

# USO DE VEHÍCULOS POLIMÉRICOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE INHIBIDORES DEL CANAL Kv1.3



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**  
**Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)**

**Máster en Investigación Biomédica**  
**Memoria para optar al Título de Máster en Investigación**  
**Biomédica presentada por:**  
**Sara Moreno Estar**

Directoras de trabajo  
**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Pérez García**  
**Dra. Pilar Ciudad Velasco**

Valladolid, Septiembre de 2018





## ÍNDICE

GLOSARIO ABREVIATURAS .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 EL SISTEMA CARDIOVASCULAR: ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS .....	3
1.2 LAS CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR (VSMCs): FENOTIPOS .....	4
1.3 CANALES DE K VOLTAJE DEPENDIENTE (KV) Y SU PAPEL EN LA MODULACIÓN FENOTÍPICA: EL CANAL KV1.3 .....	4
1.4 EL REMODELADO VASCULAR Y LA HIPERPLASIA DE LA ÍNTIMA: STENT Y BYPASS CORONARIO COMO CAUSANTES .....	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
3.1. PRIMERA FASE: CULTIVOS CELULARES .....	9
3.1.1 Obtención y mantenimiento de los cultivos .....	9
3.1.2 Tratamientos.....	9
3.1.3 Ensayos de proliferación .....	12
3.2. SEGUNDA FASE: CULTIVO DE ÓRGANOS .....	12
3.2.1 Obtención y manipulación de las muestras.....	12
3.2.2 Tratamientos.....	13
3.2.3 Técnicas histológicas .....	13
3.2.4 Análisis de imágenes.....	15
4. RESULTADOS .....	17
4.1 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE PAP-1 CONTENIDO EN UN POLÍMERO TIPO ELASTINA.....	17
4.1.1 Rejillas .....	17
4.1.2 Gotas .....	20
4.1.3 Estudio del curso temporal de liberación de PAP-1 de rejillas .....	20
4.2 REMODELADO VASCULAR: CARACTERIZACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA DE LA VENA SAFENA EN CULTIVO DE ÓRGANO.....	22
4.2.1 Rejillas .....	22
4.2.2 Gotas .....	23
5 DISCUSIÓN.....	25
5.1 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL PAP-1 CONTENIDO EN UN POLÍMERO DE TIPO ELASTINA.....	26
5.2 REMODELADO VASCULAR: CARACTERIZACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA DE LA VENA SAFENA EN CULTIVO DE ÓRGANOS.....	27
6. CONCLUSIONES .....	29
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	29

## GLOSARIO ABREVIATURAS

- **bFGF** Factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic Fibroblast Growth Factor*)
- **COLMAH** Colección de Muestras de Arterias Humanas
- **DES** Stents Recubiertos (*Drug Eluting Stents*)
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **ECM** Matriz extracelular (*Extracellular Matrix*)
- **EdU** 5-Etínil-2'-deoxiuridina
- **EGF** Factor de crecimiento epidérmico. (*Epidermic Growth Factor*).
- **ELRs** Polímero recombinante tipo elastina (*Elastin Like Recombinamers*)
- **FBS** Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- **hVSMCs** Células de músculo liso vascular humanas (*human Vascular Smooth Muscle Cells*)
- **IH:** Hiperplasia de la íntima (*Intimal Hyperplasia*)
- **Kv** Canal de potasio dependiente de voltaje
- **MA** Arteria mamaria (Mammary Artery)
- **MAPKS** (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)
- **MEM** Medio esencial mínimo (*Minimun Essential Medium*)
- **MgTx** Margatoxina
- **mTOR** Diana de rapamicina en mamíferos (*mammalian Target Of Rapamycin*)
- **PAP-1** 5-(4-fenoxibutoxi)psoralen
- **PBS** Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)
- **PDGF** Factor de crecimiento plaquetario (*Platelet Derived Growth Factor*)
- **PI3K** Phosphoinositide 3 Kinase
- **PM** Modulación fenotípica (*Phenotypic Modulation*)
- **RA** Arterias renales (*Renal Artery*)
- **RT** Temperatura ambiente (*Room Temperature*)
- **SEM** Error estándar de la media (*Standard Error of Mean*)
- **SV** Vena safena (Saphenous Vein)
- **TEM** Square 50 mesh Tabbed Grids Nickel
- **VSMCs** Células de músculo liso vascular (*Vascular Smooth Muscle Cells*)
- **5-MOP** 5-Methoxypsoralen

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR: ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

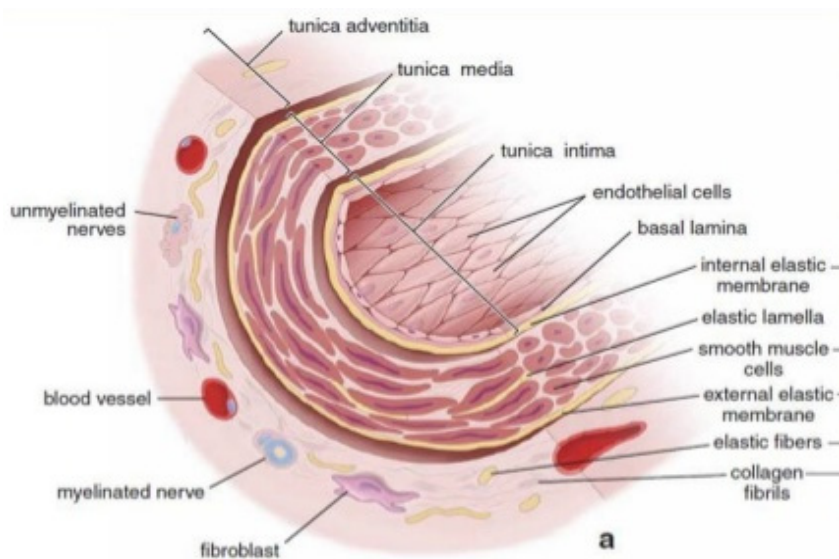
El sistema cardiovascular está formado por el corazón y una red de vasos (arterias, venas y capilares) cuya misión principal es mantener una adecuada perfusión a todos los tejidos del organismo además de conservar y amortiguar las oscilaciones de la presión sanguínea<sup>1</sup>.

La pared de los vasos sanguíneos está formada por tres capas que de fuera a dentro son: túnica adventicia, túnica media y túnica íntima. Estas estructuras se encuentran bien conservadas en la mayoría de los vasos (excepto los capilares que carecen de túnica media) aunque dependiendo del tipo de vaso y la localización puede presentar ciertas variaciones de grosor y composición<sup>2</sup>.

La **túnica adventicia** es una envoltura de tejido conectivo con un borde difuso que une el vaso con los tejidos colindantes. En su composición mayoritariamente se halla colágeno, fibroblastos y progenitores celulares y terminaciones nerviosas<sup>3,4</sup>. En la adventicia de las grandes arterias y venas se pueden encontrar pequeños vasos sanguíneos denominados “vaso vasorum”<sup>2</sup>.

La **túnica media** es la que suministra el poder contráctil a los vasos ya que está formada por células del músculo liso vascular (VSMCs). Las VSMCs son células fusiformes dispuestas helicoidalmente en una matriz de elastina y fibras de colágeno. Dependiendo del número y disposición de las VSMCs, el vaso tendrá un mayor o menor poder de contracción. Esta capa es más gruesa en arterias que en venas<sup>3</sup>. La túnica media está delimitada por capas de elastina, denominadas lámina elástica interna y externa respectivamente<sup>2,3</sup>.

Por último, la **túnica íntima** está formada por una monocapa de células endoteliales aplanadas dispuestas longitudinalmente sobre una capa de tejido conectivo compuesta de colágeno y proteoglicanos<sup>4</sup>. Estas células pueden proyectarse en ciertas zonas atravesando la lámina elástica interna y entrar en contacto con las VSMCs<sup>2</sup>.

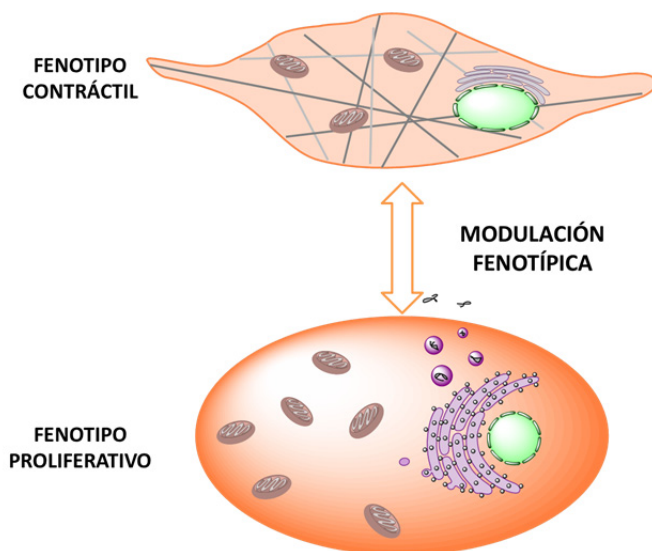


**FIGURA 1.** Esquema de estructura de la pared vascular mostrando las tunicas vasculares; íntima, media y adventicia. Las VSMCs se encuentran en la túnica media. (Modificado de referencia 5)

## 1.2. LAS CÉLULAS DEL MÚSCULO LISO VASCULAR (VSMCs): FENOTIPOS

Las VSMCs pueden presentar dos fenotipos extremos: células fusiformes de fenotipo contráctil que se encuentran en estado quiescente y células epiteloideas con fenotipo sintético, aunque puede haber situaciones de diferenciación intermedias entre ambos.

La principal función de las VSMCs es la contracción, que permite regular el tono y el diámetro vascular<sup>1</sup>. En su estado diferenciado de fenotipo contráctil, estas células presentan una composición estable de proteínas contráctiles, como  $\alpha$ -actina y miosina de cadena pesada, h1-calponina, etc., receptores y canales iónicos que permiten la regulación del tono vascular. Además, debido a la alta tasa de diferenciación, presentan bajo grado de proliferación, migración y producción de proteínas de matriz extracelular (ECM). Sin embargo son células con gran plasticidad, incluso en animales adultos, y responden a señales ambientales, siendo capaces de cambiar de un fenotipo contráctil a un fenotipo desdiferenciado, en el que disminuye la expresión de proteínas contráctiles y aumenta la de proteínas relacionadas con la síntesis de ECM, la migración y la proliferación (**FIGURA 2**). Este cambio se conoce como **cambio fenotípico o modulación fenotípica** (PM)<sup>6-8</sup>.



**FIGURA 2.** Modulación fenotípica en células VSMCs. En el fenotipo contráctil las VSMC son células diferenciadas, de aspecto fusiforme que contienen proteínas contráctiles como filamentos de actina y miosina. El fenotipo proliferativo presenta abundante retículo endoplasmático rugoso que permite la síntesis de proteínas asociadas a las funciones migratorias y de proliferación, así como de proteínas secretadas.

La PM permite a las VSMCs realizar una amplia gama de funciones fisiológicas durante el desarrollo y la maduración de los órganos, así como reparar lesiones producidas por agentes físicos, químicos o inmunológicos. Además, la presencia de un fenotipo u otro también depende de la ubicación anatómica de los vasos<sup>6</sup>. Sin embargo, aparte de su papel fisiológico, la PM juega un rol muy importante en el desarrollo de múltiples patologías vasculares: aterosclerosis, restenosis postangioplastia, hipertensión, etc.<sup>7, 8</sup>.

## 1.3. CANALES DE K VOLTAJE DEPENDIENTE (KV) Y SU PAPEL EN LA PM: EL CANAL KV1.3

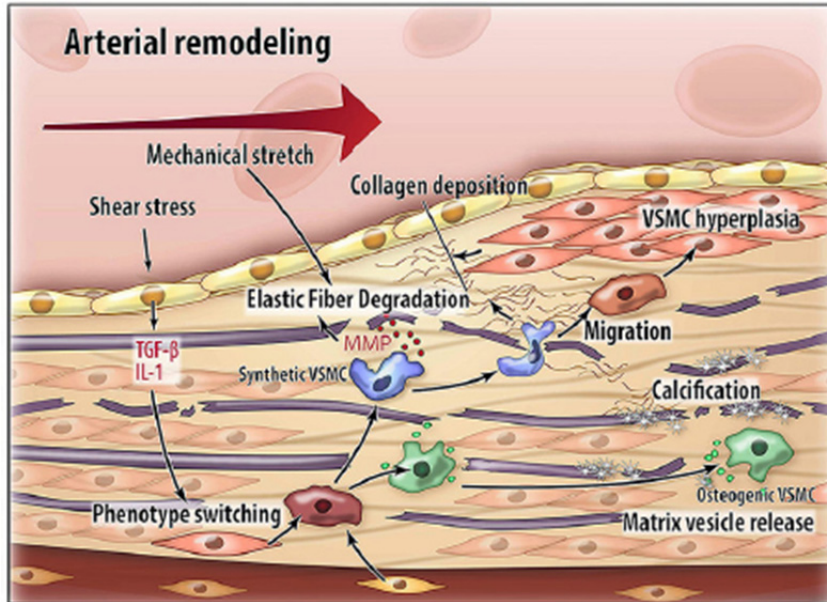
Las VSMCs presentan una gran variedad de canales Kv, cuya expresión es diferente en función del lecho vascular y el tamaño del vaso. Los canales Kv juegan un papel fundamental en la respuesta contráctil, regulando el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y el potencial de membrana<sup>9</sup>. Ambos mecanismos están implicados a su vez en funciones celulares básicas como la proliferación, migración y secreción celular<sup>8</sup>.

Dentro de los tipos de Kv, el canal Kv1.3 ha sido ampliamente estudiado en diferentes tipos celulares (Linfocitos T, células endoteliales, microglía, células cancerosas...) como responsable de la regulación del ciclo celular<sup>7</sup>. En muchos de estos sistemas se ha demostrado que sus inhibidores específicos (como el 5-(4-fenoxibutoxi)-psoraleno (PAP-1) o la margatoxina (MgTx)) inhiben la proliferación celular, mientras que los activadores la estimulan<sup>8</sup>. Este resultado se ha observado también en VSMCs de distintos lechos vasculares y distintas especies, incluyendo la humana<sup>7, 10</sup>.

Un estudio previo de nuestro grupo de investigación analizó la expresión de múltiples canales iónicos presentes en VSMCs derivadas de arterias femorales de ratón. Utilizaron dos modelos proliferativos: un modelo *in vivo* en el que se inducía una lesión endoluminal generando formación de neointima y otro modelo *in vitro* para el que se usó un cultivo celular de VSMCs derivado de explantes arteriales. Se demostró una buena correlación entre los modelos, ya que los cambios de expresión eran similares en ambos<sup>8</sup>. Además, sólo dos genes de los 96 analizados mostraron un aumento significativo en su expresión: El canal Kv1.3 y la subunidad Kv $\beta$ 2, que actúa de chaperona<sup>7</sup>. Este hallazgo, junto con las anteriores evidencias sugiere que el Kv1.3 juega un papel fundamental en la PM y su posible rol como diana terapéutica para controlar la proliferación patológica producida en las lesiones vasculares.

#### 1.4. EL REMODELADO VASCULAR Y LA HIPERPLASIA DE LA ÍNTIMA (IH): STENT Y BYPASS CORONARIO COMO CAUSANTES

La pared vascular es una estructura activa, expuesta a variaciones dinámicas en la presión y el flujo así como a otros factores químicos o inmunológicos. Es capaz de detectar cambios, tanto fisiológicos como patológicos y responder con modificaciones en su diámetro y grosor<sup>11</sup>, lo que se conoce como remodelado vascular.



**FIGURA 3.** Esquema del proceso de remodelado vascular, incluye el cambio fenotípico y la migración y proliferación de las VSMCs, lo que conlleva a un aumento del grosor de la pared. (Modificada de referencia 1)

El remodelado vascular es un proceso de alteración estructural que involucra varios procesos celulares: proliferación, apoptosis, migración y alteración de la matriz extracelular<sup>1, 11</sup>. Es una respuesta homeostática que intenta compensar las oscilaciones en la presión y en la velocidad sanguínea, así como reparar posibles daños en los vasos. Por ejemplo, ante un aumento mantenido de la tensión vascular, el vaso responde con un engrosamiento de la pared que debería mejorar la contracción<sup>12</sup>. Aunque también es un proceso asociado a la edad, si ocurre de forma

temprana y crónica puede determinar alteraciones de la función de los vasos sanguíneos contribuyendo a la enfermedad cardiovascular<sup>1</sup>.

En el remodelado vascular se incluyen mecanismos como la fibrosis, (en la que los miofibroblastos migran a través de las capas de la pared vascular, engrosando la adventicia<sup>12</sup>), cambios en el colágeno, la elastina y la lámina elástica, disfunción endotelial, calcificación arterial e hiperplasia de la túnica íntima (debida a la proliferación y migración de las VSMCs de la media a la íntima), lo que a su vez se asocia con un cambio en su fenotipo de contráctil a proliferativo<sup>1, 13</sup>.

La **IH** es un tipo de remodelado que tiene lugar tras la reparación de una lesión, ya sea de tipo mecánica, inmune o quirúrgica. Tras el daño las VSMCs proliferan y migran de la túnica media a la íntima, lo que produce un engrosamiento de la pared vascular y una pérdida gradual de la luz del vaso. Si el daño se ha producido tras una cirugía, puede desembocar en un fracaso de la intervención por la restenosis del vaso<sup>14</sup>.

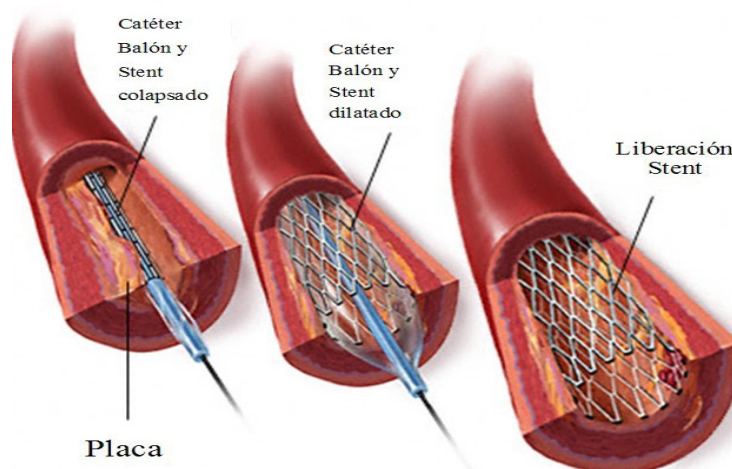
Hay dos tipos principales de cirugías que pueden dar lugar a IH: la angioplastia con o sin colocación de stent y el injerto de bypass en arteria coronaria<sup>13</sup>. El bypass coronario ha sido el procedimiento de elección para el tratamiento de la estenosis vascular y la isquemia aguda, hasta la incorporación del stent coronario tal y como lo conocemos hoy<sup>15</sup>.

#### 1.4.1. IH del injerto venoso asociado a bypass de la arteria coronaria.

La revascularización con autoinjerto venosos o bypass coronario ha sido la técnica por excelencia en el tratamiento de enfermedad coronaria multivaso. Su éxito se ha visto limitado por la baja vida media del injerto, ya que la incidencia de trombosis e IH se sitúa en torno al 15% de los casos<sup>12</sup>.

La SV es el vaso más utilizado en pacientes con afectación multivaso. Su localización superficial<sup>13</sup> hace que sea fácil y rápida de obtener, además de proporcionar un injerto de elevada longitud que permite reparar múltiples zonas. Sin embargo, su uso no está exento de limitaciones, su eficacia a largo plazo se ve comprometida por el desarrollo de inflamación vascular, IH debida a la migración de VSMCs desde la túnica media y aterosclerosis, que conducen en muchos casos al fallo del injerto. Otro vaso ampliamente empleado es la arteria mamaria (MA), Ofrece una supervivencia del injerto mayor, pero debido a que su accesibilidad y a que su tamaño es menor, se reserva para casos en los que la afección coronaria compromete un único vaso<sup>15</sup>.

**FIGURA 4.** Angioplastia coronaria con stent. Con ayuda de un catéter se introduce un globo en el vaso ocluido, se dilata el balón dejando colocado un stent que mantendrá el vaso abierto. (Tomada de referencia 16)

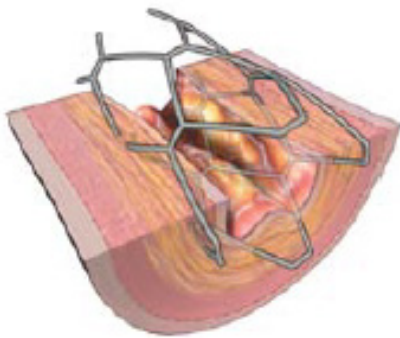




#### 1.4.2. IH post-angioplastia con o sin colocación de un stent coronario.

La angioplastia es una técnica utilizada para el tratamiento de enfermedad coronaria. Consiste en la introducción en la arteria coronaria, de un catéter con un globo que al hincharse y volverse a deshinchar restablece el flujo sanguíneo (**FIGURA 4**). Con el globo, hoy en día se introduce un stent que servirá de sostén para que la arteria no vuelva a ocluirse<sup>17</sup>.

Los primeros stents diseñados consistían en una malla metálica de acero inoxidable que recubría la pared interior del vaso y permitía el flujo sanguíneo, pero los resultados a largo plazo no eran muy favorables: la lesión mecánica inducida por el stent inducía IH, llevando al fracaso por restenosis del vaso. Posteriormente se desarrollaron stent recubiertos de matrices liberadoras de fármacos (DES) inmunosupresores o antiproliferativos dado el componente inflamatorio y proliferativo de las lesiones. Actualmente los DES aprobados para su uso en clínica contienen fármacos como el paclitaxel (comercializado como taxol, que es un agente antimitótico que estabiliza los microtúbulos) o inhibidores de la mTOR como el sirolimus o everolimus, inmunosupresores y antiproliferativos. Estos avances han permitido reducir drásticamente los ratios de restenosis<sup>12</sup>.



**FIGURA 5.** Restenosis de un stent metálico, debido a una IH. La lesión mecánica producida por la colocación del stent induce una modulación fenotípica, y las VSMCs desdiferenciadas acaban ocluyendo la luz del vaso. (Modificada de referencia 18)

La tendencia actual consiste en el desarrollo de stents o plataformas recubiertas de polímeros que proporcionen un sostén inicial, cuando la reoclusión puede suponer un problema, y sean capaces de liberar fármacos que permitan la curación y eviten la IH asociada a la matriz metálica<sup>17</sup>.

Los fármacos más comúnmente utilizados, nombrados anteriormente, son potentes agentes antiproliferativos pero muy inespecíficos. No sólo inhiben la proliferación de las VSMCs sino también la reendotelización, la cicatrización de la capa endotelial, lo que facilita la adhesión plaquetaria, llevando a la trombosis del stent y a la reoclusión<sup>19</sup>. Es decir, los nuevos DES disminuyen la IH, pero generan un nuevo problema.

A pesar de los grandes avances que han tenido lugar en la manipulación quirúrgica de los bypas y en la colocación de los stents, que minimiza en gran medida el daño, muy pocos estudios farmacológicos han podido mejorar la viabilidad a largo plazo de las intervenciones<sup>15</sup>. Por otro lado, aunque se han conseguido DES que disminuyen las tasas de fallos, la restenosis y la aterosclerosis acelerada siguen siendo un problema que limita el éxito a largo plazo de las cirugías vasculares, tanto en la angioplastia coronaria como en la supervivencia de los trasplantes de órganos sólidos. La búsqueda de agentes farmacológicos y soportes que aumenten la eficacia de estos procesos, sigue siendo un reto, dado el importante impacto socio-económico y la prevalencia de estas enfermedades en la sociedad actual.

## 2. OBJETIVOS

En este trabajo se pretenden sentar las bases para un nuevo stent liberador de un inhibidor del Kv 1.3, que gracias a su recubrimiento con un polímero biocompatible recombinante tipo elastina, forma un hidrogel que podría ser adecuado para almacenar y liberar el inhibidor. Se han realizado ensayos en cultivo celular de VSMCs y en cultivo de órgano de vena safena.

El **objetivo principal** propuesto es la caracterización de la liberación de PAP-1 desde un agente polimérico y el estudio de su efecto sobre las VSMCs.

Para alcanzarlo, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar la biocompatibilidad y seguridad del ELR utilizado sobre cultivos de VSMCs.
2. Estudiar y comparar el efecto inhibitorio del PAP-1 libre con el liberado de una matriz polimérica en diferentes lechos vasculares de VSMCs.
3. Comparar la eficacia en cuanto a liberación de PAP-1 de diferentes soportes recubiertos con el mismo ELR (rejillas y gotas) sobre cultivo de VSMCs.
4. Comprobar si la liberación de fármaco es mantenida y suficiente a diferentes tiempos.
5. Caracterizar el remodelado de la SV en presencia de los soportes rejilla y gota con y sin el inhibidor PAP-1.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La realización de este trabajo ha tenido lugar en dos fases. En la primera, los ensayos se han llevado a cabo en cultivos celulares primarios y, en la segunda, en cultivo de órgano.

#### 3.1. PRIMERA FASE: CULTIVOS CELULARES

##### 3.1.1. Obtención y mantenimiento de los cultivos

###### a) Obtención de diferentes tipos celulares

Para la realización de la primera fase, se han utilizado cultivos primarios de células humanas de músculo liso vascular (hVSMCs), derivadas de arterias renales (RA), MA y SV de donantes anónimos, pertenecientes a la colección COLMAH.

Tras limpiar el vaso dejando sólo la capa muscular (túnica media), la muestra se troceó en pequeños fragmentos que se sembraron en explantes. Al cabo de unas semanas, las hVSMCs proliferan y migran desde los explantes a la placa, dando lugar a una línea celular primaria<sup>20</sup>.

###### b) Mantenimiento de cultivos celulares

Las hVSMC se mantienen en medio de cultivo *Minimun Essential Medium* (MEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), insulina (5 µg/ml, Gibco®), L-glutamina (2mM, Lonza®), factores de crecimiento (bFGF, 2 ng/ml, y EGF, 5ng/ml Gibco®) y un cóctel de antibióticos (composición en Anexo).

Las células se manipulan siempre en una campana de flujo laminar (Telstar Biostar) con filtro HEPA que retiene partículas superiores a 0.2µm con una eficacia del 99.9% y utilizando material y soluciones estériles. Los cultivos se han mantenido en un incubador de CO<sub>2</sub> (Hera Cell 150) bajo atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

Las hVSMCs son células adherentes y por tanto para poder subcultivarlas y/o congelarlas es necesario despegarlas mediante tripsinización, añadiendo tripsina EDTA (0.02% de EDTA y 0.05% de tripsina en PBS). A continuación se centrifugan y se resuspende el pellet para poder después contarlas con una cámara de Neubauer.

###### c) Siembra en cristales

Las hVSMCs se sembraron sobre cristales de 12 mm de diámetro tratados con fibronectina (10 minutos, sin lavar) para favorecer la adhesión celular. Los cristales se colocaron en placas de 4 pocillos de 15 mm de diámetro cada uno. Dependiendo del tipo celular, se sembraron entre 25000-35000 células/cristal, para obtener una confluencia de partida en torno a un 50-60%. Las células se dejaron 12-18 horas en medio de cultivo antes de comenzar los ensayos. Los cultivos utilizados se encontraban entre los pases 2-8 lo que asegura la viabilidad celular y validez del modelo.

##### 3.1.2. Tratamientos

Como ya se ha explicado, el objetivo de este trabajo es comparar la eficacia en inhibir la proliferación de las hVSMCs de un inhibidor del canal Kv1.3, el PAP-1, libre en el medio de cultivo o liberado por un agente polimérico.

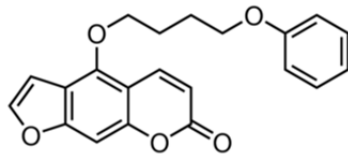
###### a) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Como estímulo para la proliferación se ha utilizado el PDGF, que es el quimioatrayente más potente conocido para las VSMCs. Cuando se une a su receptor tirosin-kinasa, éste se autofosforila activando la vías de las MAPKs (mitogen-activated protein kinases) y de la PI3K (phosphoinositide 3 kinase)<sup>20</sup>.

## b) PAP-1

Los inhibidores del canal Kv1.3 se pueden clasificar en dos grandes familias. Por un lado están los obtenidos a partir de combinaciones de librerías de compuestos sintéticos, con estructuras simples y relativa selectividad. Por otro lado, se encuentran los productos naturales y sus derivados, como el PAP-1 o péptidos como el Shk, los cuales son bloqueadores muy potentes y altamente selectivos<sup>22, 23</sup>.

El PAP-1 es una molécula pequeña derivada del 5-methoxypsoraleno (5-MOP), principio activo de la planta *Ruta graveolens*. Se obtiene por síntesis química y es de 23 a 125 veces más selectivo para Kv1.3 que para otros miembros de la familia, con una IC<sub>50</sub> de 2nM. Se necesitan dos moléculas de PAP-1 para inhibir un canal<sup>22, 23</sup>.

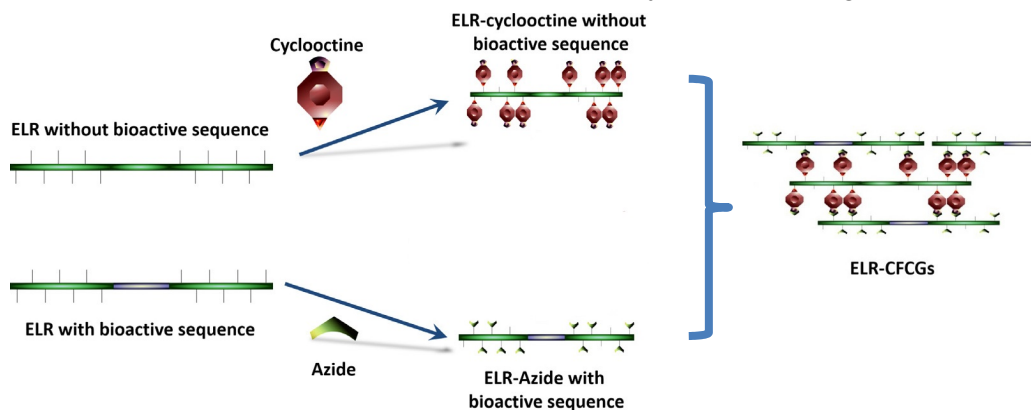


**FIGURA 6.** Estructura molecular del inhibidor del canal Kv 1.3 PAP-1. (Modificado de referencia 22)

## c) ELRs

Como vehículo para este inhibidor se ha utilizado un hidrogel formado por ELRs. Son polímeros basados en la secuencia primaria de la elastina y producidos por técnicas recombinantes. Muestran una alta bio y hemocompatibilidad (demostrado por ensayos de proliferación celular, trombogenicidad y evaluación de la respuesta inflamatoria aguda y crónica), ya que están formados por repeticiones de secuencias de aminoácidos ignoradas por el sistema inmune del hospedador y por los sistemas de degradación, lo que les otorga alta estabilidad en el tiempo. Todas estas características hacen que sean candidatos perfectos para ser utilizados como matriz liberadora de fármacos para el recubrimiento, por ejemplo, de stents coronarios<sup>19, 21</sup>.

En concreto en este trabajo, se han utilizado dos ELRs modificados químicamente (proporcionados por el grupo Bioforge de la Universidad de Valladolid), uno de ellos es portador de un derivado ciclooctino y el otro de un grupo azida.



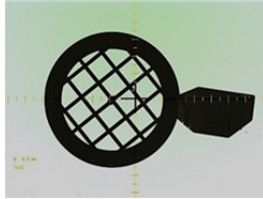
**FIGURA 7.** Representación del entrecruzamiento químico de los biopolímeros modificados mediante la química "click". (Modificado de la referencia 19)

Estas modificaciones tienen lugar en un grupo amino terminal situado en la cadena lateral de las lisinas y permiten la reacción entre ambos polímeros disueltos (en solución acuosa a la misma concentración) mediante la química click (cicloadiación 1,3-dipolar entre un grupo azida y un alquino), dando lugar a un hidrogel. Este hidrogel

tiene la ventaja de que puede formarse en condiciones fisiológicas, ya que no necesita un catalizador (tipo cobre) para que se produzca la reacción<sup>19, 21</sup>.

El hidrogel se ha utilizado en dos soportes diferentes:

**Rejillas recubiertas de hidrogel:** Como modelo de stent coronario se han utilizado rejillas de TEM (Square 50 mesh Tabbed Grids Nickel) de un diámetro de 3.05 mm. Este soporte se ha elegido teniendo en cuenta las dimensiones y los materiales reales de los stents.



**FIGURA 8.** Fotografía del soporte rejilla sin recubrir, utilizada en los ensayos descritos, formada a partir de una aleación de níquel, material similar a los stents utilizados actualmente.

**Gotas de hidrogel:** Otro modelo utilizado como matriz liberadora de fármaco ha sido el propio hidrogel liofilizado, sin soporte metálico.

d) Diseño y condiciones experimentales

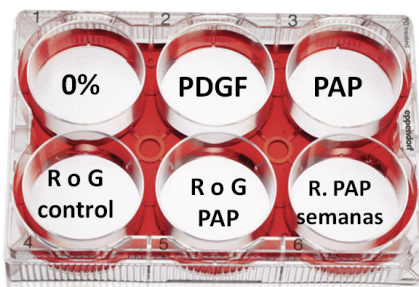
Para la realización de los ensayos celulares se partió de medio MEM, con 2 mM L-glutamina, y 1% del cóctel de antibióticos. A partir de este medio, al que denominaremos medio 0%, se preparó el medio PDGF, con 20 ng/ml de PDGF. El medio PDGF será nuestro control positivo de proliferación. Finalmente se preparó el medio PAP-1 añadiendo este bloqueante a una concentración final de 100 nM sobre el medio PDGF.

En alguno de los ensayos se probaron rejillas que habían estado durante 1, 2 ó 4 semanas en medio 0%, para probar la eficacia de la liberación a largo plazo. Las rejillas se dejaron en pocillos con 500µl de medio 0%, que se cambió cada 2 días.

Tanto con las rejillas como con las gotas, se dispuso de controles negativos en los que solo está presente el hidrogel sin fármaco y la condición experimental, hidrogel que lleva encapsulado en su matriz proteica el inhibidor PAP-1. La liberación de PAP-1 oscila entre los 100-300 nM, por día en agua.

En resumen las condiciones experimentales han sido (**FIGURA 9**):

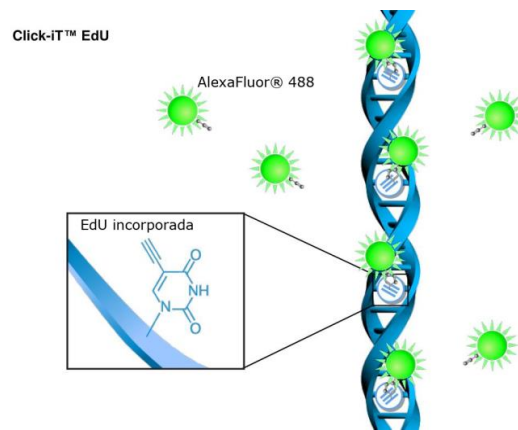
- Control negativo de la proliferación: Medio 0%
- Control positivo de la proliferación: Medio PDGF
- Control del efecto del bloqueo del canal Kv1.3: PDGF+ PAP-1 (Medio PAP-1)
- Rejilla/Gota control: Medio PDGF + Rejilla/Gota en suspensión
- Rejilla/Gota con PAP-1: Medio PDGF + Rejilla/Gota con PAP-1 en suspensión
- Rejilla PAP de 1, 2 o 4 semanas: Medio PDGF + Rejilla en suspensión



**FIGURA 9.** Esquema de los controles y las condiciones experimentales de los ensayos de proliferación celular en cultivo de VSMCs. Los tratamientos se aplicaron durante 24 horas. Todas las condiciones se hicieron por duplicado en cada ensayo. R= rejilla; G=Gota.

### 3.1.3. Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación celular se realizaron utilizando el kit comercial Click-iT<sup>®</sup> EdU Cell Proliferation Assay (Invitrogen), que se basa en la incorporación de EdU (5-etinil-2'-deoxyuridina), análogo de la timidina, en la síntesis de nuevas cadenas de DNA en células que se encuentran en fase S del ciclo celular. La adición de azida AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (verde), que reacciona con un grupo alquino presente en el EdU (reacción click, **FIGURA 10**), permite su detección.



**FIGURA 10.** Reacción click. Las células en estado proliferativo incorporan EdU a su DNA por analogía con la timidina. Al añadir el azida AlexaFluor 488, se une con el EdU y se detecta por fluorescencia.

Por otro lado, se marcan todos los núcleos con el fluoróforo Hoechst<sup>®</sup> 33342 (azul), permitiendo contabilizar el número de células totales y determinar el porcentaje por campo que incorporan EdU.

Las células sembradas en cristales se sometieron a los distintos tratamientos durante 24 h. Después se añadió al medio EdU 20µM durante 6 horas y a continuación se fijaron las células con paraformaldehído al 4% 15 minutos a temperatura ambiente (RT) y se procedió a la realización del ensayo Click-iT<sup>®</sup> según las instrucciones del fabricante. Por último, se montaron los cristales en portaobjetos con medio de montaje Vectashield<sup>®</sup>.

La proliferación se estima como el porcentaje de células que incorporan Edu (Edu+) respecto del total de células teñidas con Hoechst. En cada experimento la incorporación de Edu se obtiene a partir de la media de 10 campos por condición. Las imágenes se adquirieron con el objetivo 20x y los filtros UV-2A (Ex 330-380) y B-2A (Ex 450-490) de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i. La cuantificación del número de células se realizó con el programa ImageJ<sup>®</sup>.

La proliferación en presencia de PDGF se tomó como control en este grupo de experimentos.

## 3.2. SEGUNDA FASE: CULTIVO DE ÓRGANOS

### 3.2.1. Obtención y manipulación de las muestras

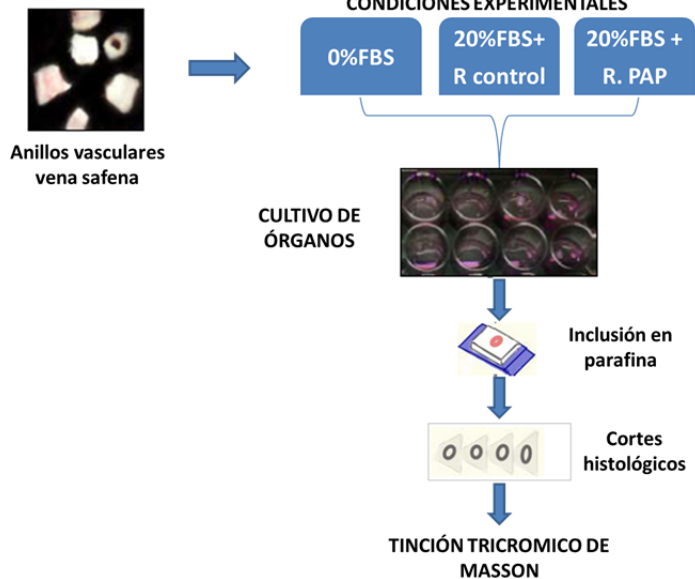
#### a) Obtención de anillos vasculares

Para realizar la segunda parte del trabajo, se utilizaron muestras de SV de pacientes anónimos sometidos a cirugía de bypass coronario en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Las muestras vasculares se mantuvieron en medio de cultivo MEM a 4°C durante 2-24 h tras su extracción. Una vez recibidas, se lavaron en solución Tyrode cirugía (composición en Anexo).

Mediante una ligera agitación, se eliminaron los restos de sangre y se pasaron a una placa de Petri que posee una base de elastómero de silicona para poder fijar la muestra con pinchos de acero inoxidable. La placa se mantuvo a 4°C en un baño de hielo y bajo lupa de disección se procedió a la eliminación del tejido adiposo que cubre el vaso. A continuación el tejido se cortó en pequeños "anillos" de entre 0.25 y 0.5 cm de longitud.

**FIGURA 11.** Esquema general de trabajo en el cultivo de órgano. Las muestras se diseccionan bajo la lupa, y tras su tratamiento se procesan para analizar los cambios sufridos por la pared vascular.



b) Mantenimiento de cultivo de órganos

El cultivo de órganos es una técnica utilizada para mantener un tejido vivo fuera de su organismo, simulando su entorno *in vivo*, para de esta forma poder estudiar su respuesta a diferentes condiciones experimentales.

Tras la cirugía, los anillos vasculares se lavaron repetidamente (10-15 veces 5 minutos) con Phosphate Buffered Saline (PBS) con un 3% del cóctel de antibióticos para evitar que se contamine el cultivo.

Posteriormente, se colocó un anillo vascular por pocillo, en placas de 4 pocillos y se incubaron en medio de cultivo MEM, complementado con 2 mM de L-glutamina y un 2% del cóctel de antibióticos. Los anillos se mantienen en cultivo de órgano durante 2 semanas en un incubador Binder CB150 con un 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37 °C, realizando un cambio de medio cada 48 horas. Todos los procedimientos de cultivos de órgano se llevaron a cabo dentro de una campana de flujo laminar (Telstar Biostar).

### 3.2.2. Tratamientos

Los tratamientos realizados en el cultivo de órganos son similares a los explicados en el apartado 3.1.2, pero las condiciones experimentales se han reducido dada la escasa longitud de las muestras que han sido proporcionadas a:

- Control negativo de proliferación: Medio 0% de Suero fetal bobino (FBS)
- Control positivo de proliferación: Medio 20%FBS, con gota/rejilla control
- Condición problema: Medio 20% FBS, con gota/rejilla con PAP-1

En este caso, como estimulante de la proliferación, se ha utilizado FBS al 20%. Puesto que el remodelado en cultivo de órganos es evidente al cabo de unas dos semanas, este ha sido el tiempo que se han mantenido los anillos vasculares en cultivo de órgano.

### 3.2.3. Técnicas histológicas

a) Preparación del tejido para técnicas histológicas

**Fijación en paraformaldehído:** Los anillos vasculares se lavaron con PBS (4x) durante 10 minutos para eliminar los restos de medio de cultivo y FBS. Después, se mantuvieron en paraformaldehído (Sigma-Aldrich®) al 4% en PBS durante toda la noche. A continuación, las muestras se lavaron nuevamente con PBS (4x) 10 minutos y se mantuvieron en etanol al 70% hasta el siguiente paso.

**Inclusión en parafina:** La inclusión en parafina consiste en sustituir el agua de los tejidos por parafina, lo que permite cortar y teñir las muestras para su posterior análisis. Se utilizó el Procesador de Tejidos STP120 (Microm®) para realizar la

inclusión en parafina de los anillos de forma automática y el centro de inclusión EC350 (Especialidades Médicas Myr, S.L.) para realizar los bloques de parafina.

Los anillos vasculares se colocaron en cassettes de inclusión previamente identificados. Estos cassettes se introdujeron en el procesador de tejido, en el que primero tiene lugar la deshidratación de las muestras, que pasan por concentraciones crecientes de alcohol, después se sustituye el agua de las muestras por xileno y por último por parafina. (El programa completo se encuentra en el Anexo).

A continuación, se procedió a realizar los bloques de parafina. En un molde metálico con parafina líquida se colocó el anillo con la orientación adecuada para realizar los cortes, se dejó enfriar y se desmoldó.

**Cortes en parafina:** Los cortes de los anillos se realizaron transversalmente con un grosor de 6-7µm en un Microtomo de Rotación HM 340 E (Micron®). Inmediatamente después, se colocaron en un baño termostático a 40°C y se recogieron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Thermo Scientific®). Las secciones se dejaron secar toda la noche en una estufa a 37°C.

**Desparafinización y rehidratación de los cortes:** Para desparafinar las muestras, se introdujeron de forma consecutiva en tres cubetas de xileno, durante 5 minutos en cada una (en campana de extracción). Para rehidratar las muestras, se utilizaron soluciones acuosas con cantidades de alcohol decreciente y se introdujeron en agua destilada. (Secuencia completa en el Anexo).

b) Tinción: Tricrómico de Masson

Esta tinción utiliza tres colorantes, lo que permite marcar en diferentes colores núcleos celulares, tejido muscular y fibras de colágeno. La composición de las soluciones se recoge en el Anexo. Los pasos a seguir fueron:

**Fijación en solución de Bouin:** Permite fijar los tejidos y una mejor tinción. Las muestras se introdujeron en solución de Bouin (Panreac®) durante 48h a temperatura ambiente. Después, los portaobjetos se lavaron en agua corriente hasta la desaparición del color amarillo y en agua destilada durante 2 minutos.

**Hematoxilina férrica de Weigert:** Tinción básica que permite teñir de morado oscuro-negro los núcleos celulares. Las muestras se mantuvieron 30 minutos en hematoxilina. Después, se lavaron en agua corriente 5 minutos y agua destilada durante 2 minutos.

**Escarlata de Biebrich y Fucsina ácida:** Permite teñir el músculo en tonos rosas. Las muestras se mantuvieron 20 minutos en este colorante. Se lavó el colorante con agua destilada (3x2 minutos).

**Ácido fosfotúngstico:** Diferenciador, se une a las moléculas ya teñidas para bloquear otras tinciones. Se introdujeron los portaobjetos 8 minutos en ácido fosfotúngstico (Sigma-Aldrich®) al 5% en agua destilada.

**Verde luz:** Tiñe de verde el colágeno. Se dejaron las muestras durante 2 minutos en una solución de verde luz al 2% y ácido acético al 1%. Después se lavó 3x2 minutos con agua destilada.

**Ácido acético:** Preservante del tejido. Se colocaron los cortes en ácido acético (Merck®) durante 3 minutos. Esta solución se preparó a partir de ácido acético glacial en una concentración del 1% en agua destilada.

**Deshidratación y aclarado:** Para la deshidratación se pasaron las muestras de forma consecutiva por soluciones acuosas con cantidades de alcohol crecientes. (Secuencia completa en el Anexo).

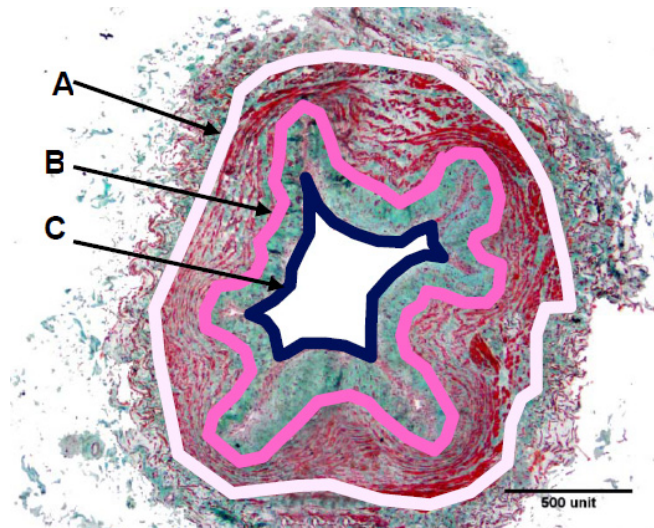


**Montaje:** El medio de montaje utilizado fue Eukitt (Kindler®). Se pusieron unas gotas de Eukitt en cada portaobjeto y se colocó un cubreobjetos de manera que todos los cortes quedaran cubiertos. Se dejó secar toda la noche en campana de extracción. Después de este proceso, en las muestras vamos a poder diferenciar:

- Núcleos celulares: morado oscuro negro, teñidos por la Hematoxilina
- Músculo, citoplasma y hematíes; en tonos rosas y rojos, teñidos por la escarlata de Biebrich y la fucsina ácida
- Fibras de colágeno y tejido conjuntivo en general; verde, teñidos por el verde luz

### 3.2.4. Análisis de imágenes

Para realizar el análisis de las muestras histológicas, en primer lugar se adquirieron imágenes de los cortes teñidos con tricrómico de Masson con la cámara CCD NIKON DS-Ri1 asociada al microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse 90i, utilizando los objetivos 4x y 10x. Las fotografías se analizaron con el programa Image J® (FIJI). El análisis consistió en realizar medidas de las distintas capas vasculares (áreas y perímetros definidos en la **FIGURA 12**). En este grupo de experimentos se tomó como control el anillo con 0% de FBS.



**FIGURA 12.** Imagen de una SV con las medidas tomadas. **C**, marcado en azul oscuro representa el área de la luz del vaso y el perímetro de la luz. **B**, en rosa, es el límite entre la túnica íntima y la túnica media, representa el área de la luz más el área de la íntima y el perímetro de la íntima. **A**, blanco, marca el límite entre la túnica media y la adventicia y representa el área de luz más la íntima más la media y el perímetro de la media.

NOMBRE	FÓRMULA
Área media	= A – B
Área íntima	= B – C
Diámetro total	= A (perímetro) / $\pi$
Radio total	= Diámetro / 2
Área total (a partir del perímetro)	= $\pi \times (\text{radio}^2)$
Área luz	= Área total - (área media + área íntima)
Porcentaje estenosis	= Área íntima / (Área íntima + área luz) x 100
Porcentaje luz	= Área luz / área total x 100
Porcentaje íntima	= Área íntima / área total x 100
Porcentaje media	= Área media / área total x 100
Ratio íntima / media	= Área íntima / Área media

**TABLA 1** Cálculos realizados a partir de las áreas A, B y C, utilizadas para el posterior análisis del remodelado vascular. Áreas medias en  $\mu\text{m}^2$ ; perímetros, diámetros y radios en  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con los programas Microsoft Excel y R Studio. Para comprobar si los grupos siguen una distribución normal y tiene varianzas homogéneas se realiza el test de Shapiro-Wilk y el de Barlett. Cuando se comparan dos grupos se utiliza la prueba t de Student y cuando se comparan tres o más grupos se emplea el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Cuando el ANOVA revela diferencias entre grupos, para saber entre qué grupos se dan las diferencias se realiza el test de rangos de Tukey. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

## 4. RESULTADOS

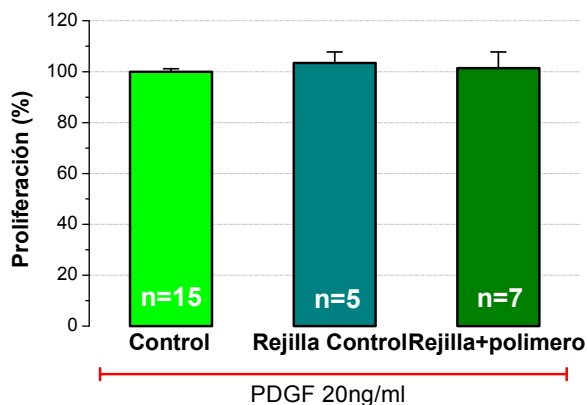
### 4.1. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE PAP-1 CONTENIDO EN UN ELR.

#### 4.1.1. Rejillas

##### a) Rejillas con y sin polímero

La primera etapa de la realización de este trabajo ha sido la caracterización del efecto de la liberación de PAP-1 desde un agente polimérico sobre la proliferación celular, cuantificada mediante la incorporación de EdU tal y como se ha explicado en el apartado 3.1.

Los informes previos facilitados por el grupo Bioforge, indican que los ELRs utilizados son biocompatibles y no presentan efectos tóxicos, pero tratamos de corroborarlo en nuestras condiciones experimentales. Comparamos la proliferación en presencia del soporte rejilla, recubierta o no de polímero, pero siempre sin fármaco, con células control, durante 24 horas (**FIGURA 13**).



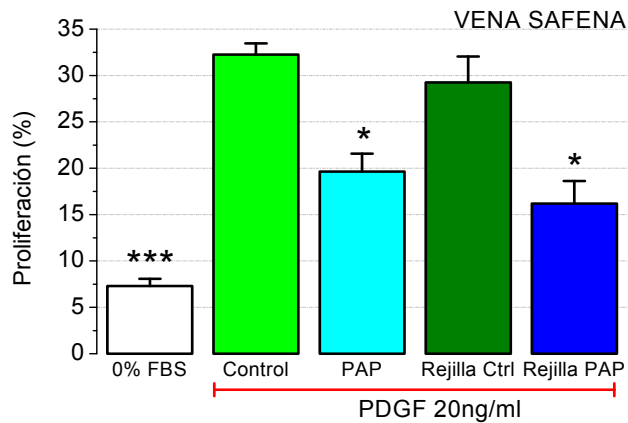
**FIGURA 13.** Efecto sobre la proliferación celular de la presencia en el medio de cultivo de rejillas sin recubrimiento polimérico o recubiertas de polímero pero sin fármacos. Cada barra es la media  $\pm$  SEM de 5-15 datos obtenidos en al menos 3 experimentos diferentes.

Los resultados obtenidos no mostraron efecto de la presencia de la rejilla sobre la proliferación, ni diferencias significativas entre las rejillas recubiertas o sin recubrir, y, por tanto, ambas se usaron indistintamente como control.

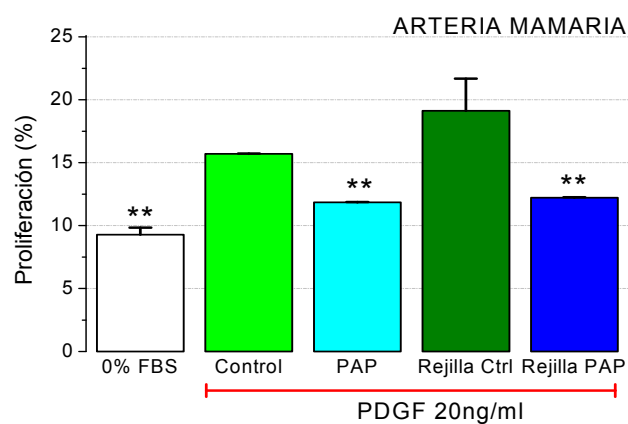
##### b) Rejillas en diferentes lechos vasculares

Es bien conocido que las VSMCs presentan una marcada heterogeneidad dependiente del lecho vascular de donde procedan, presentando propiedades específicas que les permiten cumplir con los requerimientos de las diferentes circulaciones regionales y mostrando diferencias en los mecanismos de desdiferenciación y en la respuesta a señales proliferativas. Por este motivo a continuación, se realizaron ensayos de proliferación utilizando células VSMCs de diferentes lechos vasculares humanos: SV, RA y MA. En todos los casos se expusieron las células a las mismas condiciones experimentales y tiempos de ensayos: tratamiento de 24 h seguido de 6 h de incubación con EdU. En las siguientes figuras (**FIGURAS 14-16**) se muestran los resultados de un experimento tipo en cada lecho vascular.

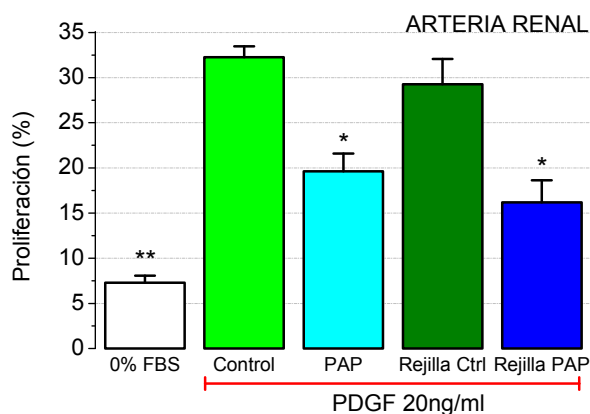
Tal y como se observa en estas figuras, en todos los lechos probados hay una fracción de la proliferación inducida por PDGF que se bloquea en presencia de 100 nM de PAP-1, un bloqueante selectivo de los canales de potasio Kv1.3.



**FIGURA 14.** Ejemplo del efecto sobre la proliferación de hVSMC de SV de la aplicación de rejillas recubiertas de polímero con PAP-1. Cada dato es la media  $\pm$  SEM de 2 cristales independientes. La proliferación se calcula como el % de células EdU+. A lo largo de todo el trabajo \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**FIGURA 15.** Ejemplo del efecto sobre la proliferación de hVSMC de MA de la aplicación de rejillas recubiertas de polímero con PAP-1. En todos los casos se estudió el efecto de PAP-1 aplicado directamente en el medio como control del efecto del bloqueante.



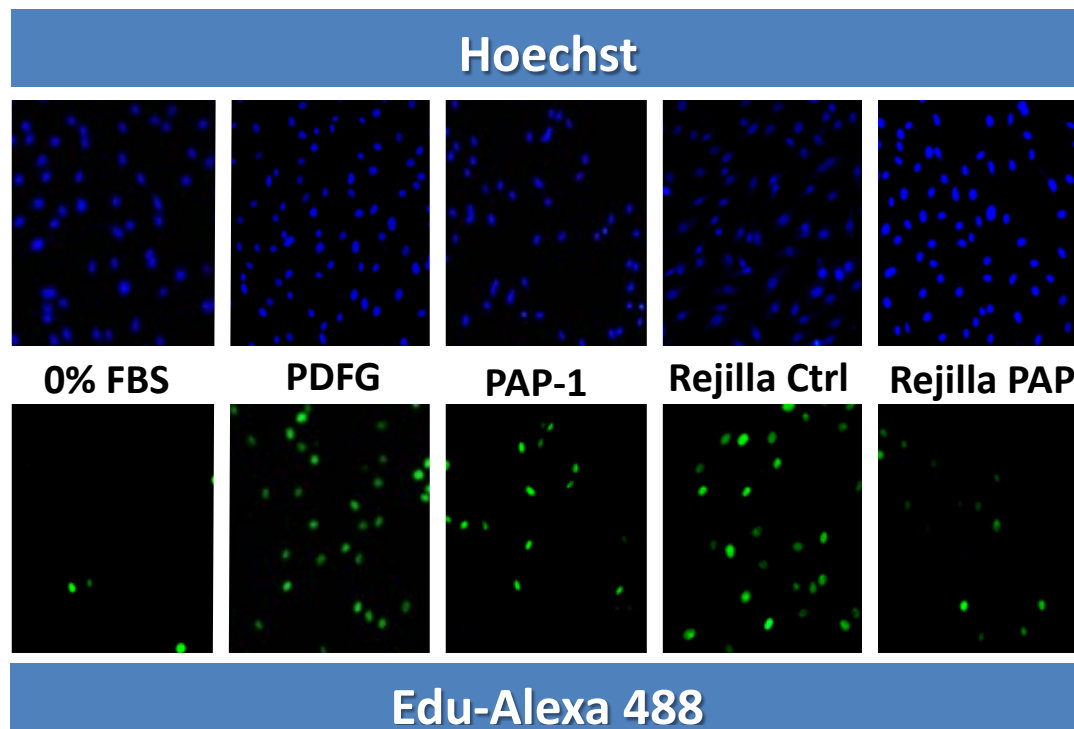
**FIGURA 16.** Ejemplo del efecto sobre la proliferación de hVSMC de RA tras la incubación con rejillas recubiertas de polímero con PAP-1. En todos los casos se observó que la presencia de la rejilla sin PAP-1 no produjo efecto sobre la proliferación.

Este mismo efecto se reproducen cuando PAP-1 se administra unido al polímero que recubre la rejilla, lo que sugiere que se está liberando adecuadamente y alcanza concentraciones de inhibidor en el medio similares a las de su control (100 nM). En conjunto, parece que la utilización de este soporte es efectiva para lograr la inhibición de la proliferación.

### c) Resumen rejillas

En la figura siguiente (**FIGURA 17**) se muestra un ejemplo de las fotografías de microscopía de fluorescencia tomadas en un ensayo, a partir de las cuales se calculan los porcentajes de proliferación representados en las gráficas de barras de las figuras.

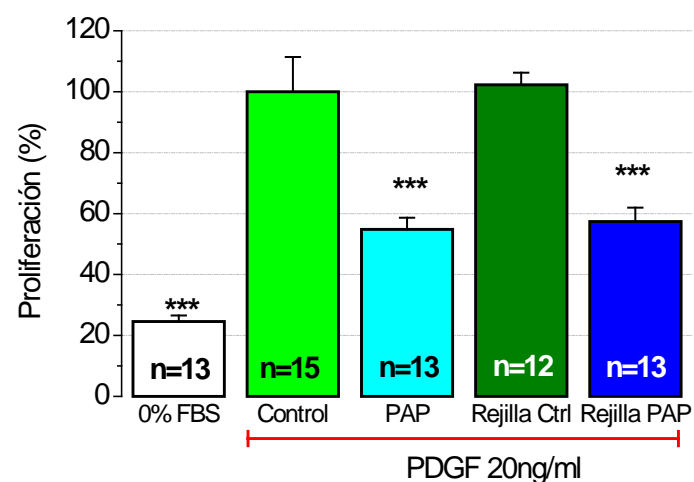
Nótese la diferencia en cuanto al número de células Edu+ entre las fotos de las distintas condiciones.



**FIGURA 17.** Microfotografías mostrando el marcaje con Hoechst (arriba) de los núcleos de las VSMCs y los mismos campos con las células que han incorporado Edu (abajo) en las condiciones experimentales que se indican.

En la **FIGURA 18** se muestra en conjunto todos los datos obtenidos de los ensayos realizados en los que se ha utilizado la rejilla como medio liberador de PAP-1. La n de esta gráfica incluye los diferentes lechos vasculares nombrados. En el caso de las rejillas controles, se incluyen tanto rejillas recubiertas de polímero como no

**FIGURA 18.** Sumario de los resultados de proliferación obtenidos en los distintos lechos vasculares. Los datos de cada experimento individual (media  $\pm$  SEM) se normalizan con respecto a sus respectivos controles. Se incluyen los resultados obtenidos en 8 experimentos individuales.



recubiertas, puesto que no se encontraron diferencias entre ambas. Debido a las diferencias observadas en condiciones basales en los distintos lechos vasculares, se

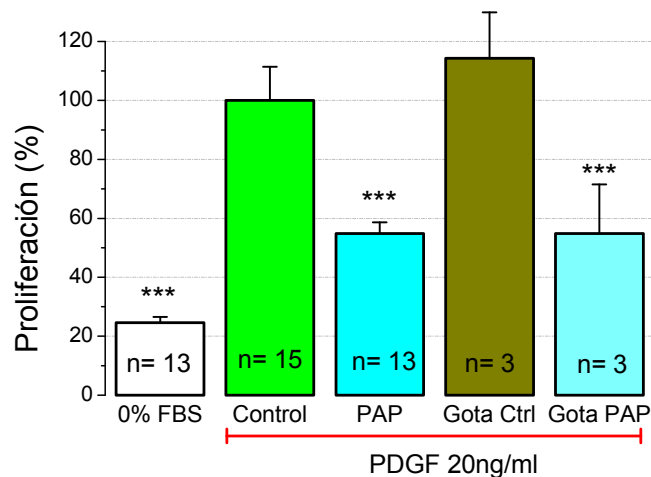
normalizaron los datos de forma que la proliferación en condiciones control (con PDGF) se consideró en cada caso el 100%.

#### 4.1.2. Gotas

Como se ha explicado en el apartado 3.1.2. se disponía de un segundo dispositivo denominado “gota”, en el que sólo está presente el polímero liofilizado, sin ningún soporte metálico. Se realizaron el mismo tipo de ensayo que con el soporte rejilla.

Los resultados obtenidos, que fueron similares a los anteriores con el soporte rejilla, se muestran en la siguiente gráfica (**FIGURA 19**). No observamos cambios en la proliferación al aplicar las gotas control (sin el bloqueante) y las gotas conteniendo PAP-1 produjeron una inhibición de la proliferación similar a la observada al añadir PAP-1 (100 nM) en el medio.

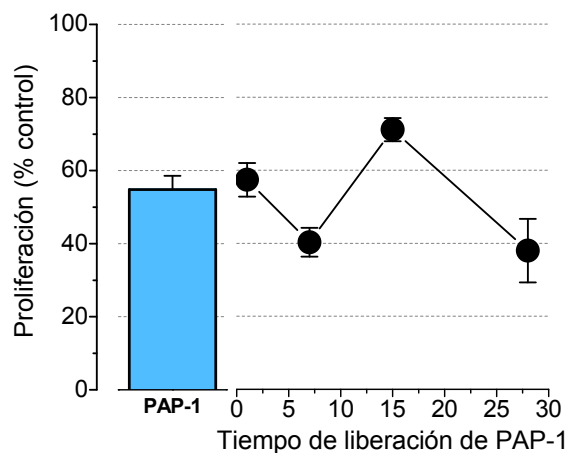
**FIGURA 19.** Sumario de los resultados de proliferación utilizando el soporte gota. Los datos de cada experimento individual (media  $\pm$  SEM) se normalizan con respecto a sus respectivos controles. Se incluyen los resultados obtenidos en 2 experimentos individuales.



#### 4.1.3. Estudio del curso temporal de liberación de PAP-1 de rejillas

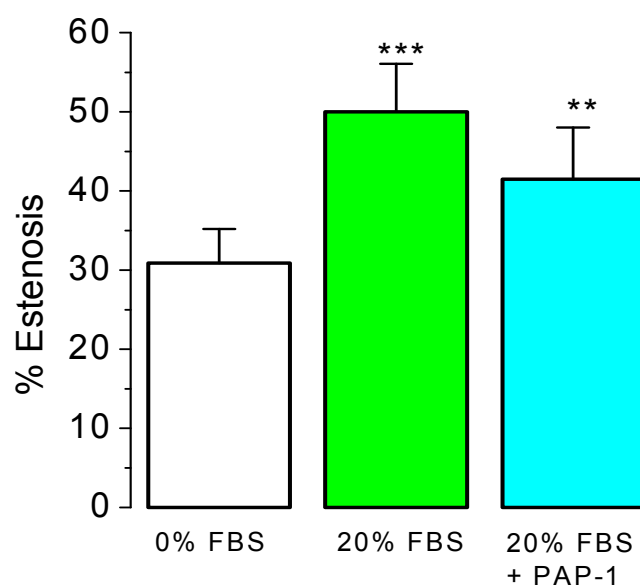
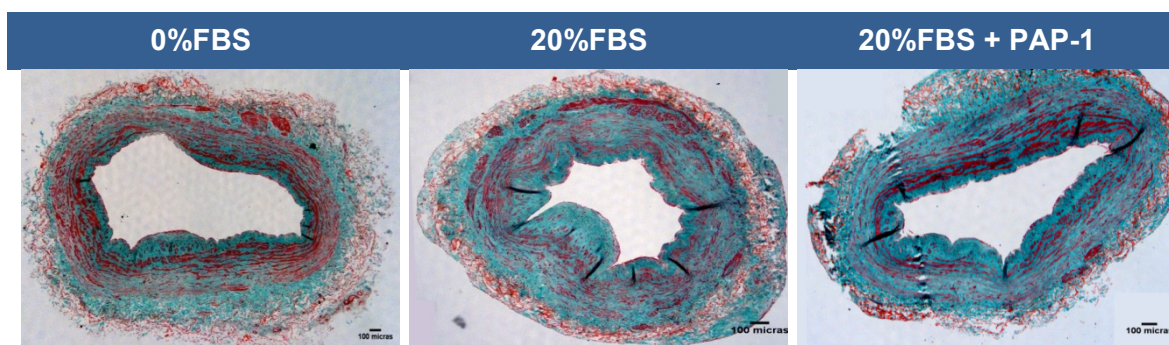
La documentación previa recibida indicaba que los ELRs utilizados son capaces de liberar fármaco de forma continua hasta 60 días, pero las medidas sólo se habían realizado en agua o en DMSO. Por ello, nuestro siguiente paso fue comprobar si el hidrogel era capaz de mantener la liberación de PAP-1 en cantidad suficiente como para inhibir la proliferación, después de haber estado liberando el fármaco durante un periodo de tiempo.

**FIGURA 20.** Caracterización de la inhibición de la proliferación de hVSMCs tras la aplicación de rejillas con PAP-1 que han sido mantenidas en medio de cultivo durante los tiempos indicados. Se compara el efecto con el de la aplicación de PAP-1 100 nM en el medio de cultivo. Cada dato es la media  $\pm$  SEM de 2-7 medidas de 1-4 experimentos.



Como se ha explicado anteriormente, tras mantener el soporte rejilla durante 7, 14 o 28 días en medio 0% realizando cambios de medio cada 2-3 días, se colocó la rejilla en un cultivo de células durante 24 h, para llevar a cabo un experimento de proliferación como los descritos.

Tal y como se muestra en la **FIGURA 20**, en todos los casos la aplicación de las rejillas con inhibidor llevó a una disminución significativa de la proliferación. Debido a que el número de datos en alguno de los tiempos es pequeño, no podemos determinar si existen diferencias significativas en este efecto inhibitorio debido al tiempo de incubación previo de la rejilla, pero si parece claro que incluso tras 28 días de liberación las rejillas siguen siendo capaces de liberar PAP-1 a concentraciones suficientes como para inhibir la proliferación celular.



**FIGURA 21.** Fotografías representativas de cortes de vena safena humana teñidas con tricrómico de Masson y adquiridas con objetivo 4x. 1) Control negativo (0% FBS), 2) control positivo (20% FBS) y 3) Condición experimental (20% FBS + PAP-1). El gráfico de barras muestra los datos obtenidos al cuantificar el porcentaje de estenosis en las distintas condiciones, tomando como control la condición de 0% FBS. Cada barra es la media  $\pm$  SEM de los distintos cortes analizados.

## 4.2. REMODELADO VASCULAR: CARACTERIZACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA DE LA VENA SAFENA EN CULTIVO DE ÓRGANO.

En trabajos previos del grupo, se ha demostrado que el PAP-1 disminuye el porcentaje de estenosis en venas safenas al disminuir la formación de neoíntima. Se recreó la estenosis utilizando 20% FBS como estimulador del crecimiento en cultivo de órganos. Partiendo de estos datos (se muestra un ejemplo de estos resultados previos en la **FIGURA 21**) y los resultados obtenidos en cultivo celular, se procedió a probar los soportes rejilla y gota en cultivo de órgano de SV.

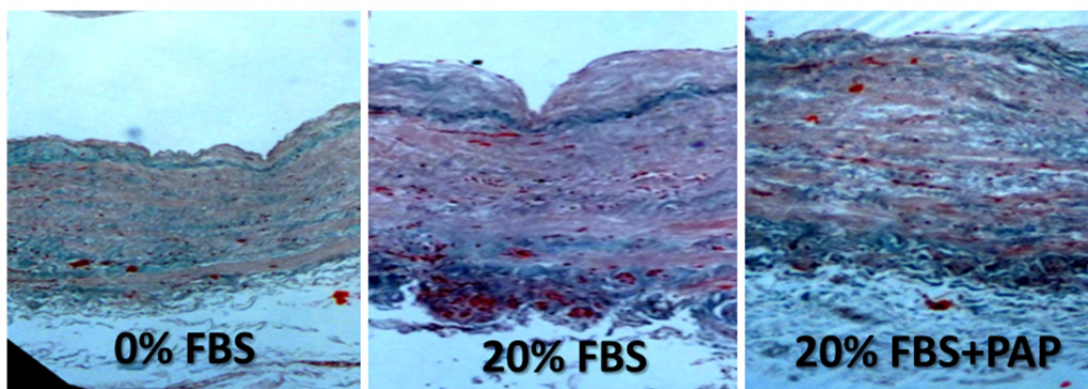
Para la realización de la segunda parte de este trabajo, se han utilizado muestras de venas safenas humanas, las cuales se han sometido a cultivo de órgano durante dos semanas con los distintos tratamientos explicados anteriormente (apartado 3.2.2.).

### 4.2.1. Rejillas

Se procedió a realizar el cultivo de órgano en presencia del soporte rejilla. Al disponer de fragmentos de vena pequeños y por tanto de pocas condiciones experimentales, sólo se tuvo como control negativo la condición 0%, que no incluye FBS. Como control positivo, se ha utilizado la rejilla control en un medio de 20% FBS, ya que quedó demostrado con los ensayos celulares que no modificaba la proliferación inducida por factores de crecimiento (en este caso 20% FBS).

Los porcentajes y ratios representados se obtuvieron realizando tres medidas de cada parámetro (luz, íntima y media), en cuatro cortes no consecutivos de cada condición. Se analizaron siete muestras de diferentes pacientes, pero sólo en una de ellas se observaron diferencias entre el control positivo (con 20% FBS) y el negativo (0% FBS). Los resultados que se detallan a continuación son de esa muestra.

En la **FIGURA 22** se muestran unas imágenes de cortes teñidos con tricrómico de Mason de las muestras de SV mantenidas en las condiciones experimentales indicadas. A partir de estas imágenes se determinó para cada muestra el ratio íntima / media y el porcentaje de estenosis, y se observa como estos aumentaron en presencia de suero mientras que el tratamiento con PAP-1 en el soporte rejilla fue capaz de reducirlos de nuevo a valores cercanos a la condición control.

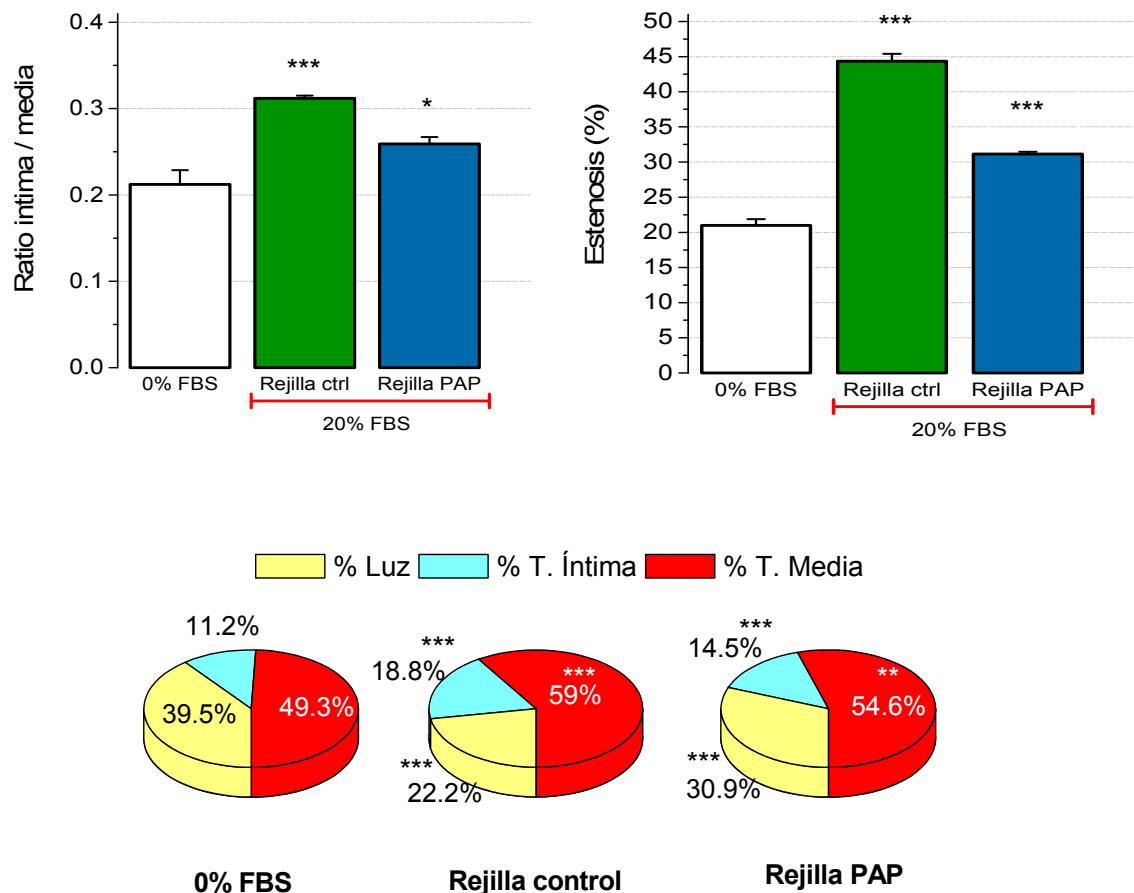


**FIGURA 22.** Microfotografías de secciones de cortes de vena safena humana. 1) Control negativo (0% FBS) en el que se aprecia muy poca íntima, 2) Control positivo (20% FBS) que posee la rejilla control, en la que podemos ver como ha engrosado la íntima, 3) Condición experimental (20% FBS + PAP), donde el PAP-1 ha sido liberado del soporte rejilla y cuya íntima se encuentra a caballo entre ambos controles.



Unos resultados similares se observan cuando medimos el porcentaje de íntima, media y luz en cada condición (**FIGURA 23**). El grosor de las túnica media e íntima aumenta en 20% FBS y disminuye área de la luz del vaso. Se observa además que el tratamiento con PAP-1 revierte parcialmente este efecto, produce una reducción del grosor de la íntima y de la media y en consecuencia un aumento del área de la luz.

Con estas resultados, queda probado que el soporte rejilla con PAP-1 es capaz de liberar el inhibidor durante dos semanas (hecho que se demostró en el cultivo celular) en cantidad suficiente como para disminuir el remodelado vascular debido al FBS.

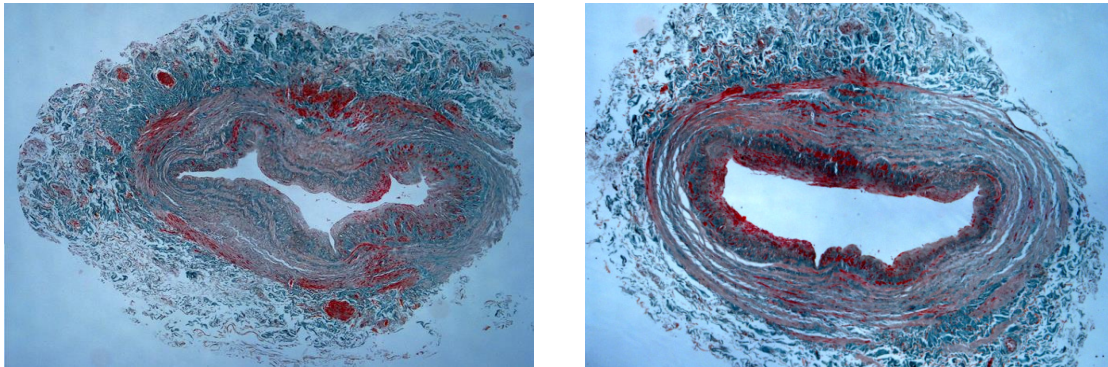


**FIGURA 23.** En la parte superior se representan la media  $\pm$  SEM del ratio íntima / media y del porcentaje de estenosis de los cortes analizados. Las gráficas inferiores muestran para cada condición los porcentajes de las túnica íntima y media y de la luz vascular.

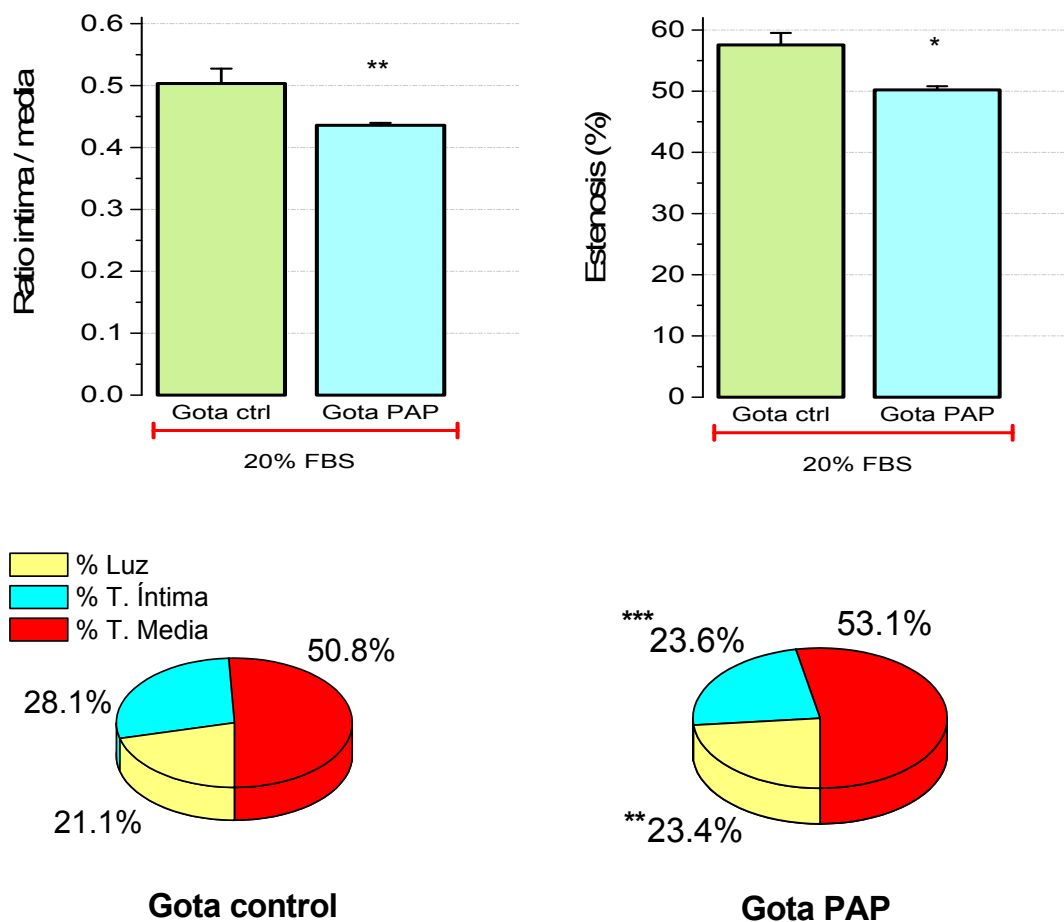
#### 4.2.2. Gotas

En paralelo, se probó el soporte gota bajo las mismas condiciones experimentales que en el caso anterior. Se analizaron dos muestras diferentes, de las que únicamente una mostró remodelado en el control positivo. En este caso, el fragmento de vena proporcionado sólo fue suficiente para dos anillos vasculares y por tanto disponemos de un control positivo y la condición experimental (**FIGURA 24**). Como se puede apreciar, se observa una clara inhibición del remodelado vascular en la condición experimental gota con PAP-1 en comparación con la que se obtiene en el control.

En la condición experimental observamos una disminución significativa de la estenosis, del ratio íntima / media y del porcentaje de íntima y un aumento de la luz del vaso (**FIGURA 24**), mientras que el grosor de la media no cambia.



**FIGURA 24.** Tinciones con tricrómico de Mason de dos cortes de SV mantenida en cultivo de organo con 20% SFB en presencia de gota control (izquierda) o gota con PAP-1 (derecha).



**FIGURA 25.** Se representa la media  $\pm$  SEM del ratio íntima / media y el porcentaje de estenosis de los cortes del experimento realizado con gotas de polímero. En la parte inferior se representan los porcentajes de la túnica íntima y media y de la luz del vaso.

## 5. DISCUSIÓN

La IH, como se ha comentado en la introducción, es un tipo de remodelado vascular que tiene lugar en gran medida tras las cirugías de tipo stent y bypass. Este fenómeno conduce al fracaso de las intervenciones debido a la restenosis del vaso.

En los últimos años, el desarrollo de DES de agentes farmacoactivos ha facilitado que la tasa de fallo disminuya, pero la IH sigue siendo el mayor problema en las intervenciones de revascularización cardiaca, así como en otras cirugías en las que se produce una lesión vascular, como en la cirugía de trasplante de órganos. Por este motivo, hay un gran interés en investigar nuevos fármacos que sean capaces de prevenir esta proliferación no deseada. Puesto que su desarrollo tiene un componente de proliferación de músculo liso y también un componente inflamatorio, los agentes farmacoactivos que se han probado en los DES han sido drogas inmunosupresoras y/o antiproliferativas.

En el momento actual, está aprobado el uso de DES conteniendo paclitaxel (que es un agente antimetabólico que estabiliza los microtúbulos) o inhibidores de mTOR como sirolimus y everolimus, que son también agentes inmunosupresores y antiproliferativos. Aunque se ha demostrado en la clínica una disminución de la IH tras la utilización de DES con estos fármacos comparando con stents metálicos sin recubrimiento, los resultados son todavía muy mejorables. El principal problema de estos compuestos es su inespecificidad como agentes antiproliferativos. Si bien un exceso de proliferación lleva a la restenosis, una cierta respuesta regenerativa es necesaria para la reparación del vaso. Los compuestos utilizados inhiben la proliferación de las VSMCs pero también la re-entotelización del vaso, lo que facilita la adhesión plaquetaria y la formación de trombos dentro del stent que acaban ocluyendo de nuevo la luz del vaso. Así, aunque estos DES reducen la IH, aumentan el riesgo de trombosis del stent, con lo cual se genera un nuevo problema que disminuye el éxito a largo plazo de estas cirugías.

Ante esta situación, el reto que se plantea es doble:

1. **Por un lado, es necesario buscar nuevas drogas que tengan un efecto más específico limitando la IH actuando sobre las VSMC.** Los trabajos previos del grupo han mostrado que los bloqueantes selectivos del canal Kv1.3, como el PAP-1 pueden ser candidatos muy adecuados. Dicho inhibidor es capaz de impedir la proliferación de las VSMCs (principales células implicadas en la restenosis del vaso) sin obstaculizar la proliferación de otros tipos celulares, lo que permite una correcta cicatrización del endotelio y aseguraría una mejora de las tasas de supervivencia.
2. **Por otro lado, es necesario demostrar su utilidad y su aplicabilidad in vivo, diseñando sistemas que permitan su aplicación localizada y su liberación controlada,** con una dosificación y un curso temporal y compatible con la prevención de la IH. En este trabajo se pretenden sentar las bases para un nuevo stent liberador de fármaco gracias a su recubrimiento con un polímero biocompatible recombinante tipo elastina, que además forma un hidrogel con las características idóneas para poder ser utilizado en el fin propuesto.

Por ello, el objetivo principal ha sido la caracterización de la liberación de PAP-1 desde un agente polimérico y el estudio de su efecto sobre las VSMCs.

Esta caracterización es compleja ya que el diseño experimental ha de tratar de acercarse todo lo posible a las condiciones *in vivo*. Por ello, se ha llevado a cabo en distintas fases. En una primera fase se ha comprobado la eficacia liberando PAP-1 de

este compuesto en cultivos primarios de VSMCs (ver punto 5.1). Los resultados prometedores obtenidos en esta fase nos han llevado a desarrollar una segunda fase en la que se han aplicado estos compuestos a vasos humanos, que se han mantenido en cultivo de órgano (tal y como se discute en el apartado 5.2). En esta segunda fase, se tiene en cuenta el remodelado del vaso como un todo, con todos los elementos celulares presentes. Para completar este estudio, se requeriría pasar a una tercera fase (que nos hemos planteado aunque aún no se ha iniciado) en la que se aplicará el polímero en modelos de IH *in vivo*, para estudiar su eficacia cuando se añade el efecto del flujo y los demás factores humorales y hemodinámicos que están actuando sobre el vaso.

### 5.1. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL PAP-1 CONTENIDO EN UN POLÍMERO DE TIPO ELASTINA

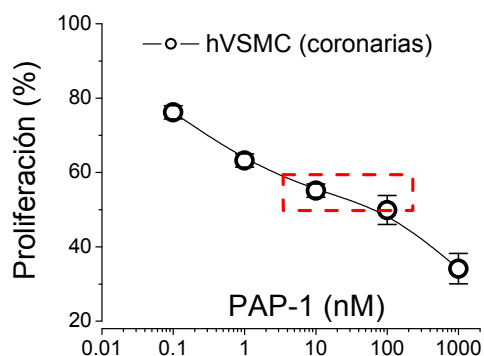
Para la caracterización del efecto inhibitorio del PAP-1, se han utilizado dos dispositivos (denominados rejilla y gota), ambos recubiertos por el mismo tipo de polímero.

Los polímeros ELRs utilizados han sido ampliamente analizados, asegurando su bio y hemocompatibilidad<sup>37, 38</sup>. Aun así, el primer paso realizado fue comprobar si el soporte rejilla, que incluye una base metálica similar a la de un stent, podría alterar de algún modo la proliferación celular. Se compararon rejillas con y sin polímero y el resultado corrobora los trabajos anteriores, ya que no se detectaron cambios en cuanto a proliferación celular entre las condiciones de rejillas con o sin polímero y la condición control con PDGF (**FIGURA 13**).

Nuestro grupo de investigación ya había probado la eficacia del agente PAP-1 sobre la inhibición de la proliferación de las VSMCs, pero sólo había sido utilizado añadido de forma libre al medio de cultivo. Lo novedoso de este trabajo es el empleo de dicho producto contenido en una matriz polimérica, de la cual es liberado de forma constante y prolongada en el tiempo.

Los ensayos de proliferación celular llevados a cabo en presencia de soportes, tanto rejillas como gotas, muestran diferencias muy significativas entre el control positivo PDGF y la condición experimental, indicando que ambos soportes son eficaces como vehículo de administración del bloqueante. Esta inhibición no mostró diferencias significativas con respecto al PAP-1 libre (aplicado en el medio) y, por tanto, ambos efectos son comparables.

Debido a la composición de los medios de cultivo (que son fluidos no newtonianos con propiedades no homogéneas) y a la pequeña concentración de PAP-1 necesaria para estos efectos, no se ha podido determinar la concentración de fármaco liberada del biopolímero mediante espectrometría de masas, que nos hubiera proporcionado una evidencia más directa.



**FIGURA 26.** Curva dosis respuesta del porcentaje de proliferación de hVSMC a las concentraciones de PAP-1 indicadas. Se tomó como 100% la proliferación en presencia de PDGF (sin PAP-1). El recuadro rojo indica el rango de proliferación observada en este estudio en presencia de PAP-1 en el medio o en alguno de los soportes estudiados.

Sin embargo, utilizando como lectura alternativa el efecto sobre la proliferación podemos concluir que la cantidad liberada desde el biopolímero está próxima al efecto obtenido con 100 nM de PAP-1 libre, ya que no hay diferencias significativas entre ambos. De hecho, resultados previos del grupo estudiando la dosis-dependencia del efecto del PAP-1 sobre cultivos de VSMCs de arterias coronarias humanas sugieren que los efectos observados con las rejillas y las gotas con PAP-1 son compatibles con niveles de PAP-1 entre 10 y 100 nM (**FIGURA 26**).

El soporte rejilla se probó en diferentes lechos vasculares, RA, MA y SV. En todos ellos, los datos obtenidos no arrojan diferencias entre ambas condiciones, lo que aporta un mayor valor a nuestro dispositivo, ya que nos confirma su eficacia en diferentes tipos de VSMCs, todas ellas humanas y procedentes de vasos en los cuales la restenosis es un problema clínico importante.

Si bien los ensayos con gotas se repitieron un menor número de veces que los de rejilla, se puede afirmar que el soporte es efectivo aun con una n pequeña. Las gotas están compuestas por el mismo polímero formador de hidrogel que las rejillas y, por tanto, cabía esperar un efecto similar, que se corroboró con los ensayos realizados.

El siguiente objetivo a conseguir (de cara a su aplicación en la prevención de la IH) fue probar si el soporte rejilla era capaz de mantener la liberación del PAP-1, y por tanto el efecto antiproliferativo, a lo largo del tiempo, o si por el contrario, dejarían de ser efectivas tras un periodo de tiempo corto, por perder su capacidad liberadora o por haber liberado ya todo el compuesto incluido.

Se probaron rejillas que habían estado liberando el fármaco en medio de cultivo durante 7, 14 o 28 días. Aunque existen pequeñas diferencias entre unas y otras, en todos los casos se observa inhibición significativa si se compara con el control PDGF. Con los datos disponibles, parece existir un ligero incremento de la proliferación en las rejillas que han estado liberando PAP-1 durante 14 días y, sin embargo, en aquellas que han estado durante más tiempo (28 días) se aprecia incluso un mayor efecto inhibitor de la proliferación. Cabe destacar, que el número de repeticiones realizadas para cada tiempo es pequeño (n=2-4). Si bien es necesario aumentar el número de experimentos para comprobar si esas tendencias que observamos representan diferencias significativas en el efecto del PAP-1 a los distintos tiempos estudiados (y por tanto en la cantidad de PAP-1 que liberan las rejillas), los resultados obtenidos hasta el momento son altamente prometedores, ya que confirman que se puede usar el soporte durante periodos de tiempos largos sin perder eficacia. Probablemente, las diferencias observadas en la **FIGURA 20** se deben más a la propia variabilidad entre cultivos y entre rejillas que a una pérdida de acción del PAP-1, al menos a los tiempos estudiados.

## **5.2. REMODELADO VASCULAR: CARACTERIZACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA DE LA SV EN CULTIVO DE ÓRGANO**

La SV es uno de los vasos más utilizados en la revascularización de arterias coronarias mediante cirugía de bypass coronario; sin embargo, en un gran número de casos la intervención quirúrgica termina fracasando pasados unos años por la aparición de restenosis. Un estudio previo de nuestro grupo comprobó que el PAP-1 minimiza el porcentaje de estenosis al disminuir la formación de neoíntima en cultivo de órgano de SV. La estenosis se reprodujo utilizando medio con 20% FBS y se empleo el inhibidor del canal Kv1.3, PAP-1, para evitarla.

En el proyecto actual, se utilizó el mismo modelo de remodelado vascular, confirmando su validez. En el control positivo se observó un mayor remodelado que en el control negativo. Se observó una íntima más gruesa y replegada en sí misma, mayor grosor de la media, un aumento de los porcentajes de estenosis y del ratio

íntima / media y una disminución del porcentaje de luz cuando se compara con el control negativo (**FIGURAS 22 y 23**).

Al realizar el cultivo de órgano, los vasos se extraen de su entorno y, aunque se intenta imitar las condiciones fisiológicas, hay ciertos parámetros que en este caso no han sido recreados, como el flujo sanguíneo. Las venas, al no estar sometidas a la presión del flujo, pueden sufrir aplastamientos y deformaciones, también debido a la propia manipulación experimental. Este evento puede hacer que algunas de las medidas realizadas estén distorsionadas. Por ejemplo, el porcentaje de luz va a depender en gran medida de lo deformado o no que se encuentre el vaso. Para evitar este problema, se decidió calcular el diámetro teórico del vasos a partir del perímetro medido, y así calcular los porcentajes utilizados como indicadores de remodelado.

Los parámetros aceptados por la comunidad científica para este tipo de ensayos son el porcentaje de estenosis y el ratio íntima / media. Sin embargo, en el apartado 4, se muestran un mayor número de indicadores. Todos los parámetros medidos, apoyan los resultados de estos dos indicadores, lo que confirma la utilidad de nuestros dispositivos.

En los experimentos en cultivo de órgano para estudiar el remodelado, se utilizaron los dos soportes disponibles la rejilla o la gota con PAP-1 para tratar de revertir el remodelado inducida por FBS. Si se compara el control positivo con la condición experimental, se puede observar como los porcentajes de íntima y estenosis disminuyen. También dejan de apreciarse los pliegues en la íntima. Por otro lado, el porcentaje de luz aumenta, acorde con la disminución de la estenosis.

A pesar del pequeño tamaño muestral de que se dispone en este ensayo (una muestra por soporte utilizado), aunando los resultados obtenidos en cultivo celular y en cultivo de órgano, se puede afirmar que el PAP-1 liberado por el polímero formador de hidrogel es capaz de disminuir el remodelado vascular inducido por el FBS, aunque no llega a recuperar las características del control negativo. Aún así, su efecto es capaz de evitar la estenosis completa del vaso en estas condiciones.

## 6. CONCLUSIONES

1. El polímero tipo elastina formador de hidrogel, así como su soporte metálico (rejilla) son biocompatibles pues no interfieren en la proliferación celular.
2. El efecto del PAP-1 liberado del soporte rejilla inhibiendo la proliferación de las VSMCs de diferentes lechos vasculares es comparable al del PAP-1 libre.
3. Los soportes rejilla y gota muestran una eficacia similar en cuanto a inhibición de la proliferación celular de VSMCs, lo que indica que al menos durante las primeras 24 horas liberan el fármaco en cantidad suficiente.
4. El soporte rejilla muestra una eficacia similar al PAP-1 libre, después de haber liberado fármaco durante 7, 14 o 28 días, lo que indica la liberación es continua y sostenida en el tiempo, al menos durante 28 días.
5. En vena safena, los soportes rejilla y gotas que contienen PAP-1 aumentan significativamente el % de luz vascular y disminuyen el área de la íntima y el porcentaje de estenosis inducido por FBS en el cultivo de órgano. Estos efectos son similares a los obtenidos con PAP-1 añadido al medio.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como ya se ha indicado, la restenosis debido a la hiperplasia de la íntima es causa de numerosos fracasos de cirugías de bypass y stents coronarios, por lo que resulta sumamente interesante continuar con esta línea de investigación para ofrecer alternativas más eficaces.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, nos planteamos continuar este estudio abordando las siguientes tareas:

- Aumentar el tamaño muestral (n) de los experimentos en cultivo de órgano, así como el número de controles en paralelo para cada vaso.
- Sustituir el PAP-1 por inhibidores peptídicos, como el Shk, ya que suponen menos problema en las fases clínicas de la investigación.
- Diseñar experimentos en cultivo de órgano de arterias y venas presurizadas, a fin de recrear el microambiente en que se encuentran los vasos sanguíneos *in vivo*.
- Realizar estudios *in vivo* utilizando como modelo animal el ratón o el cerdo. Se podría realizar un modelo de estenosis mediante ligadura de la arteria carótida e implantar nuestro soporte para comprobar si se libera PAP-1 suficiente como para reducir el remodelado.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Van Varik, B. J. *et al.* Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. *Front. Genet.* **3**, 1–10 (2012).
2. Levick, J.R. An introduction to cardiovascular physiology. Arnold: Oxford (UK) **1**, 9 (1991).
3. Mulvany, M. J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol. Sci.* **17**, 105–109 (2002).
4. Kloc, M. & Ghobrial, R. Chronic allograft rejection: A significant hurdle to transplant success. *Burn. Trauma* **2**, 3 (2014).
5. Mechanisms of Vascular Disease. A textbook for Vascular Surgeons. Fitridge. R., Thompson. M, Eds. Cambridg University Press. New York (NY) (2016).
6. Yoshida, T. *et al.* Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ. Res.* **96**, 280–291 (2005).
7. Ciudad, P. *et al.* Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1203–1211 (2010).
8. López-López, J. R., *et al.* Kv channels and vascular smooth muscle cell proliferation. *Microcirculation* **25**, 1–9 (2018).
9. Perez Garcia, M. T., *et al.* The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **314**:C27-C42 (2018).
10. Ciudad, P., *et al.*, M. K+ Channels Expression in Hypertension After Arterial Injury and Effect of Selective Kv1.3 Blockades with PAP-1 on Intimal Hyperplasia Formation. *Cardiovasc Drugs Ther.* **28**: 501–511 (2014).
11. Heeneman, S., *et al.* A. P. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ. Res.* **101**, 441–454 (2007).
12. Murphy, G. J. *et al.* Insights into the pathogenesis of vein graft disease: Lessons from intravascular ultrasound. *Cardiovasc. Ultrasound* **2**, 1–6 (2004).
13. De Vries, M. R. *et al.* A. Inflammation in Vein Graft Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 1–13 (2018).
14. Zain, M. A. *et al.* Neointimal Hyperplasia Pathophysiology. (2018).
15. Ward, A. O., Caputo, M., Angelini, G. D., George, S. J. & Zakkar, M. Activation and inflammation of the venous endothelium in vein graft disease. *Atherosclerosis* **265**, 266–274 (2017).
16. Murlroney E. S. *et al.* Netter. Fundamentos de fisiología. 2º Ed. Elsevier: Barcelona España. (2016).
17. Brancati, M. *et al.* Coronary stents and vascular response to implantation: literature review. *Pragmatic Obs. Res.* **Volume 8**, 137–148 (2017).
18. Stefanini, G. G. *et al.* Drug-Eluting Coronary-Artery Stents. *N. Engl. J. Med.* **368**, 254–265 (2013).
19. De Torre, I. G. *et al.* Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases. *Acta Biomater.* **12**, 146–155 (2015).
20. Ciudad, P. *et al.* Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **467**, 1711–1722 (2015).
21. Ibáñez-Fonseca, A. *et al.* Biocompatibility of two model elastin-like recombinamer-based hydrogels formed through physical or chemical cross-linking for various applications in tissue engineering and regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e1450–e1460 (2018).
22. Schmitz, A. *et al.* Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1. 3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1254–1270 (2005).
23. Pereira, L. E. *et al.* Pharmacokinetics, Toxicity, and Functional Studies of the Selective Kv1.3 Channel Blocker 5-(4-Phenoxybutoxy) Psoralen in Rhesus Macaques. *Exp. Biol. Med.* **232**, 1338–1354 (2007).



## 9. ANEXO 1

### Composiciones de las distintas disoluciones utilizadas durante el trabajo

- Cóctel de antibióticos (1%): penicilina 100 U/ml, streptomina 100 U/ml y fungizona 5 µg/ml.
- Tyrode de cirugía: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM Ca<sub>2</sub>Cl, 1.1 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 10 mM HEPES y 5mM glucosa, pH=7.4.
- Fijación en solución de Bouin: 75% de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 5% de ácido acético glacial y 20% de solución de formaldehído al 40%.
- Hematoxilina férrica de Weigert: Preparada mezclando a partes iguales las soluciones A (hematoxilina 1% en etanol) y B (cloruro férrico 1,2% y ácido clorhídrico 1%).
- Escarlata de Biebrich y Fucsina ácida: Mezcla a partes iguales de escarlata Bierbrich (Sigma<sup>®</sup>) al 1% en agua destilada y fucsina ácida (Sigma<sup>®</sup>) al 1% en agua destilada. A continuación, se añadió a la mezcla 0,5% de ácido acético glacial 100% (Merck<sup>®</sup>).

### Protocolo de tratamiento de muestras histológicas

- Inclusión en parafina
  - Etanol 75% 1 h
  - Etanol 90% 1 h
  - Etanol 96% 1 h
  - Etanol 100% 1 h x 3
  - Xileno 1 h
  - Cubeta de limpieza 1 h
  - Xileno 1 h x 2
  - Parafina 2 h x 2
- Desparafinización y rehidratación de los cortes
  - Etanol 100% (Panreac<sup>®</sup>) 5 minutos x 2
  - Etanol 96% (Panreac<sup>®</sup>) 5 minutos x 2
  - Etanol 70% (a partir de agua destilada y etanol 100%) 5 minutos x 2
  - Agua destilada 5 minutos
- Deshidratación y aclarado
  - Etanol 96% (Panreac<sup>®</sup>) 3 minutos x 2
  - Etanol 100% (Panreac<sup>®</sup>) 3 minutos x 2
  - Xileno 3 minutos x 2