es mejor una menor cantidad de hidrogel observada en el VML. El gel A, B y D se excluyen ante la presencia de elevada cantidad de hidrogel en el defecto, con escasa integración y reabsorción. Aunque esta limitación sólo se observa en una de las dos muestras, se descartan ante la posibilidad de que en un siguiente uso pueda repetirse (Anexo 1 figura 3-2,3,8).

Resulta oportuno decir que una de las muestras del grupo H con mucha área de hidrogel y con un alto contenido inflamatorio, se corresponde con el hematoma observado a nivel macroscópico (Anexo 1 figura 3-16). Este hematoma probablemente se deba a una mala ejecución de la técnica quirúrgica y puede ser el factor determinante de la no homogeneidad entre las dos muestras del gel H provocando una elevada DS (Figura 3), ya que su presencia supone un obstáculo para la difusión de citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes, impidiendo la neovascularización y correcta regeneración [13, 28].

En el marco de las observaciones anteriores, la interfase músculo sano-hidrogel es un signo indicativo de adecuada regeneración al estar formándose músculo desde la zona dañada hacia el hidrogel. Por lo tanto, la existencia de una menor interfase se traduce en una falta de integración del hidrogel, existiendo una línea divisoria muy definida entre ambas regiones limitando la regeneración. Esto ocurre con los grupos A, B, D y F. En el grupo del hidrogel F existe una DS muy elevada entre ambas muestras (figura 3B), presentando una de ellas pequeña cantidad de interfase e hidrogel, indicando que la regeneración ha ido avanzando adecuadamente, obteniendo músculo sano gracias a la correcta integración y degradación del hidrogel. Ante esta situación, se descartan los hidrogeles A, B y D, siendo considerado el hidrogel F adecuado.

De acuerdo con la bibliografía, el diámetro de las fibras musculares en formación es menor que el de las fibras maduras [5]. Si bien es cierto que el crecimiento debe ir progresando hasta alcanzar su tamaño final, ocurriendo esto alrededor de las cuatro semanas tras el VML [4]. Por ello, en este

momento de evaluación (2 semanas) todas las fibras de las muestras con defecto son de menor tamaño comparadas con el control (figura 4). Se observa que los geles no degradables B, C y D no muestran la misma distribución homogénea en rango de tamaños que los geles degradables (Anexo 1 figura 6), esto nos orienta a que probablemente no alcancen el diámetro de una fibra muscular normal, por lo que también quedarían excluidos en futuros ensayos. No obstante, para comprobar el adecuado crecimiento habría que realizar un periodo de seguimiento mayor, evaluando el tamaño de las fibras a las 2 y 4 semanas [4,13].

Por otro lado, los geles E, F, G y H, cuya característica común es la posibilidad de ser degradados por MMPs, se presentan como los mejores candidatos para la terapia con células madre. La respuesta reparativa muscular con estos hidrogeles es óptima, cumpliendo con los tres requisitos evaluados en este estudio, los cuales son: menor calibre de las miofibrillas, mayor número de células con núcleos centrales y menor cantidad de hidrogel en el defecto acompañado de una mayor área de interfase.

Tabla 2: Tabla resumen sobre las características positivas (✓) y no adecuadas (x) en cada uno de los campos evaluados de cada gel.

	Núcleos centrales	Área de hidrogel	Área de interfase	Minferet
GEL A químico no degradable con células	✓	X	X	✓
GEL B químico no degradable sin células	X	X	X	X
GEL C físico no degradable con células	✓	✓	✓	X
GEL D físico no degradable sin células	✓	X	X	X

	Núcleos centrales	Área de hidrogel	Área de interfase	Minferet
GEL E químico degradable con células	✓	✓	✓	✓
GEL F químico degradable sin células	✓	✓	✓*	✓
GEL G físico degradable con células	✓	✓	✓	✓
GEL H físico degradable sin células	✓	✓**	✓*	✓

*Elevada DS entre ambas muestras del hidrogel F, presentando una de ellas pequeña cantidad de interfase e hidrogel, traduciéndose en que la regeneración ha ido avanzando adecuadamente gracias a la correcta integración y degradación del hidrogel, por lo que es un buen candidato.

**Elevada DS entre ambas muestras del gel H, debido a la presencia de un hematoma en una de ellas. A pesar de esto, es un buen candidato.

En base a los resultados obtenidos y las limitaciones de nuestro estudio ya descritas, proponemos que, conforme a la literatura publicada, los posteriores estudios se realicen con un mayor tamaño muestral y con un periodo de seguimiento mayor (2, 4 y 8 semanas) [4, 7, 9, 13, 27, 29], además de utilizar controles con defecto sin relleno de hidrogel [9, 12].

CONCLUSIONES

Hemos descartado los hidrogeles A, B y D, no degradables, por presentar, los defectos musculares tratados con ellos, una elevada cantidad de hidrogel sin integración en el músculo circundante. Igualmente, por el menor diámetro de las fibras y la distribución tan heterogénea que hacen dudar de que vayan a convertirse en fibras musculares maduras y sanas quedan descartados los

hidrogeles B, C y D, todos ellos no degradables.

Se ha determinado que, por el cumplimiento de todas las características, siendo estas, la presencia de un elevado número de fibras centronucleadas, menor área de hidrogel con integración en el tejido y un tamaño de fibras menor que el de las fibras musculares adultas pero con una distribución homogénea, los hidrogeles E, F, G y H, variando en las características de gelificación y presencia de células madre, y teniendo en común la biodegradabilidad por MMPs, son los más idóneos para continuar con los estudios.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a D. Arturo Ibáñez Fonseca por su apoyo y dedicación en la realización de nuestro Trabajo de Fin de Grado.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Grasman J, Zayas M, Page R, Pins G. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomaterialia*. 2015;25:2-15.
- [2] Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, *et al.* Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLOS ONE*. 2016;11(1):e0147198.
- [3] Turner N, Badylak S. Regeneration of skeletal muscle. *Cell and Tissue Research*. 2011;347(3):759-774.
- [4] Mori R, Kamei N, Okawa S, Nakabayashi A, Yokota K, Higashi Y, *et al.* Promotion of skeletal muscle repair in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2012;9(10):1150-1160.
- [5] Pereira T, Gartner A, Amorim I, Armada-da- P, Gomes R, Pereira C, *et al.* Biomaterials and Stem Cell Therapies for Injuries Associated to Skeletal Muscular Tissues. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. 2013;(23):329-363.
- [6] Souza J, Gottfried C. Muscle injury: Review of experimental models. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2013;23(6):1253-1260.
- [7] Wu X, Corona B, Chen X, Walters T. A Standardized Rat Model of Volumetric Muscle Loss

Injury for the Development of Tissue Engineering Therapies. *BioResearch Open Access*. 2012;1(6):280-290.

[8] Gayraud-Morel B, Chrétien F, Tajbakhsh S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regenerative Medicine*. 2009;4(2):293-319.

[9] Aurora A, Corona B, Walters T. A Porcine Urinary Bladder Matrix Does Not Recapitulate the Spatiotemporal Macrophage Response of Muscle Regeneration after Volumetric Muscle Loss Injury. *Cells Tissues Organs*. 2016;202(3-4):189-201.

[10] Caseiro A, Pereira T, Bártolo P, Santos J, Luís A, Maurício A. Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials Systems – Perspectives for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. *Procedia Engineering*. 2015;110:90-97.

[11] Dubowitz V, Sewry C, Oldfors A. *Muscle biopsy: a practical approach*. 1st ed. Oxford: Saunders; 2013.

[12] Pereira T, Armada-da Silva P, Amorim I, Rêma A, Caseiro A, Gärtner A, *et al*. Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord and Conditioned Media on Skeletal Muscle Regeneration Using a Myectomy Model. *Stem Cells International*. 2014;2014:1-16.

[13] Shi M, Ishikawa M, Kamei N, Nakasa T, Adachi N, Deie M *et al*. Acceleration of Skeletal Muscle Regeneration in a Rat Skeletal Muscle Injury Model by Local Injection of Human Peripheral Blood-Derived CD133-Positive Cells. *Stem Cells*. 2009;27(4):949-960

[14] Mase V, Hsu J, Wolf S, Wenke J, Baer D, Owens J, *et al*. Clinical Application of an Acellular Biologic Scaffold for Surgical Repair of a Large, Traumatic Quadriceps Femoris Muscle Defect. *Orthopedics*. 2010;.

[15] Beier J, Stern-Straeter J, Foerster V, Kneser U, Stark G, Bach A. Tissue Engineering of Injectible Muscle: Three-Dimensional Myoblast-Fibrin Injection in the Syngeneic Rat Animal Model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;118(5):1113-1121.

[16] Porzionato A, Sfriso M, Pontini A, Macchi V, Petrelli L, Pavan P, *et al*. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):14808-14831.

[17] Longo U, Loppini M, Berton A, Spiezia F, Maffulli N, Denaro V. Tissue Engineered Strategies for Skeletal Muscle Injury. *Stem Cells International*. 2012;2012:1-9.

[18] Fossett E, Khan W. Optimising Human Mesenchymal Stem Cell Numbers for Clinical Application: A Literature Review. *Stem Cells International*. 2012;2012:1-5.

[19] Girotti A, Orbanic D, Ibáñez-Fonseca A, Gonzalez-Obeso C, Rodríguez-Cabello J. Recombinant Technology in the Development of Materials and Systems for Soft-Tissue Repair.

Advanced Healthcare Materials. 2015;4(16):2423-2455.

[20] Rodríguez-Cabello J, Pierna M, Fernández-Colino A, García-Arévalo C, Arias F. Recombinamers: Combining Molecular Complexity with Diverse Bioactivities for Advanced Biomedical and Biotechnological Applications. *Biofunctionalization of Polymers and their Applications*. 2010;;:145-179.

[21] Arias F, Santos M, Fernández-Colino A, Pinedo G, Girotti A. Recent Contributions of Elastin-Like Recombinamers to Biomedicine and Nanotechnology. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014;14(6):819-836.

[22] Rodriguez-Cabello JC, Reguera J, Girotti A, Alonso M, TESTERA A. Developing functionality in elastin-like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach. *Progress in Polymer Science*. 2005;30(11):1119-1145.

[23] Urry D, Parker T, Reid M, Gowda D. Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its γ -Irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Results. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 1991;6(3):263-282.

[24] Sallach R, Wei M, Biswas N, Conticello V, Lecommandoux S, Dluhy R. Micelle Density Regulated by a Reversible Switch of Protein Secondary Structure. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(36):12014-12019.

[25] Dreher M, Simnick A, Fischer K, Smith R, Patel A, Schmidt M. Temperature Triggered Self-Assembly of Polypeptides into Multivalent Spherical Micelles. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(2):687-694.

[26] Galaev I, Mattiasson B. *Smart Polymers, application in biotechnology and biomedicine*. 2nd ed. CRC Press;2008.

[27] Ma J, Baker A, Calabro A, Derwin K. Exploratory study on the effect of osteoactivin on muscle regeneration in a rat volumetric muscle loss model. *PLOS ONE*. 2017;12(4):e0175853.

[28] Kamelger F, Marksteiner R, Margreiter E, Klima G, Wechselberger G, Hering S, *et al.* A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials*. 2004;25(9):1649-1655.

[29] Chen X, Walters T. Muscle-derived decellularised extracellular matrix improves functional recovery in a rat latissimus dorsi muscle defect model. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2013;66(12):1750-1758.

ANEXO 1: FIGURAS

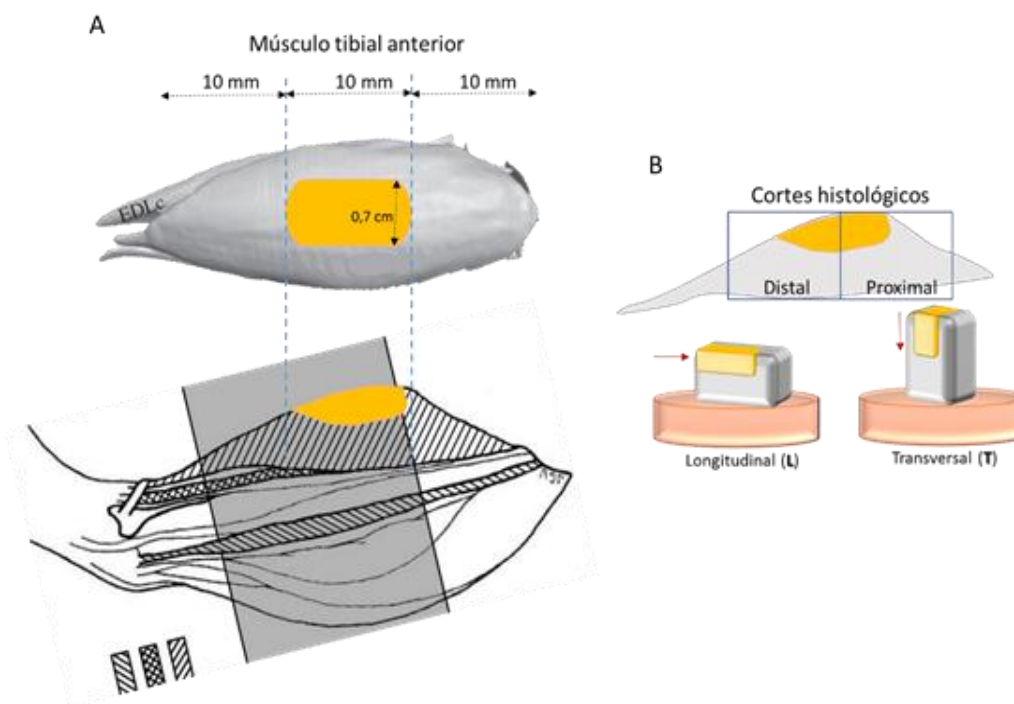


FIGURA 1: Modelo diseñado para la creación del VML (A), para la extracción del TA y su procesamiento para la obtención de muestras (B).

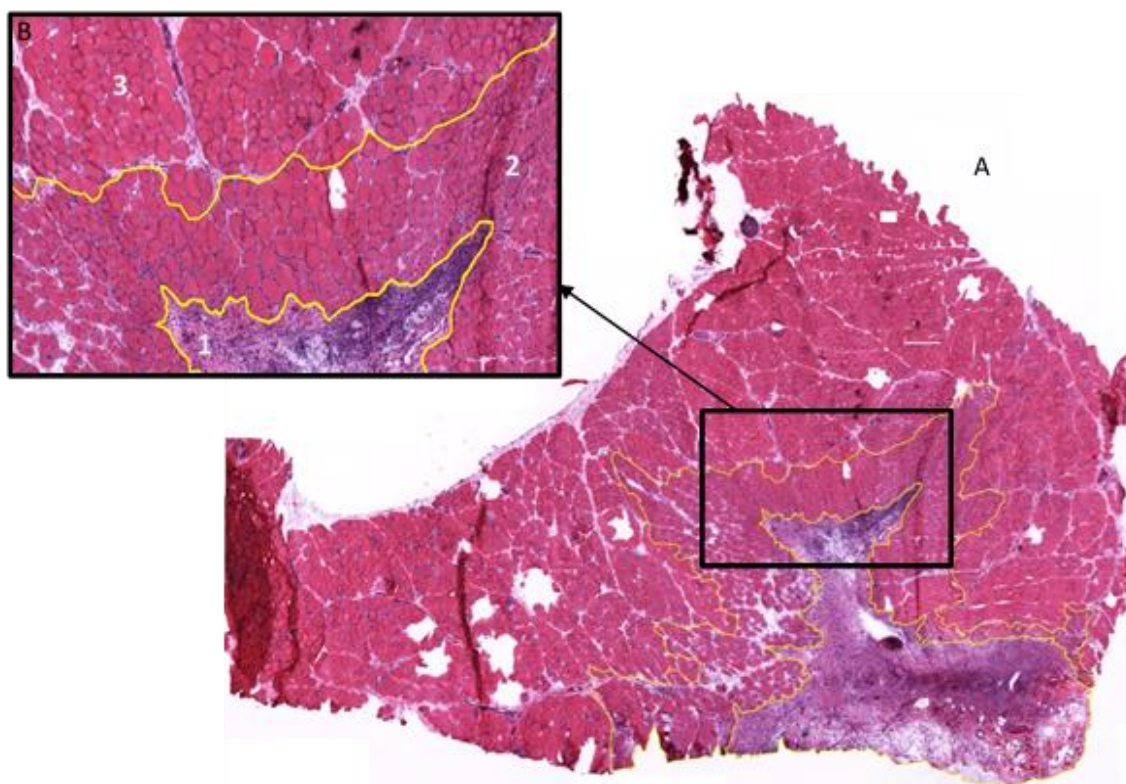
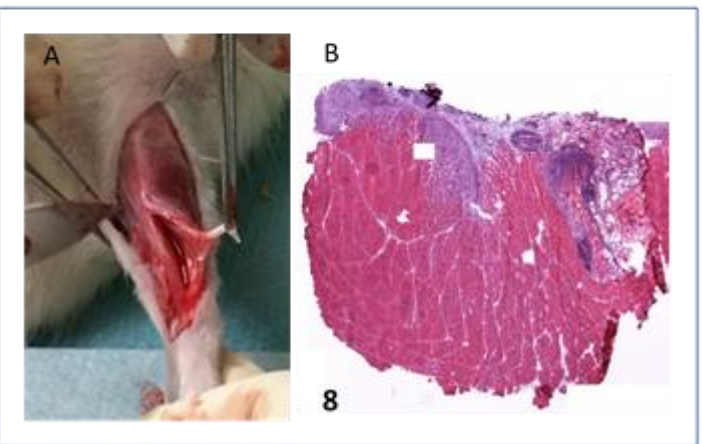
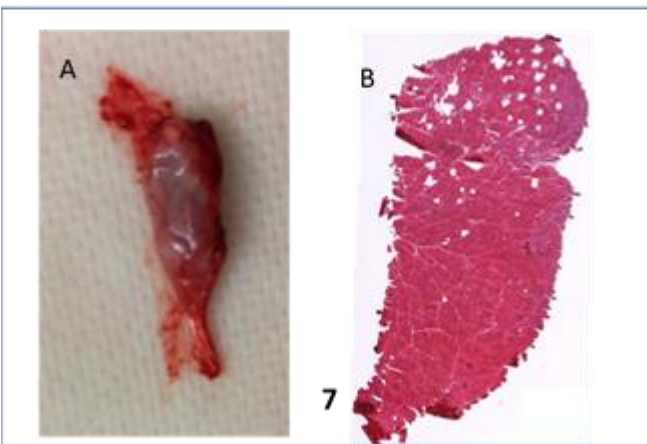
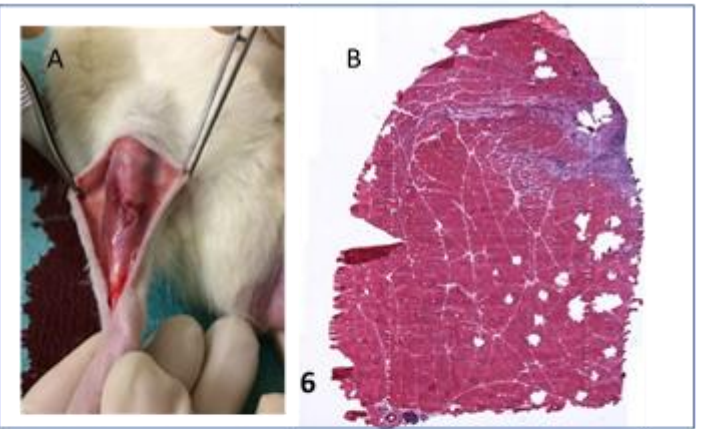
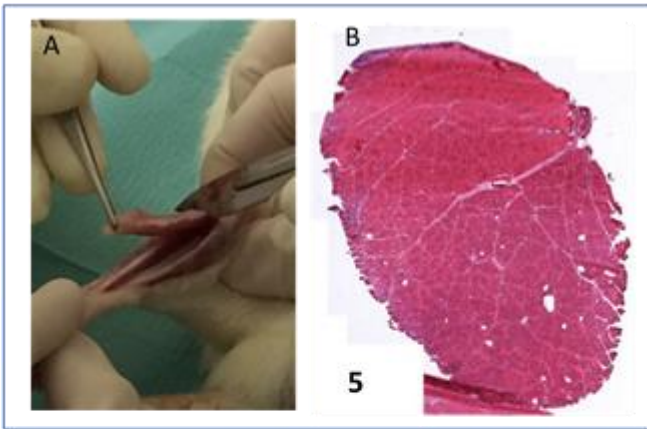
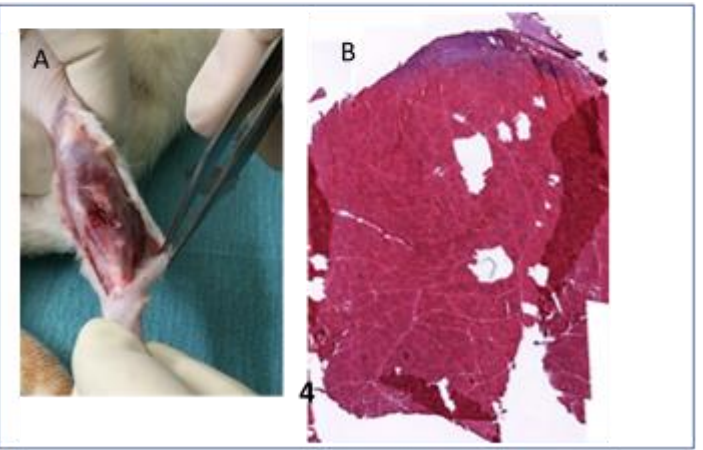
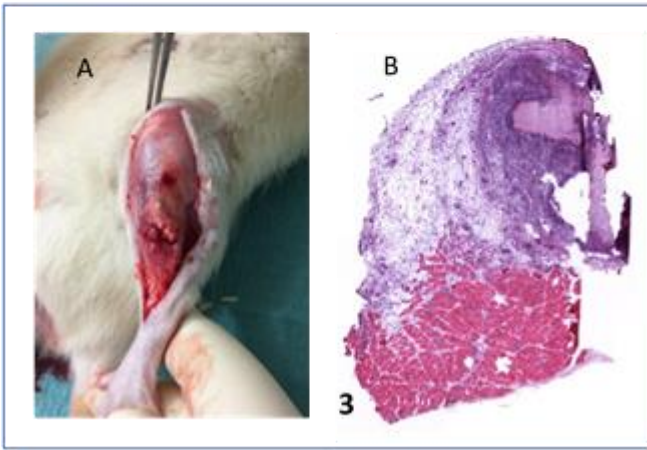
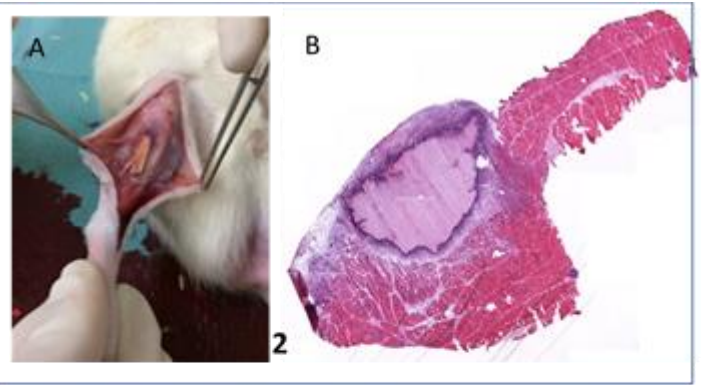
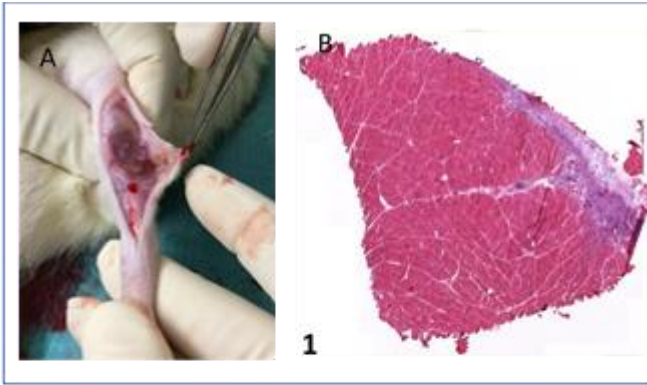
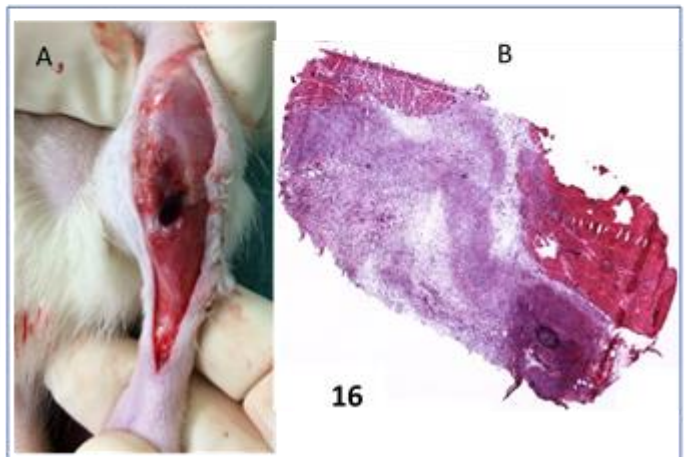
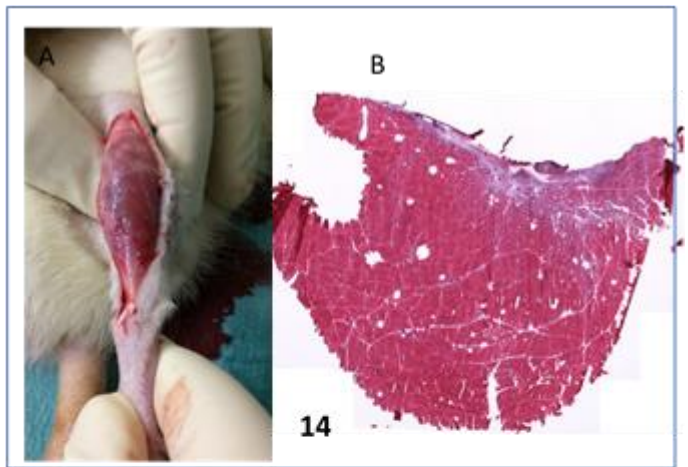
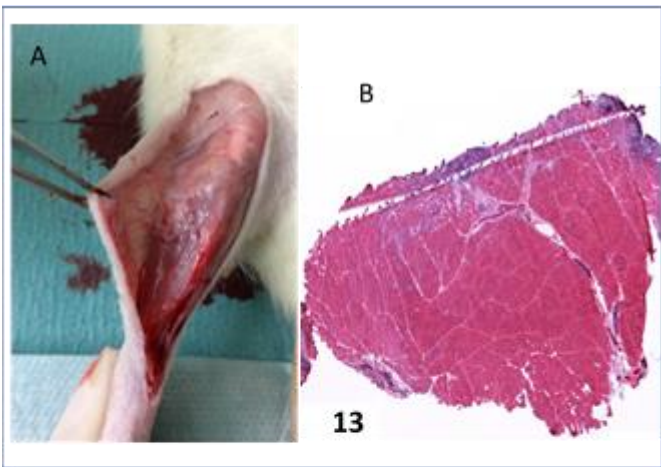
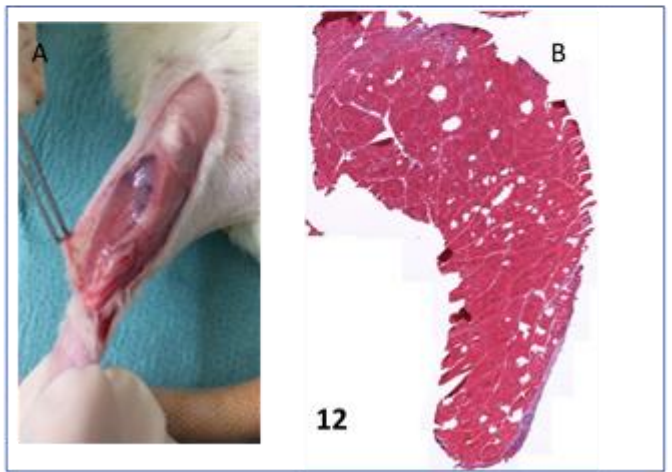
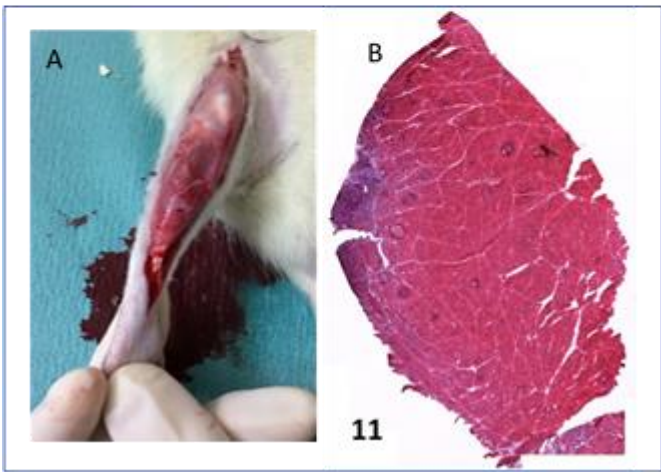
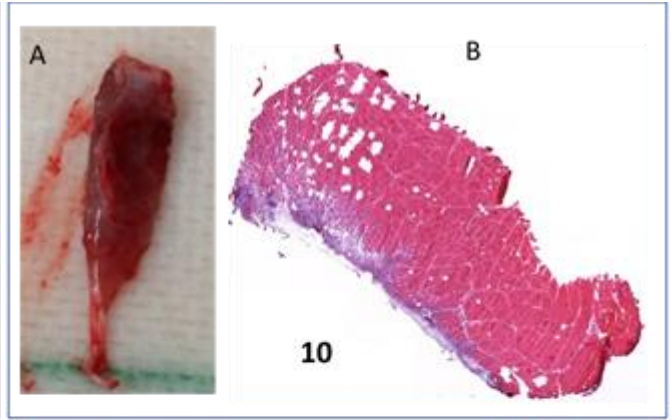
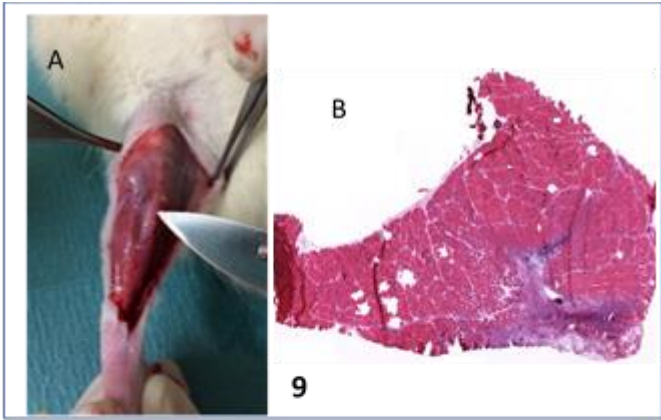


FIGURA 2: Imagen de una muestra, ejemplo del análisis con el software ImageJ, panorámica (A) y con aumento (B). Se observa el área del hidrogel definida (1), el área de la interfase definida (2) y el músculo sano (3).





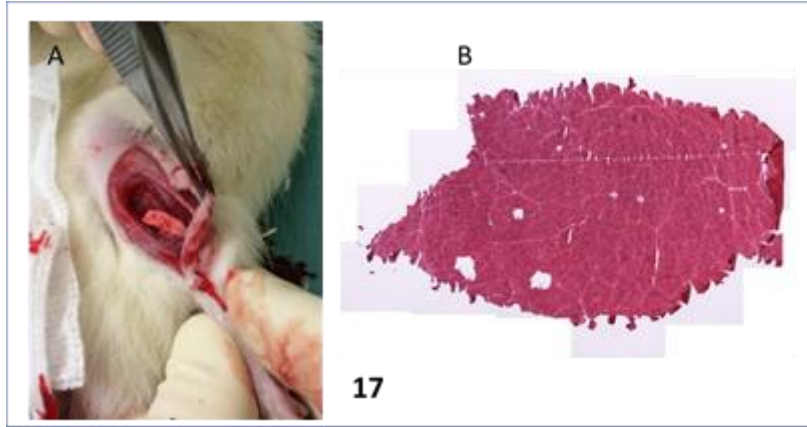


Figura 3: Imágenes macroscópicas de los TA con VML (A) y secciones transversales representativas de los explantes musculares TA con tinción H-E (B) después de 2 semanas de la realización del defecto. Muestras de gel A (1-2), del gel B (3-4), del gel C (5-6), del gel D (7-8), del gel E (9-10), del gel F (11-12), del gel G (13-14), del gel H (15-16) y del control (17).

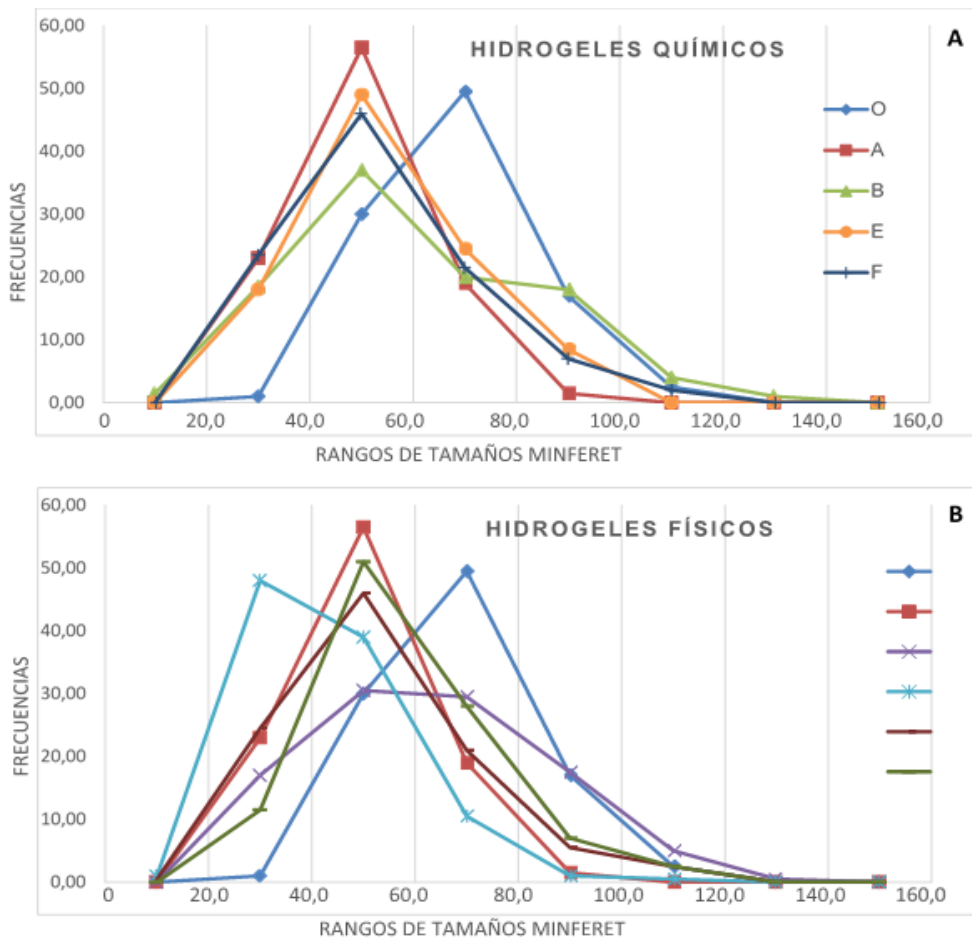


Figura 4: Polígono de frecuencias absolutas de los rangos de tamaños Minferet de los hidrogeles químicos (A) y físicos (B).

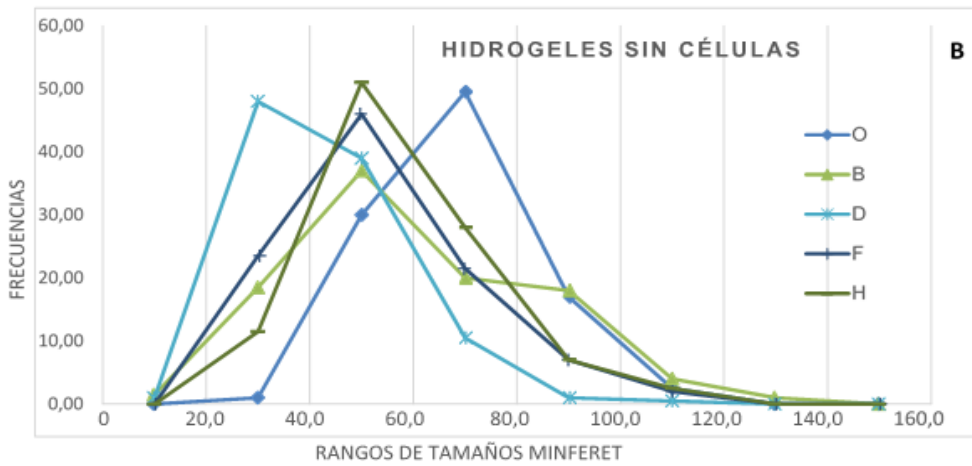
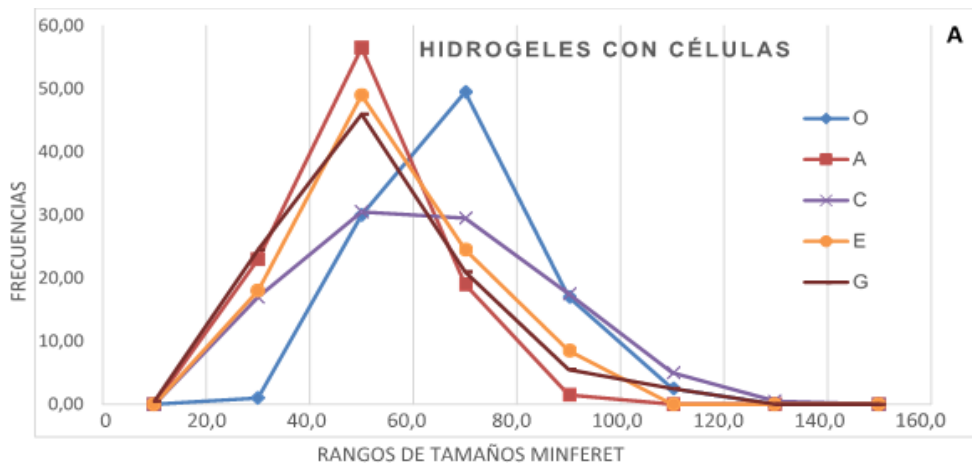
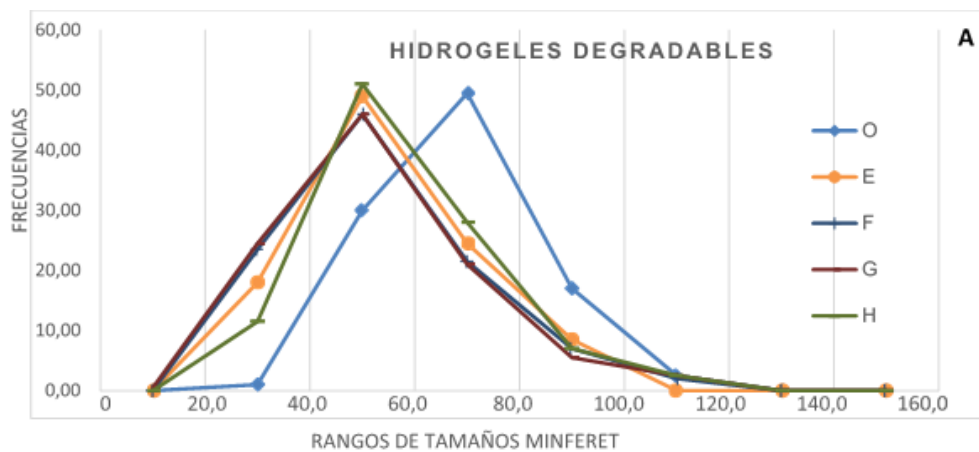


Figura 5: Polígono de frecuencias absolutas de los rangos de tamaños Minferet de los hidrogeles con células (A) y sin células (B).



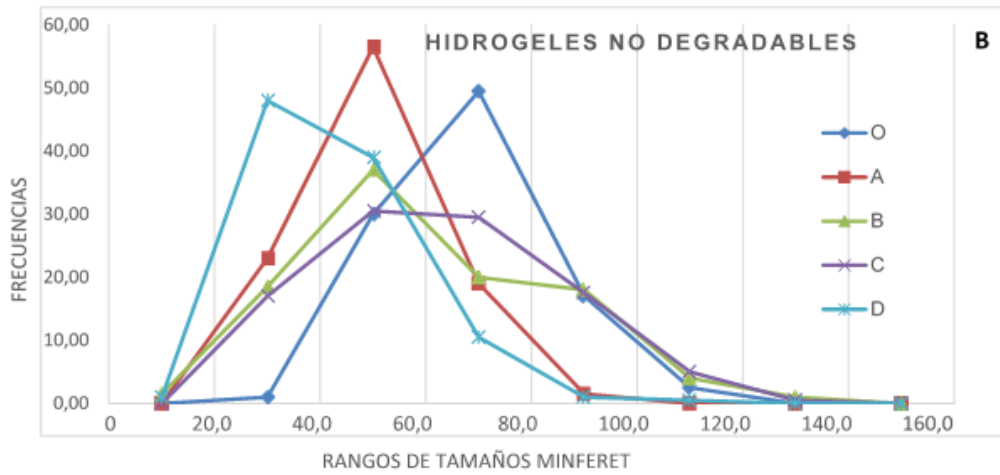


Figura 6: Polígono de frecuencias absolutas de los rangos de tamaños Minferet de los hidrogeles degradables (A) y no degradables (B).