The background of the image is a microscopic view of a hydrogel structure. It consists of a dense, interconnected network of thin, green, fibrous strands. Interspersed within this network are larger, rounded, red structures that appear to be cells or specific components of the hydrogel. The overall appearance is that of a porous, three-dimensional mesh.

**EFICACIA Y SEGURIDAD DEL  
USO DE UN HIDROGEL DE  
FIBRINA Y AGAROSA  
NANOESTRUCTURADO COMO  
PARCHE HEMOSTÁTICO EN  
CIRUGÍA HEPÁTICA**

**Tesis Doctoral**





EFICACIA Y SEGURIDAD DEL USO DE UN HIDROGEL DE FIBRINA Y AGAROSA  
NANOESTRUCTURADO COMO PARCHÉ HEMOSTÁTICO EN CIRUGÍA HEPÁTICA

TESIS DOCTORAL

Doctorando:

Rafael Campos Cuerva

Directores:

Dra. Beatriz Fernández Muñoz

Dr. Miguel Ángel Gómez Bravo

Dra. Carmen Cepeda Franco

Tutor Académico:

Dr. Francisco Javier Padillo Ruiz

Sevilla, Junio 2020



# AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente la oportunidad que hace 5 años se me dio de formar parte de la Unidad de Producción y Reprogramación Celular (UPRC) de la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas (actualmente Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas). Un equipo con grandes capacidades, voluntad de esfuerzo, aprendizaje y superación, y con el constante deseo de poder contribuir en la mejora de la salud pública. Un grupo de amigos. Gracias chic@s.

Agradezco la ayuda a aquellos que de alguna forma han contribuido a esta tesis, médicos e investigadores que han participado en este proyecto directa o indirectamente (Carmen Cepeda, Miguel Ángel Gómez, Sheila Pereira, Fran Farfán, Miguel Alaminos, etc).

Especial agradecimiento a mi compañera Beatriz Fernández, quien me propuso realizar esta tesis, que tanto apoyo me ha dado y de quien tanto aprendo. Gracias Bea.

A mi familia. A mis cuatros hermanos que me enorgullecen y me enseñan cada día como superar adversidades con la mejor actitud. Mi gemelo Carlos, inteligencia y superación; Mari Pili, amor y lealtad; Jesús, inocencia y “locura”; y mi hermano mayor José María, un luchador cuya fuerza de voluntad me ha enseñado que no existe nada insuperable. A mis padres, referentes de sacrificio y perseverancia, en especial a mi madre, quien de verdad me ha enseñado todo lo que he necesitado para continuar aprendiendo. A Anna, mi compañera de vida, y a mis pequeños Alessandro, Zoe y la *in arrivo* “Rafalita”, por las tardes, fines de semana y vacaciones que os robé para hacer realidad esta tesis.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Hemostasia .....	4
1.1.1 Hemostasia Primaria.....	5
1.1.2 Hemostasia Secundaria .....	8
1.1.3 Fibrinolisis o Hemostasia Terciaria .....	14
1.2 Agentes Hemostáticos .....	16
1.2.1 Hemostáticos tópicos .....	18
1.2.2 Sellantes.....	18
1.3.1 Adhesivos.....	23
1.4 Resección hepática y Modelo animal .....	24
1.5 Medicamentos Biológicos y de Terapias Avanzadas .....	27
1.5.1 Concepto y clasificación de Medicamentos Biológicos.....	27
1.5.2 Concepto y clasificación de ATMP .....	29
1.6 Hidrogeles de fibrina y agarosa .....	31
2. OBJETIVOS .....	35
2.1 Objetivo principal.....	36
2.2 Objetivos específicos .....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3.1 Materiales .....	38
3.1.1 Población de estudio .....	38
3.1.2 Instalaciones .....	38
3.1.3 Material fungible de laboratorio .....	39
3.1.4 Material quirúrgico .....	40
3.1.5 Material específico .....	40
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 Diseño y grupos de estudio .....	41
3.2.2 Consideraciones legales y éticas .....	42
3.2.3 Fabricación de Hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados.....	42
3.2.4 Protocolo animal y resección hepática .....	51
3.2.5 Análisis de muestras .....	54
3.2.6 Variables .....	56

3.2.7	Análisis estadístico.....	57
4.	RESULTADOS.....	59
4.1	Puesta a punto de la fabricación del c-NFAH .....	60
4.2	NFAH tiene efecto hemostático.....	63
4.3	NFAH tiene resultados favorable en la respuesta tisular e inflamación .....	68
4.4	Efecto hemostático del a-NFAH criopreservado .....	73
4.5	Seguridad del a-NFAH criopreservado.....	80
5.	DISCUSIÓN .....	85
5.1	Estudio preliminar de eficacia hemostática/Modelo moderado .....	86
5.2	Eficacia hemostática de apósitos NFAH “en fresco”/Modelo severo .....	87
5.3	Preservación de apósitos NFAH .....	89
5.4	Eficacia hemostática de apósitos NFAH preservados.....	92
5.5	Seguridad de apósitos NFAH a largo plazo .....	93
5.6	Biocompatibilidad y Biodegradabilidad de NFAH.....	95
5.7	Propiedades Biomecánica de hidrogeles NFAH.....	97
5.8	Modelo Animal.....	98
5.9	Impacto económico y Desarrollo tecnológico .....	99
5.10	Prospectivas futuras .....	104
6.	CONCLUSIONES.....	107
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	109



# ABREVIATURAS

160307 BRCG: lote de los fibroblastos de rata utilizados.  
AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios  
a-FAH: apósito de fibrina-agarosa sin celularizar.  
a-NFAH: apósito nanoestructurado de fibrina-agarosa sin celularizar.  
AT: antitrombina  
ATMP: Advanced Therapy Medicinal Products  
BCT: banco celular de trabajo  
BSA: albúmina de suero bovino  
Ca<sup>2+</sup>: ion cálcico  
CaCl<sub>2</sub>: cloruro cálcico  
CAGR: Compound Annual Growth Rate  
cAMP: adenosín monofosfato cíclico  
c-FAH: apósito de fibrina-agarosa celularizado.  
cGMP: guanosín monofosfato cíclico  
c-NFAH: apósito nanoestructurado de fibrina-agarosa celularizado.  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono.  
CRP: proteína C reactiva  
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DPX: mezcla de dibutilfeniltalato + *poliestireno* y xileno.  
ECDC: European Center for Disease Control  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
EthD: homodímero de etidio  
EVA: Etilvinilacetato  
FAH: hidrogel de fibrina-agarosa.  
FBS: suero fetal bovino  
FDA: Food and Drug Administration  
Fr-aNFAH: apósito nanoestructurado de fibrina-agarosa sin celularizar congelado.  
FvW: factor von Willebrand  
GMP: Good Manufacturing Practices  
GP: complejo glicoproteico  
HUVR: Hospital Universitario Virgen del Rocío  
IBIS: Instituto de Biomedicina de Sevilla  
IgG: inmunoglobulina G.  
IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 beta  
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato  
ISCN: Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética humana  
KCl: cloruro potásico  
NEAA: aminoácidos no esenciales.  
NFAH: hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa.

NHS-PEG: pentaeritritol polietilenglicol éter tetra-succinimidil glutarato de N-hidroxisuccinimida  
NO: óxido nítrico  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
ONT: Organización Nacional de Transplantes  
PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno  
PBS: Phosphate-Buffered saline  
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
PEG: polietilenglicol  
PFA: paraformaldehido  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina  
Ph. Eur.: Farmacopea Europea  
PKC: proteína quinasa C  
PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A  
PLC $\gamma$ : fosfolipasa C  
PNT: procedimientos normalizados de trabajo  
RADyTTA: Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas  
SEM: error estándar de la media  
SNS: Sistema Nacional de Salud  
SSPA: Sistema de Salud Pública Andaluz  
TF: factor tisular  
TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
t-PA: activador tisular del plasminógeno  
UGR: Universidad de Granada  
u-PA: activador tisular del plasminógeno tipo uroquinasa  
UPRC: Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla

# **1.INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Hemostasia

Según la RAE, la hemostasia es “la detención de una hemorragia de modo espontáneo o por medios físicos, como la compresión manual, o químicos como los fármacos”. Este fenómeno permite por tanto el cierre de vasos sanguíneos lesionados y evitar así la pérdida de sangre.

Existen conocimientos sobre la hemostasia desde el siglo IV a.C. cuando Platón expuso su visión de la coagulación describiendo que la sangre formaba fibras al abandonar el calor del cuerpo, atribuyéndole por primera vez el nombre de fibrina (Versteeg, Heemskerck, Levi, & Reitsma, 2013). Sin embargo, es a partir del siglo XIX cuando se producen los descubrimientos más relevantes sobre la hemostasia. En 1835 el doctor Andrew Buchanan, sin saberlo, hace referencia al factor tisular (TF) planteando la existencia de un elemento capaz de iniciar la coagulación. En 1882, Giulio Bizzorero descubre las plaquetas y su adhesión a los vasos sanguíneos dañados para formar el coágulo de fibrina. En 1905, Paul Morawitz realiza seguramente la contribución más relevante sentando las bases de la coagulación. Este médico alemán hizo referencia a cuatro factores que determinaba necesarios y suficientes para el proceso de coagulación: la tromboquinasa, la protrombina, el fibrinógeno y el calcio (Riddel, Aouizerat, Miaskowski, & Lillicrap, 2007). En 1912 Duke e Ivy realizaron el primer estudio de tiempo de sangrado estudiando la hemostasia en vivo sin un equipo especializado. En 1935, Armand Quick realiza las primeras pruebas de medición del tiempo de coagulación, la cual recibe el nombre de “Tasa de protrombina” o “Tiempo de Quick”. Hoy en día es una de las pruebas que más se realizan para el estudio de la hemostasia. Entre 1940 y 1960 se realizan los descubrimientos de la mayoría de los factores de coagulación, a los cuales posteriormente se le asignaron números romanos. Los factores de coagulación son proenzimas que se modifican para generar su versión activa. Entre éstos encontramos los factores V, VII, VIII, IX y XI (FV, FVII, FVIII, FIX, FXI) y el factor von Willebrand (FvW), cuyas deficiencias conducen a enfermedades hemorrágicas. Es el caso de las hemofilias A y B producidas por las deficiencias de los factores FVIII y FIX, respectivamente (Dent, Berkowitz, Ware, Kasper, & Ruggeri, 1990). En 1964, dos equipos de investigación proponen de manera independiente una teoría

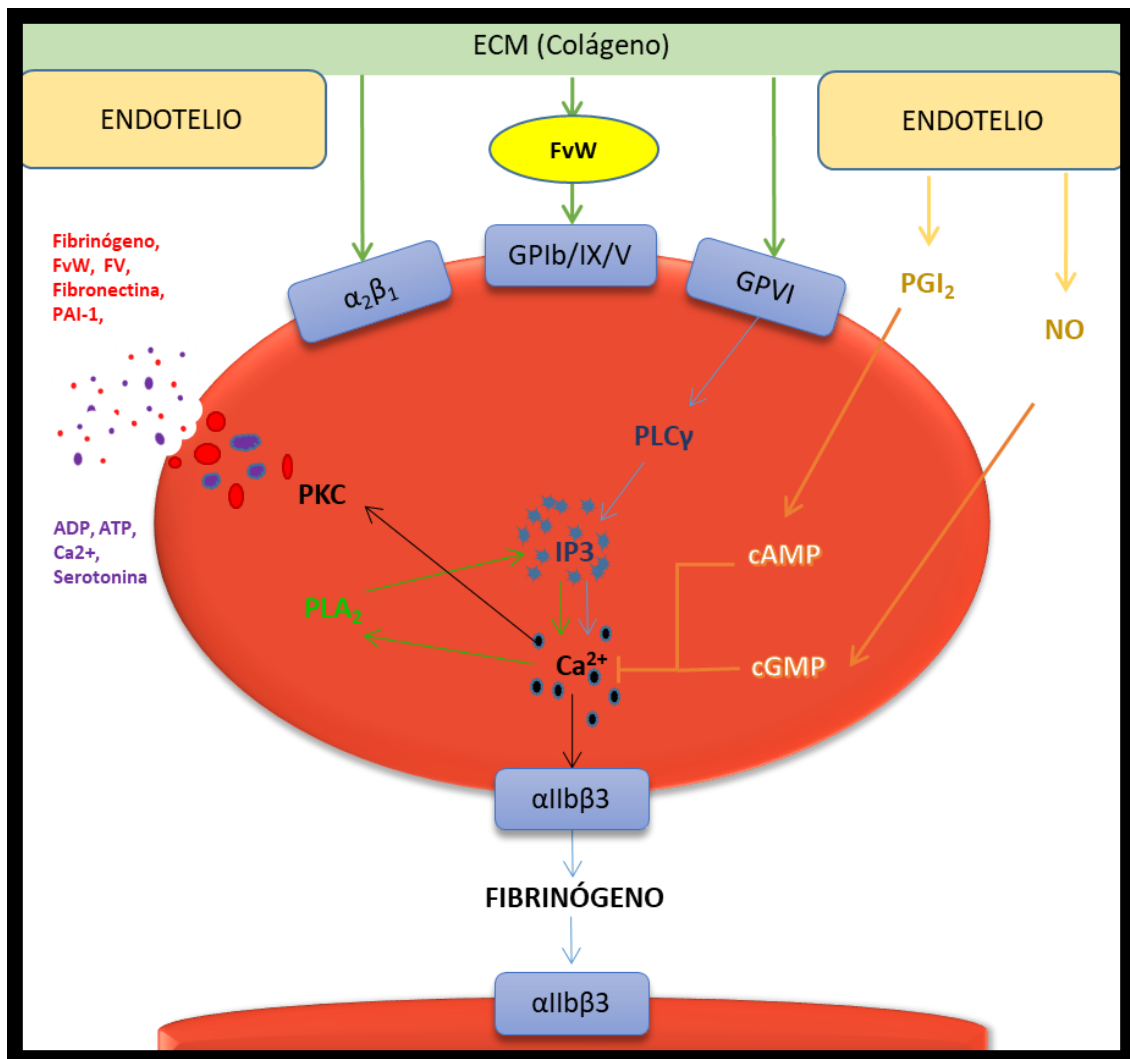
de reacciones enzimáticas que se producen en cascada para formar el coágulo de fibrina. Nace por tanto el modelo de coagulación en cascada que se describe a continuación (Davie & Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964).

### 1.1.1 Hemostasia Primaria

La hemostasia se clasifica en dos etapas, una hemostasia primaria que hace referencia a la adhesión y agregación plaquetaria, y una hemostasia secundaria referente a la cascada enzimática de la coagulación que genera fibrina insoluble a partir de fibrinógeno. Además, la fibrinólisis, proceso de degradación de la fibrina, juega un papel muy importante en la hemostasia y por eso algunos autores la consideran como otra etapa denominándola hemostasia terciaria (Stassen, Arnout, & Deckmyn, 2012).

Las plaquetas, también conocidas como trombocitos, son pequeños fragmentos de células anucleadas producidas por gemación de un megacariocito que forman parte de las células hematopoyéticas de la médula ósea. Las plaquetas se encuentran en suspensión en el flujo sanguíneo a razón de 150-400 millones por mililitro de sangre (Zucker&hyphen;Franklin, 1996). Cuando la pared de los vasos sanguíneos sufre un daño y las plaquetas entran en contacto con estructuras subendoteliales, se producen la adhesión, la activación y agregación de las plaquetas (Figura 11).

La membrana plasmática de las plaquetas posee diferentes tipos de receptores específicos que se unen a diferentes proteínas. Entre estas, la proteína más importante para la adhesión es sin lugar a duda el colágeno. Inicialmente, cuando se produce un daño en la pared de los vasos sanguíneos, el receptor GPIb-IX-V, un complejo glicoproteico que se encuentra en la membrana de las plaquetas, se une al colágeno a través del factor Von Willebrand (FvW). FvW es una proteína que puede encontrarse inmovilizada como componente constitutivo de la matriz extracelular (unida a fibras de colágeno IV) o soluble en plasma, aunque el receptor GPIb-IX-V solamente posee afinidad por el FvW inmovilizado. Ante una rotura vascular, el FvW soluble se fijará a proteínas de la matriz extracelular, preferiblemente al colágeno tipo I y III, o a otros multímeros de FvW para dar inicio a la formación del coágulo (Ruggeri & Mendolicchio, 2007).



**Figura 11. Esquema de la Hemostasia primaria.** La exposición del colágeno de la matriz extracelular (ECM) durante la rotura del endotelio vascular provoca la unión de la plaqueta a través del factor Von Willebrand (FvW) inmovilizado. Esto ocasiona a su vez la unión de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  y del complejo GPVI al colágeno. La activación del GPVI actúa sobre la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ) produciendo un incremento del inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ) que ocasiona el aumento de la concentración de los iones calcio ( $Ca^{2+}$ ). Este aumento de calcio citoplasmático produce por un lado, la activación de la proteína quinasa C (PKC) que causa la estimulación plaquetaria mediante la secreción de gránulos  $\alpha$  (Fibrinógeno, FvW, FV, Fibronectina, PAI-1) y densos (ADP, ATP,  $Ca^{2+}$ , Serotonina), y por otro lado, una amplificación de la activación plaquetaria mediante un mecanismo de retroalimentación positiva a través de la fosfolipasa A (PLA $_2$ ). Por último, se produce como consecuencia la activación de la integrina  $\alpha IIb\beta_3$  que amplificará la agregación interplaquetaria. Para el control de la formación del tapón plaquetario, el endotelio produce prostaciclina (PGI $_2$ ) y óxido nítrico (NO) que aumentan los niveles de adenosín- y guanósín monofosfato cíclico (cAMP y cGMP) respectivamente para disminuir la concentración de  $Ca^{2+}$  y detener así la agregación plaquetaria.

Una vez que las plaquetas se van uniendo al FvW, el GPVI (otro complejo glicoproteico constitutivamente activo) y la integrina  $\alpha_2\beta_1$  que se encuentra en la superficie plaquetaria se van a unir directamente al colágeno. Todo este proceso de adhesión

conllevará consigo una débil activación de las plaquetas, una reorganización del citoesqueleto, una movilización del ión calcio y la activación de integrinas para la adhesión de plaqueta con plaqueta.

La interacción de las plaquetas con el sustrato adhesivo va producir la activación de las fosfolipasas generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 se unirá a los canales intracelulares de  $Ca^{+2}$  del retículo endoplásmico de las plaquetas (sistema tubular denso) ocasionando un incremento de la concentración citoplasmática de  $Ca^{+2}$  iniciando o acelerando diferentes procesos calcio-dependientes (Figura I1).

El aumento de  $Ca^{+2}$  va a producir, por un lado, la activación de la proteína quinasa C (PKC) que ocasiona la secreción de gránulos (alfa y densos) con sustancias activas que aceleran la formación del coágulo plaquetario y la reparación del tejido dañado (adenosina di- y trifosfato, fibrinógeno, serotonina, FvW, PDFG, trombina, factor V, tromboxano A2 y otras) (Flores-rivera, Ramírez-morales, Meza-márquez, & Nava-lópez, 2014), y por otro lado, la activación de la fosfolipasa A (PLA<sub>2</sub>) que producirá nuevamente IP3 que incrementa aún más los niveles de  $Ca^{+2}$  produciendo por tanto la amplificación de la activación plaquetaria.

Por último, se produce la agregación interplaquetaria tras la activación de la integrina  $\alpha_{IIB}\beta_3$ . Parece que la activación de esta integrina es consecuencia del aumento de los niveles de calcio y/o de la activación de la PKC, aunque se desconoce exactamente el mecanismo. La integrina  $\alpha_{IIB}\beta_3$  se unirá principalmente al fibrinógeno y éste a su vez a otra plaqueta. Además el fibrinógeno polimerizará formando una malla de fibrina alrededor de las plaquetas (hemostasia secundaria). La integrina  $\alpha_{IIB}\beta_3$  se une además a otros ligandos en la superficie plaquetaria fortaleciendo y expandiendo las conexiones interplaquetarias (Ni & Freedman, 2003; Yang et al., 2006). Entre estos ligandos se encuentra la fibronectina que se ha demostrado participar en la agregación plaquetaria (Hou et al., 2015)

Todos estos procesos de adhesión inicial, reorganización del citoesqueleto, secreción de gránulos, amplificación de la señal y agregación plaqueta-plaqueta necesitan un control exhaustivo de modo que la formación del tapón plaquetario se limite a la zona dañada y no aumente su tamaño de manera incontrolada generando un trombo. Por este

motivo, las células endoteliales expresan constitutivamente prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) y óxido nítrico (NO) (Cernadas et al., 1998; Spisni et al., 1995), dos inhibidores plaquetarios que disminuyen la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  a través del aumento de los niveles de cAMP y cGMP respectivamente. De esta forma se detienen la agregación de plaquetaria y se limita la extensión del tapón hemostático.

### 1.1.2 Hemostasia Secundaria

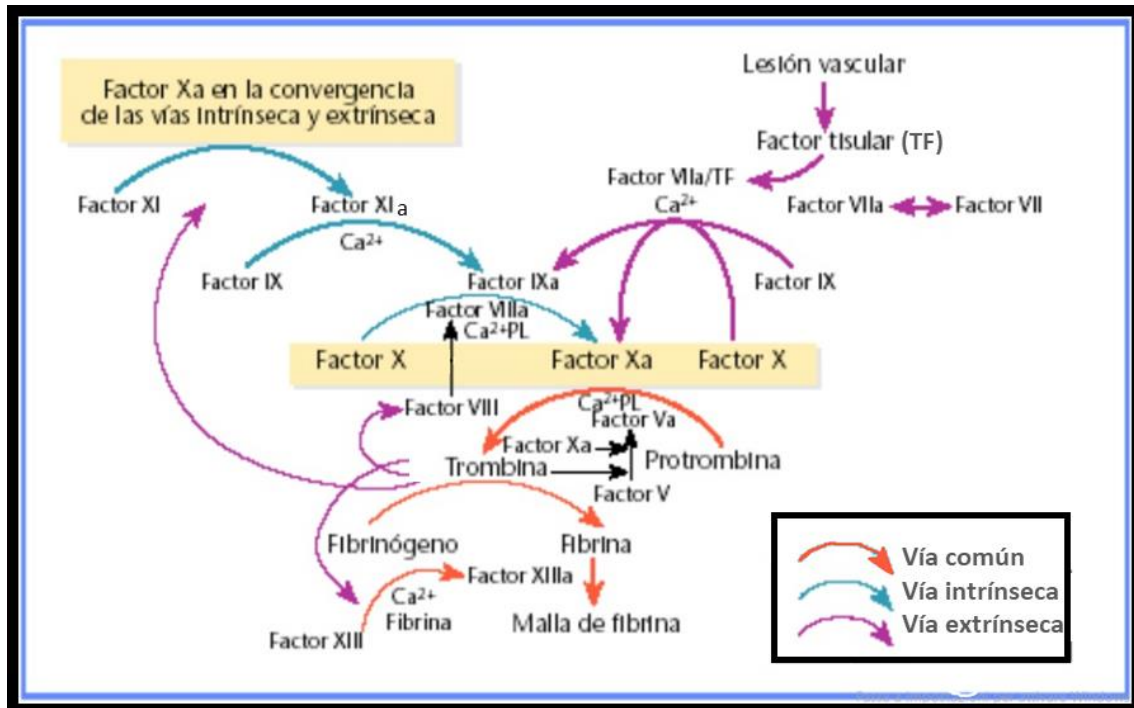
Existe un modelo de cascada de formación del coágulo de fibrina que se divide en tres fases para su estudio (Monroe & Hoffman, 2006) (Figura 12):.

*Fase Extrínseca (o de Iniciación)*, conocida como la vía extrínseca porque se observó que necesitaba de factores externos para iniciarse. Bajo una lesión las células endoteliales secretan en respuesta una lipoproteína conocida como factor tisular (TF), también llamada tromboplastina o factor III (FIII). Este factor se expresa en diferentes tipos de células extravasculares en condiciones normales, así como en células endoteliales y monocitos durante estados inflamatorios. Este iniciador de la cascada de coagulación se une con el FVIIa, una proteína dependiente de la vitamina K que se encuentra circulando de forma activa, para formar el complejo tenasa extrínseco FVIIa/TF (constituido por FVIIa como enzima, TF como cofactor indispensable, FX como sustrato, fosfolípidos aniónicos e iones  $\text{Ca}^{2+}$ ) que activa por proteólisis los factores FIX y FX, dando lugar a FIXa y FXa respectivamente. FXa se unirá entonces a su cofactor FVa que junto al  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos formarán el complejo protrombinasa, el cual activa la protrombina para dar lugar a pequeñas cantidades de trombina esenciales para la activación plaquetaria. La activación de FX por el complejo FVIIa/TF puede ser inmediatamente inhibido por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) o por la antitrombina III (ATIII) (Monroe & Hoffman, 2006) si FX abandona el complejo de la superficie de la célula endotelial. Sin embargo, el FIXa puede difundirse fácilmente a otras superficies celulares y, por tanto, participar en la fase de amplificación.

*Fase Intrínseca (o de Amplificación)*: Esta vía desencadena el proceso de coagulación por una vía diferente a la del endotelio vascular. La pequeña cantidad de trombina generada durante la fase de iniciación o extrínseca va a amplificar su propia producción mediante la activación de las plaquetas que expondrán sus fosfolípidos de membrana necesarios



para la fase de propagación (Hoffman & Monroe, 2001; McMichael, 2012) y favorecerán la liberación del FV contenido en sus gránulos. FV se activará con la ayuda de FXa y la trombina, la cual activará también FXI y FVIII.

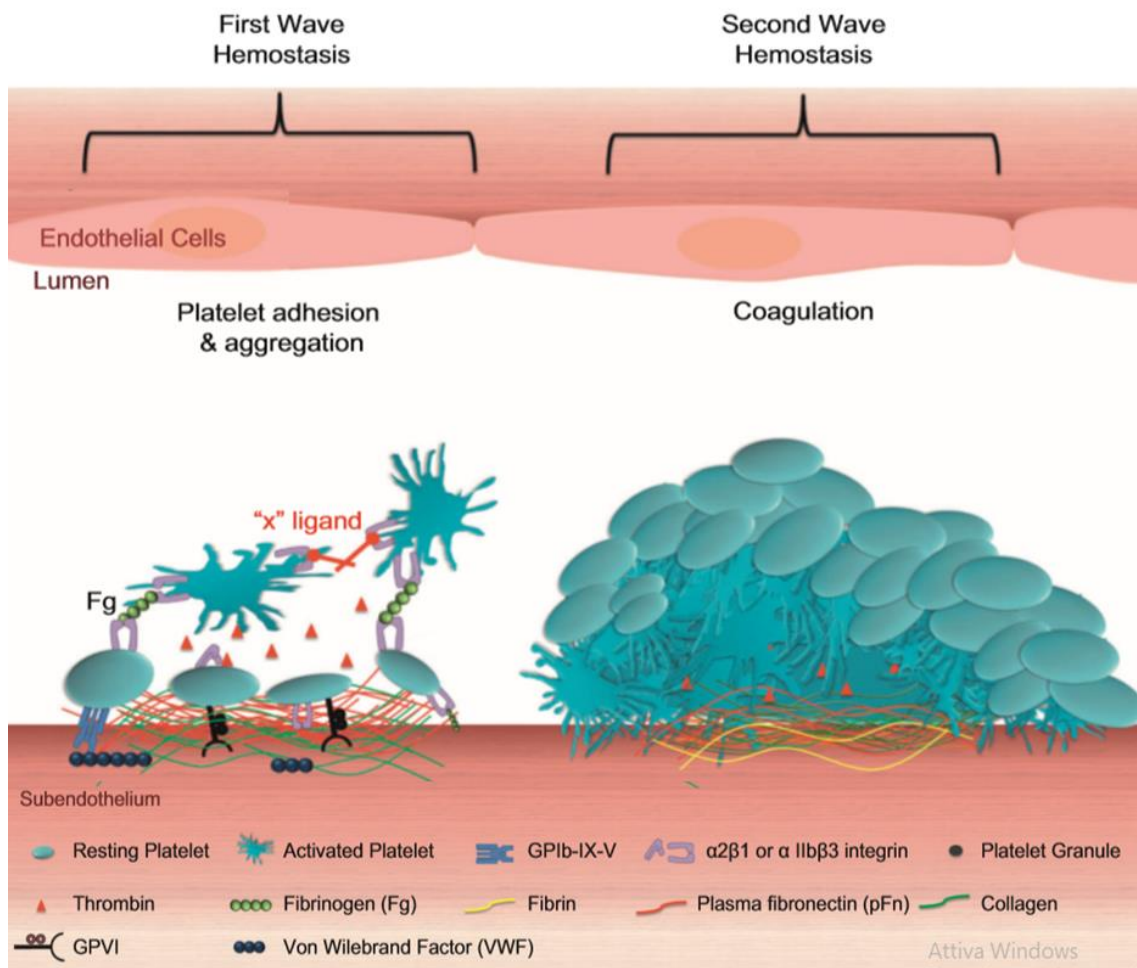


**Figura 12. Esquema de la Hemostasia secundaria.** La hemostasia secundaria se divide en tres fases: extrínseca, intrínseca y final común. Fase Extrínseca (flechas moradas): Durante una lesión, las células endoteliales liberan el factor tisular (TF) que se une al FVIIa para activar FIX y FX. Por un lado, FXa se unirá a su cofactor FVa, al  $Ca^{2+}$  y a fosfolípidos para formar el complejo protrombinasa para producir una pequeña cantidad de trombina, mientras que FIX participará en la fase de propagación. Fase Intrínseca (flechas azules): la pequeña cantidad de trombina producida en la fase extrínseca va a amplificar su propia producción mediante la activación de las plaquetas y la liberación de los gránulos que liberarán FV. El FV se activará con la ayuda del FXa y de la trombina que a su vez activará FXI. FXIa traerá como consecuencia la activación del FX. Fase final común (flechas naranjas): aquí confluyen las dos fases anteriores con la activación de FX. En esta fase se produce la hidrólisis de la protrombina para generar trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina. A su vez, va a producir la activación de FXIII que participa en la polimerización de la fibrina para formar una malla insoluble. (Imagen adaptada de Factores de coagulación. <https://www.slideshare.net/JuanLeoRM/cascada-de-coagulacin-75032884>).

*Fase final común (o de propagación):* en esta fase confluyen las dos anteriores una vez alcanzada la activación de FX. Durante la fase de iniciación se activan FX y FIX, y con las pequeñas cantidades de trombina producidas se activan también FV y FVII. Esto lleva a la formación del complejo tenasa intrínseco (constituido por FIXa como enzima, FVIIIa como cofactor, FX como sustrato, fosfolípidos e iones  $Ca^{2+}$ ) que produce la activación de FX en FXa de una forma 50 veces más eficiente que la activación mediante el complejo tenasa extrínseco de la fase de iniciación (Lu, Broze, & Krishnaswamy, 2004). A este

punto, con FX activado se formará el complejo protombinasa (FXa, FVa, fosfolípidos y  $\text{Ca}^{2+}$ ) que hidroliza la protrombina en trombina. La trombina es una serina proteasa muy selectiva que actuará sobre el fibrinógeno para convertirlo en fibrina y formar así una masa gelatinosa. A su vez, la trombina junto al  $\text{Ca}^{2+}$  va a producir la activación de FXIII, un factor esencial en la polimerización de la fibrina.

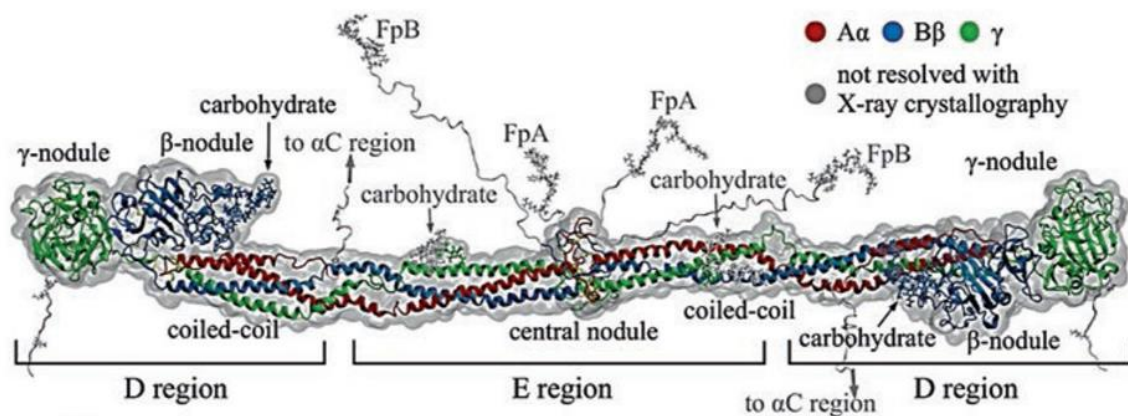
La fibrina producida por las plaquetas, junto al fibrinógeno, va a favorecer la agregación de plaquetas mediante las integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activas, formando el coágulo (Podolnikova et al., 2014). En la Figura I3 se puede ver un esquema resumido de la formación del coágulo con la participación de la hemostasia primaria y secundaria.



**Figura I3. Esquema de la formación del coágulo.** Los receptores de plaquetas se unen a ligandos como FvW (VWF) y colágeno, activando la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  y dando como resultado la unión de fibrinógeno y la agregación plaquetaria posterior. La trombina se genera en la superficie plaquetaria y activa aún más las plaquetas contribuyendo a la cascada de coagulación. En un tapón hemostático o trombo en crecimiento, la matriz de fibrina y fibronectina generalmente se forma en la interfaz entre la pared del vaso lesionado y el tapón plaquetario (Imagen adaptada de Hou 2015).

El fibrinógeno que da lugar a la malla de fibrina, es una glicoproteína soluble con propiedades adhesivas conocida también como factor I de coagulación y cuyo papel es fundamental para la hemostasia. Sus funciones pasan por: ser precursor de la fibrina, actuar en la agregación plaquetaria como puente entre plaquetas, inhibidor de la trombina, y sustrato de unión para otras proteínas como el factor XIII o las proteínas fibrinolíticas. El fibrinógeno es producido en el hígado encontrándose principalmente en el plasma humano (Takeda, 1966) a razón de 1.7 a 5 g/L aunque también se puede encontrar en plaquetas y líquido intersticial (Harrison, Savidge, & Cramer, 1990; Harrison et al., 1989).

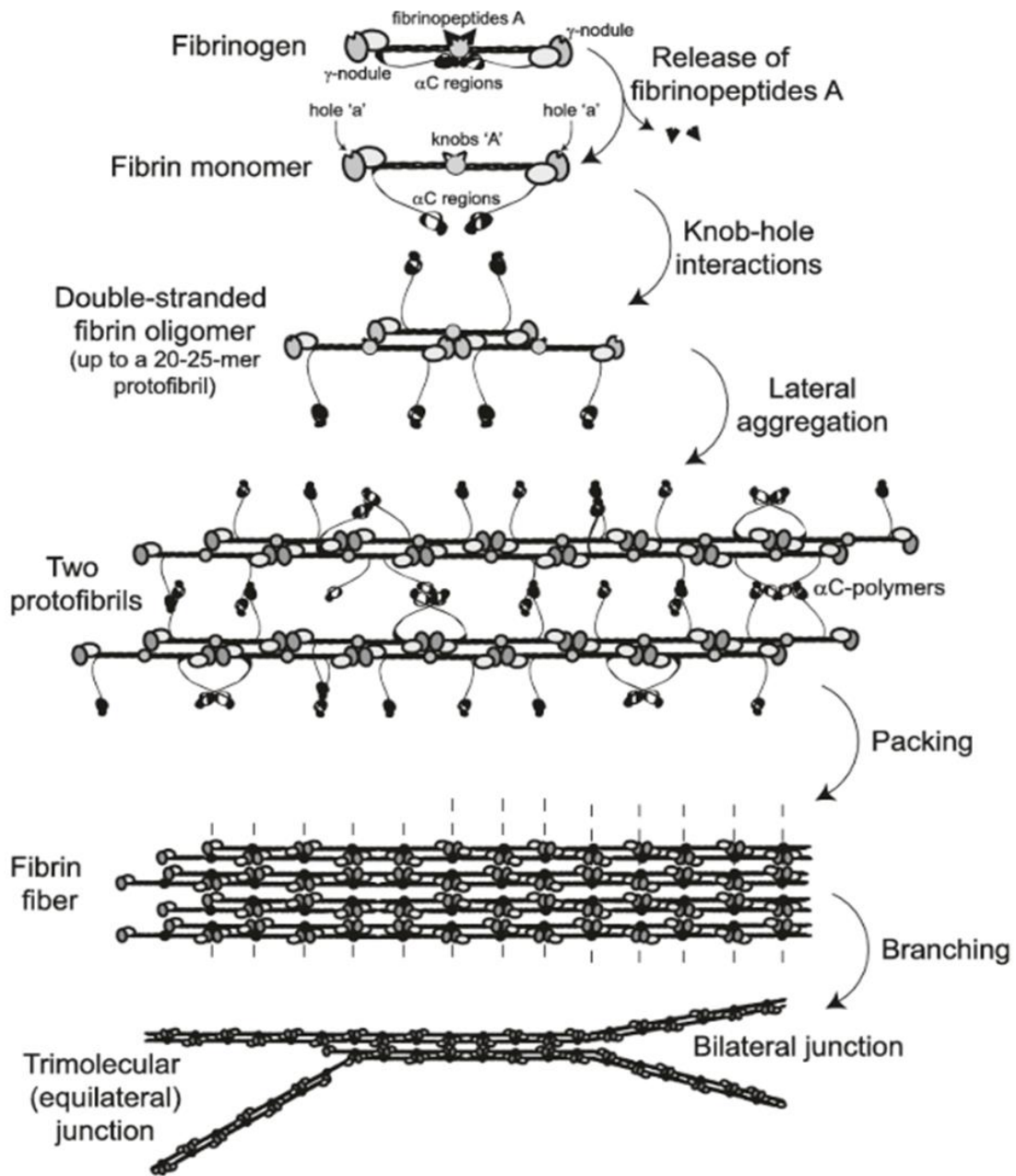
La molécula de fibrinógeno tiene tres partes llamadas nódulos, un nódulo central E y dos distales D (Vargas-Ruiz, 2016)(Figura I4). En el nódulo E de la molécula se encuentran los fibrinopéptidos A y B (FpA y FpB) que serán escindidos por la trombina para dar lugar al comienzo de la polimerización de los monómeros de fibrina (Kattula, Byrnes, & Wolberg, 2017). Existe una estructura denominada regiones o conectores  $\alpha$ C que juegan un papel fundamental en la interacción de monómeros de fibrina durante la polimerización (Figura I5).



**Figura I4. Estructura del fibrinógeno.** Estructura de la molécula de fibrinógeno determinada mediante cristalografía de rayos X. Se aprecian los extremos amino terminales de  $A\alpha$  y  $B\beta$ , las cadenas de FpA y FpB en el nódulo central y el comienzo de las regiones  $\alpha$ C. (Imagen adaptada de Weisel 2018).

Los iones calcio se unen al fibrinógeno mediante uniones fuertes y débiles. Las uniones de calcio a estos sitios están relacionadas con la regulación de la degradación enzimática (Odrlić et al., 1996), la agregación lateral de fibrina para la formación de fibras más

gruesas (Brennan et al., 2007) y el cambio conformacional por escisión de fibrinopéptidos (Dyr, Blombäck, Hessel, & Kornalík, 1989).



**Figura 15. Diagrama esquemático de la polimerización de fibrina.** Los fibrinopéptidos en los nódulos centrales cubren las protuberancias o botones (knobs) complementarios a los agujeros (holes) expuestos de forma permanente en los extremos de las proteínas. Cuando la trombina elimina los fibrinopéptidos, se producen interacciones entre los knobs-holes, dando lugar a oligómeros (se muestra un trímero), que se alargan para producir las protofibrillas bicatenarias formadas por moléculas medio escalonadas. Las protofibrillas se agregan lateralmente para formar fibras, un proceso mejorado por las interacciones de las regiones αC y la formación de los polímeros αC. En la parte inferior del diagrama, los puntos de ramificación aparecen por la divergencia de dos protofibrillas (derecha) o por la división de las hebras de una protofibrilla (izquierda). (Imagen adaptada de Weisel 2018).

El fibrinógeno posee cuatro oligosacáridos unidos cuya función está relacionada con la polimerización de la fibrina. Se ha observado que una eliminación completa de los carbohidratos produce fibras más gruesas (Langer, Weisel, Dinauer, Nagaswami, & Bell, 1988) y que un alto nivel de sialilación de las glicoproteínas del fibrinógeno produce fibras delgadas y más ramificadas (Martinez, Keane, Gilman, & Palascak, 1983). Por lo que parece que la presencia mayor o menor de carbohidratos, sus dominios y sus cargas determinan la solubilidad y la agregación lateral (Weisel & Litvinov, 2018).

La conversión de fibrinógeno a fibrina ocurre en dos pasos principales: enzimático y no enzimático. En el paso enzimático, hay una escisión catalizada por trombina de los fibrinopéptidos de fibrinógeno para formar el monómero de fibrina. En la etapa no enzimática, la fibrina monomérica se autoensambla espontáneamente para producir oligómeros de fibrina que se alargan para formar protofibrillas bicatenarias. Las protofibrillas se agregan tanto lateralmente (Tsurupa et al., 2012) como longitudinalmente para formar fibras que se ramifican determinando así la estructura tridimensional del coágulo (Weisel & Litvinov, 2018). Finalmente, el polímero de fibrina se estabiliza mediante reticulación covalente mediante la acción de una transglutaminasa plasmática, el Factor XIIIa (FXIIIa), que formará un coágulo de fibrina maduro mecánica y químicamente más estable (Schense & Hubbell, 1999) (Figura I5).

Cuando alrededor del 15-20% de fibrinógeno se ha convertido en fibrina, se produce la gelificación. La cinética de la conversión determina parámetros como el diámetro, la densidad y la longitud de la fibra, así como el tamaño de poro. El tamaño de poro no limita la difusión de proteínas en los coágulos, sin embargo, puede verse drásticamente reducida cuando la matriz está embebida de células sanguíneas y comprimida como ocurre en un coágulo en contracción (Cines et al., 2014).

Se ha demostrado que la polimerización de la fibrina es un proceso reversible (Chernysh, Nagaswami, Purohit, & Weisel, 2012), sin embargo, no se ha encontrado ninguna enzima humana capaz de romper esta reticulación que la vuelve mecánicamente más fuerte y resistente a la fibrinólisis.

La fibrina juega un papel fundamental en la coagulación sanguínea. La red tridimensional que genera posee principalmente una función mecánica, actuar como un tapón para

evitar la pérdida de sangre. Además, debe desempeñar dicha función bajo los efectos del flujo sanguíneo, la contracción de las plaquetas, la presión sanguínea y la contracción de músculos adyacentes.

Adicionalmente, la fibrina participa en la cicatrización, en la interacción de células con la matriz permitiendo la adhesión, la proliferación y la migración de células como los fibroblastos (L. F. Brown et al., 1993), las células inflamatorias (Laurens, Koolwijk, & de Maat, 2006) y endoteliales (Schleef & Birdwell, 1982) para el desarrollo de sus funciones.

### 1.1.3 Fibrinólisis o Hemostasia Terciaria

La estructura de la red de fibrina formada durante la coagulación determinará las propiedades biomecánicas de la fibrina y su fibrinólisis. Las propiedades mecánicas del coágulo deben ser suficientes para ejercer un efecto hemostático resistente capaz de soportar la presión arterial, y a su vez conferir una elasticidad que permita remodelar el coágulo tras conseguirse el efecto deseado (Weisel, 2007). Las propiedades mecánicas del coágulo dependen de varios factores como las características de los monómeros de fibrina y la reticulación ejercida por FXIII que aumenta la resistencia del coágulo a la deformación (Weisel, 2004) haciendo que enlaces cruzados paralelos aumenten la extensibilidad, mientras que los enlaces cruzados perpendiculares la limiten (Houser et al., 2010; W. Liu, Carlisle, Sparks, & Guthold, 2010).

La fibrinólisis produce la lisis del coágulo para evitar la formación de un trombo. La hemostasia es el resultado de un equilibrio entre, por un lado, los agentes que causan la producción de fibrina (procoagulantes), y por otro lado, y los agentes inhibidores de la coagulación y los promotores de la fibrinólisis (anticoagulantes), siendo ambos fundamentales para una correcta cicatrización de la herida. Entre estos agentes anticoagulantes hay que distinguir entre anticoagulantes naturales, cuya función es la regulación de los factores participantes en la cascada de coagulación, y los fibrinolíticos, que conducen a la generación de plasmina libre para producir la lisis de la fibrina.

Entre los anticoagulantes naturales se encuentran el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), una proteína plasmática asociada a una lipoproteína que inhibe la vía extrínseca de coagulación al formar un complejo junto al TF, al FXa y al FVIIa. Otro anticoagulante natural es la antitrombina (AT), una proteína que inhibe la vía intrínseca de la

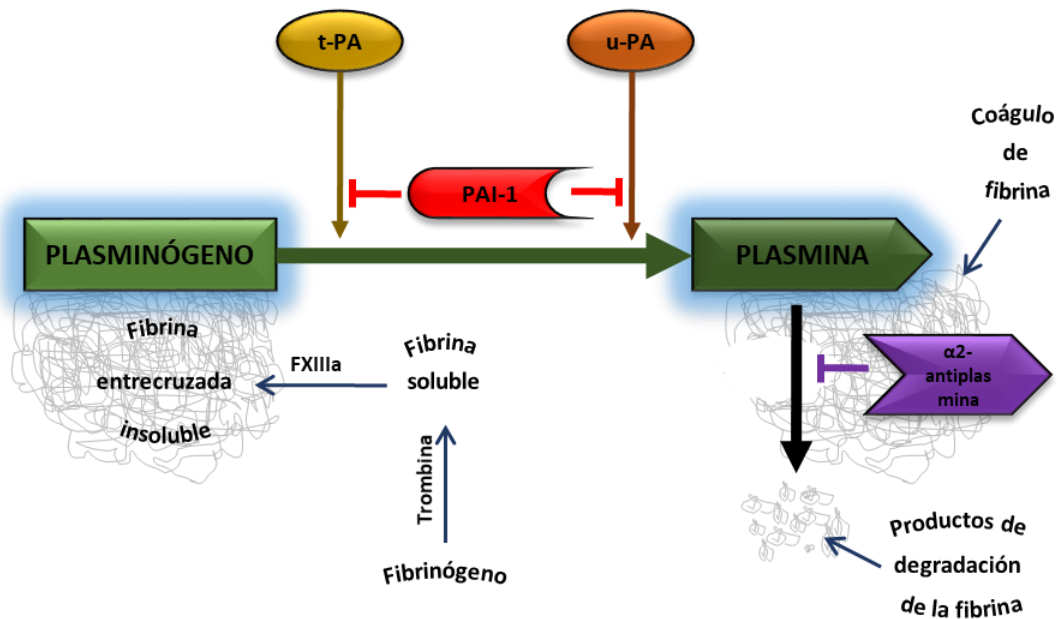
coagulación actuando sobre factores como FIXa, FXa, FXIa y FXIIa (Espinosa & Reverter, 2001).

Los agentes fibrinolíticos dan lugar a la generación de plasmina. Dicha generación se produce por la escisión del plasminógeno por parte del activador tisular del plasminógeno (t-PA) así como por la uroquinasa (u-PA), factores segregados por el endotelio y monocitos, macrófagos y epitelio urinario respectivamente. La plasmina a su vez modificará t-PA y u-PA mediante un mecanismo de retroalimentación positiva haciéndolas más activas. Esta activación aumenta también con la presencia de fibrina al unir en su superficie plasminógeno y t-PA formando un complejo ternario que aumenta la afinidad entre estos dos últimos facilitando así la formación de plasmina (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005; Espinosa & Reverter, 2001; Hoylaerts, Rijken, Lijnen, & Collen, 1982; Rånby, 1982).

La plasmina se encargará de romper los enlaces peptídicos de las cadenas de fibrina, liberando productos de degradación de la fibrina con extremos C-terminales con lisina que actúan como sitios de unión adicionales para la plasmina (Harpel, Chang, & Verderber, 1985; Suenson, Lützen, & Thorsen, 1984). La degradación de la fibrina generará fibrinopéptidos solubles que serán eliminados por proteasas en los macrófagos del hígado y el riñón (Figura I6).

La fibrinólisis se encuentra principalmente regulada por dos factores inhibidores: la alfa 2-antiplasmina, que forma un complejo con la plasmina para inhibir su actividad, y el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1), que actúa en la vía extrínseca evitando que el t-PA posibilite la activación del plasminógeno (Figura I6).

La porosidad en la malla de fibrina va a condicionar el grado de fibrinólisis. Los coágulos que poseen fibras densas y un tamaño de poro pequeño disminuyen la permeabilidad para las enzimas líticas, ejerciendo una resistencia mayor a la lisis y por tanto una degradación más lenta.



**Figura 16. Diagrama esquemático de la Fibrinolisis.** En rasgos generales, durante la fibrinolisis el plasminógeno es escindido por el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y por la uroquinasa (u-PA) para generar plasmina libre. La plasmina romperá los enlaces peptídicos de las cadenas de fibrina para liberar los productos de degradación de la fibrina que serán eliminados por macrófagos en el hígado o el riñón. Este proceso de fibrinolisis se regula principalmente por dos inhibidores, por un lado el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) que inhibe la actividad de t-PA y u-PA, y por otro lado, la  $\alpha_2$ -antiplasmina que se une a la plasmina libre formando un complejo e inhibiendo así su actividad proteolítica.

## 1.2 Agentes Hemostáticos

Las hemorragias incontroladas siguen siendo la mayor preocupación en intervenciones quirúrgicas por provocar una variedad de escenarios patológicos que pueden conducir a altos ratios de mortalidad, morbilidad y largos periodos de hospitalización. Tanto durante la realización de procedimientos quirúrgicos (digestivo, torácicos, vasculares, urológicos, ginecológicos...) como en lesiones traumáticas por accidentes, quemaduras o en el campo de batalla, se producen importantes pérdidas de sangre que pueden ocasionar fallecimientos (Butler & Blackbourne, 2012; Holcomb, 2010; Krug, Sharma, & Lozano, 2000) (potencialmente prevenibles) derivados de la hipotermia, coagulopatía, infección, acidosis y fallo multiorgánico (Cohen, 2014; Simmons, Pittet, & Pierce, 2014). Además, ciertas discrasias sanguíneas (trastorno sanguíneo en cualquiera de los constituyentes de la sangre, como por ejemplo deficiencias de los factores de la



coagulación y disfunciones plaquetarias) así como los efectos inducidos por algunos fármacos (por ejemplo la supresión de la médula ósea debido a la quimioterapia y radioterapia en pacientes con cáncer) pueden poner a ciertas poblaciones de pacientes en alto riesgo de sangrado (Blajchman, 2003; Demetri, 2000).

En muchas lesiones hemorrágicas, los mecanismos inherentes al organismo se vuelven insuficientes para cesar el sangrado rápidamente, requiriendo por tanto de la administración de ciertos materiales y medicamentos para facilitar, aumentar y compensar o imitar los mecanismos naturales de la hemostasia. A pesar de los avances en las técnicas quirúrgicas, preevaluación anestésica y/u otras prácticas perioperatorias (sutura, cauterización, ablación, etc.) la reducción de sangrado durante las cirugías suele ser transitoria e incompleta. En este escenario resulta imprescindible el uso de herramientas quirúrgicas como los hemostáticos, los selladores y los adhesivos, capaces de disminuir el sangrado mediante coagulación de la sangre, sellado de los vasos o pegando tejidos respectivamente, previniendo así el sangrado intra- y/o post-operatorio y reduciendo los costes generales derivados de las transfusiones y los largos tiempos de hospitalización que ello conlleva. Los expertos coinciden en que no existe un único producto ideal en la actualidad, resultando por tanto necesario el desarrollo y la investigación de nuevos materiales y tecnologías para el manejo y cese eficaz de la hemorragia (W. D. Spotnitz & Burks, 2008).

La Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos define que un agente hemostático es aquel agente o dispositivo que se emplea con la finalidad de producir hemostasia acelerando el proceso de coagulación de la sangre.

El agente hemostático debe poseer ciertos requisitos que resultan necesarios para su uso quirúrgico. Para ello existen cinco puntos fundamentales a analizar (W. D. Spotnitz, 2008): seguridad, eficacia, aplicabilidad, coste y aprobación.

1. Seguridad. El material ha de ser seguro para el manipulador y el paciente, no ocasionando en éste efectos adversos a corto o largo plazo tales como respuestas inmunogénicas, carcinogénicas o enfermedades infecciosas.
2. Eficacia. Debe poseer una rápida eficacia para reducir la pérdida de sangre y mantener esta condición hemostática durante una larga duración si es necesario.

3. Aplicabilidad. El material debe ser fácilmente reconstituible y utilizable por personal no especializado si fuese necesario y poder adaptarse a cualquier tipo de herida sangrante. Factores como la descongelación del producto, la preparación de las mezclas, la carga de dispositivos aplicadores y la dificultad de aplicación disminuyen la eficacia.
4. Coste. El coste es una de las principales consideraciones en la elección del agente hemostático. Sin embargo, se debe tener en cuenta que una mayor eficacia hemostática, aún a coste superior, puede reducir el tiempo de intervención quirúrgica y/o el tiempo de hospitalización y disminuir así los costes significativamente (Meraney & Gill, 2002).
5. Aprobación. La autorización de comercialización por parte de las autoridades sanitarias competentes no es algo irrelevante. Algunos hemostáticos aprobados por la FDA no siempre son aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y viceversa, solicitando en ocasiones requisitos adicionales, alargando los tiempos de aprobación (W. D. Spotnitz, 2008) o incluso revocándolos.

Dentro de los agentes hemostáticos se incluyen los hemostáticos tópicos, los sellantes y los adhesivos por su efecto, directo o indirecto, sobre la hemostasia.

### 1.2.1 Hemostáticos tópicos

Son materiales que hacen que la sangre coagule y necesitan de ésta para desempeñar su función. Se usan mayormente para interrumpir el sangrado no cauterizable. En la Tabla I1 se resumen los tipos de hemostáticos tópicos más relevantes existentes en el mercado, así como detalles remarcables sobre su seguridad, eficacia, aplicabilidad y costes.

### 1.2.2 Sellantes

Evitan la pérdida de elementos y fluidos tanto coagulantes (sangre) como no coagulantes (líquido cefalorraquídeo del sistema nervioso central, contenido gastrointestinal y aire). Su efecto hemostático se debe al hecho de actuar como barrera a pesar de no producir directamente la coagulación. En la Tabla I2 se resumen los tipos de sellantes más relevantes existentes en el mercado, así como detalles remarcables sobre su seguridad, eficacia, aplicabilidad y costes.

CATEGORIA	CLASE	PRODUCTO	FABRICANTE	SEGURIDAD	EFICACIA/APLICABILIDAD	COSTE
<b>Mecánicos</b>	<i>Gelatina porcina</i>	Gelfoam (esponja y polvo*) Surgifoam (esponja y polvo*)	Pfizer, New York, NY Ethicon/J&J, Somerville, NJ	Principal problema es el incremento del tamaño (excepto las ceras) no siendo en ocasiones aconsejable su uso en lugares donde la no compresión de los tejidos es crucial (cirugía neurológica, oftalmológica y urológica).  Posibles reacciones alérgicas.	Eficaces con sangrado mínimo. Fácil de preparar y usar.	Relativamente económicos
	<i>Colágeno bovino</i>	Avitene (esponja y polvo*) Helistat & Helitene Instat, Instat MCH, y Ultrafoam	Bard, Murray Hill, NJ Integra, Plainsboro, NJ J&J, Somerville, NJ			
	<i>Celulosa oxidada regenerada</i>	Surgicel, Surgicel fibrillary Nu-Knit	J&J, Somerville, NJ			
	<i>Esferas de polisacáridos</i>	Arista AH Hemostase MPH Vitasure	Medafor, Minneapolis, MN Cryolife, Kennesaw, GA Orthovita, Malvern, PA			
	<i>Ceras</i>	BoneWax Ostene	Ethicon/J&J, Somerville, NJ Baxter International, Deerfield, IL			
<b>Activos</b>	<i>Trombina bovina</i>	Thrombin-JMI	KingPharmaceuticals, Bristol, TN	Transmisión de enfermedades: virus, priones (humana).	Eficaces para sangrado localizado y difuso.	Relativamente costosos
	<i>Trombina procedente de mezcla de plasmas humanos (± esponja o polvo de gelatina porcina)</i>	Evithrom	Ethicon/J&J, Somerville, NJ	Mismos problemas que los mecánicas (aumento de tamaño) Reacción alérgica a proteínas animales.	Relativamente fácil de preparar y usar.	
	<i>Trombina recombinante</i>	Recothrom	Zymogenetics, Seattle, WA		Pueden aplicarse combinados con esponjas.	
<b>Espumas</b>	<i>Gelatina bovina y trombina procedente de mezcla de plasmas humanos</i>	Floseal	Baxter, Fremont, CA	Mismos problemas que para los hemostáticos mecánicos (incremento de tamaño) y activos (transmisión de enfermedades).	Muy eficaces para sangrado localizado y en combinación con esponjas. Relativamente fácil de preparar y usar.	Muy costosos
	<i>Gelatina porcina (±trombina procedente de mezcla de plasmas humanos)</i>	Surgiflo	J&J, Somerville, NJ			
<b>Sellantes de fibrina</b>	<i>Mezcla líquida de plasmas humanos</i>	Tisseel Evicel/Vistaseal	Baxter, Westlake Village, CA J&J, Somerville, NJ	Transmisión de enfermedades (mezcla de plasmas de origen humano).	Eficaces para el control del sangrado localizado y difuso ya que pueden aplicarse localmente utilizando una jeringa o spray.	Muy costosos (sobre todo los parches)
	<i>Plasma autólogo (PA), (±colágeno bovino y trombina bovina )</i>	Vitagel Cryoseal	Orthovita/Stryker, Malvern, PA Thermogenesis, RanchoCordova, CA	Formación de anticuerpos (trombina bovina).		

CATEGORIA	CLASE	PRODUCTO	FABRICANTE	SEGURIDAD	EFICACIA/APLICABILIDAD	COSTE
	<i>Mezcla de plasmas humanos y parche de colágeno equino</i>	Tachosil	Baxter, WestlakeVillage, CA	Incremento del tamaño (colágeno equino y bovino). Necesidad de un sistema de coagulación intacto.	Más complejos de preparar y de usar.	
	<i>Mezcla de plasmas humanos y parche de celulosa oxidada regenerada</i>	Evarrest	Ethicon/J&J, Somerville, NJ			

**Tabla I1. Sistema de clasificación de Hemostáticos de Uso Tópico.** \* disponible en formato polvo y formato esponja.

CATEGORIA	CLASE	PRODUCTO	FABRICANTE	SEGURIDAD	EFICACIA/APLICABILIDAD	COSTE
<b>Sellante de fibrina</b>	Mezcla líquida de plasmas humanos	Tisseel Evicel	Baxter, Westlake Village, CA J&J, Somerville, NJ	Transmisión de enfermedades (mezcla de plasmas humanos)	Sellado moderado. Más complejos de preparar y de usar.	Muy costoso
	Mezcla de plasmas humanos y parche de colágeno equino	Tachosil	Baxter, WestlakeVillage, CA	Formación de anticuerpos (trombina bovina)	Eficaces para el control del sangrado localizado y difuso ya que pueden aplicarse localmente utilizando una jeringa o spray.	
	Mezcla de plasmas humanos y parche de celulosa oxidada regenerada	Evarrest	Ethicon/J&J, Somerville, NJ	Incremento del tamaño (colágeno equino y bovino).		
<b>Polímeros de polietilenglicol (PEG)</b>	Dos PEG	Coseal	Baxter, Fremont, CA	Aumento del tamaño (Coseal hasta el 400%) no siendo aconsejable su uso en lugares cerrados para evitar efectos indeseados de la presión, por ejemplo en nervios.	Sellado moderado. Relativamente fácil de preparar y usar.	Muy costoso
	PEG y trilisina amina	Duraseal	Covidien, Mansfield, MA			
	NHS-PEG y colágeno bovino	Hemopatch	Baxter AG, Vienna, Austria	Sensibilización en la piel en animales (Coseal). Respuesta hipersensible a proteínas bovinas (Hemopatch) y alérgica por el colorante azul FD&C (Duraseal y Hemopatch).	Pueden aplicarse combinados con esponjas.	
<b>Albumina y glutaraldehido</b>	Albúmina de suero bovino y 10% glutaraldehido	Biogluce	Cryolife, Kennesaw, GA	Potencial daño en tejidos (nervio, nódulo sinoauricular). Necrosis local del tejido. Pseudoneurisma. Embolia. Reacciones de hipersensibilidad. Riesgo de irritación en mucosas.	Sellado destacado. Necesita especial atención durante su uso. Proteger con gasas los lugares cercanos a la aplicación. Atención al retirar.	Muy costosos
<b>Cianocrilato</b>	2-octil y butillactoilcianocrilato	Omnex	Ethicon/J&J, Somerville, NJ	Relativamente seguros. No inyectar vascularmente. Pueden presentarse casos de hipersensibilidad a los cianocrilatos o sus productos de degradación (formaldehido).	Sellado destacado. Moderado en el cierre de la piel. Fácil de preparar y de usar. Primer cianocrilato absorbible aprobado por la FDA. Indicado para uso vascular, no sustituye suturas o grapas.	Económicos

**Tabla 12. Sistema de clasificación de Sellantes.** NHS-PEG: pentaeritritol poli etilenglicol éter tetra-succinimidil glutarato de N-hidroxisuccinimida. PEG: poli etilenglicol.

CATEGORIA	CLASE	PRODUCTO	FABRICANTE	SEGURIDAD	EFICACIA/APLICABILIDAD	COSTE
<b>Sellante de fibrina</b>	Mezcla líquida de plasmas humanos	Artiss	Baxter, Westlake Village, CA	<p>Transmisión de enfermedades (mezcla de plasma humano).</p> <p>Riesgo de embolia gaseosa si se usa con pulverizadores a presión.</p> <p>Posible reacción alérgica.</p>	<p>Sellado moderado. Eficaces para el control del sangrado localizado y difuso ya que se aplica localmente utilizando una jeringa. Más complejos de preparar y de usar.</p>	Se encuentran entre los más costosos dentro del grupo.
<b>Albumina y glutaraldehido</b>	Albúmina de suero bovino y 10% glutaraldehido	Bioglue	Cryolife, Kennesaw, GA	<p>Potencial daño en tejidos (nervio, nódulo sinoauricular). Necrosis local del tejido. Pseudoneurisma. Embolia. Reacciones de hipersensibilidad. Riesgo de irritación en mucosas.</p>	<p>Moderadamente fácil de preparar y usar.</p> <p>Necesita especial atención durante su uso. Proteger con gazas los lugares cercanos a la aplicación. Atención al retirar.</p>	Muy costoso
<b>Cianocrilato</b>	2-Octil cianocrilato (± malla de poliéster)	SurgiSeal Dermabond	Adhezion Biomed., Wyomissing, PA Ethicon/J&J, Somerville, NJ	<p>Recomendado para uso externo. Producen daño ocular. Pueden presentarse casos de hipersensibilidad a los cianocrilatos, al formaldehido o al violeta D&amp;C n°2 (Histoacryl blue).</p>	<p>Fácil de preparar y de usar. Indicados únicamente para uso tópico externo.</p>	Económicos
	Butil-2-cianocrilato	Indermil Histoacryl y Histoacryl blue	U.S. Surgical, Norwalk, CT TissueSeal, Ann Arbor, MI			

**Tabla 13. Sistema de clasificación de Adhesivos.**

### 1.3.1 Adhesivos

Son pegamentos que fijan tejidos entre sí como pueden ser los músculos y la piel. Aun no produciendo coagulación, los adhesivos actúan como agentes hemostáticos cuando se utilizan para unir estructuras vasculares y reducir así la pérdida de sangre. En la Tabla 13 se resumen los tipos de adhesivos más relevantes existentes en el mercado, así como detalles remarcables sobre su seguridad, eficacia, aplicabilidad y costes.

Existen agentes hemostáticos que debido a sus indicaciones pueden ser incluidos en más de un grupo, como el caso de los sellantes de fibrina que pueden ejercer de hemostático tópico y/o sellante. En la figura 17 aparecen algunos ejemplos de los agentes hemostáticos comerciales más representativos.



## POLÍMEROS DE PEG



## CIANOCRILATOS



## ALBÚMINA Y GLUTARALDÉHIDO

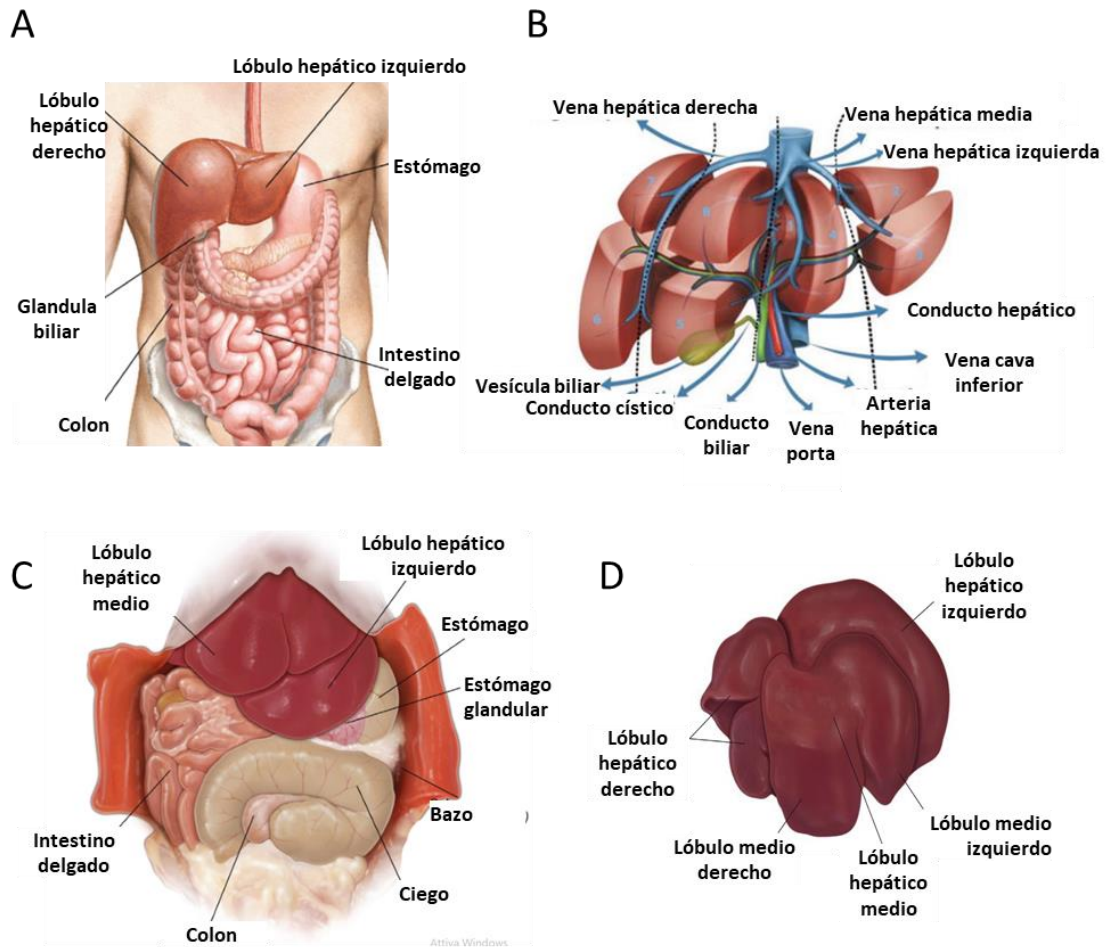


**Figura 17. Agentes hemostáticos.** Imágenes de hemostáticos comerciales representativos de cada una de las categorías presentadas en la clasificación. Entre los agentes hemostáticos se encuentran productos hemostáticos de uso tópico (encuadrados con marco azul), sellantes (marco naranja) y/o adhesivos (marco verde).

### 1.4 Resección hepática y Modelo animal

El hígado es un órgano con varias funciones importantes como la producción de bilis, el almacenamiento de glucosa, la depuración de fármacos, la regulación de la coagulación sanguínea, etc. Está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal y consta de dos lóbulos principales formados por ocho segmentos constituidos por miles de lobulillos interconectados que convergen para dar lugar a un conducto hepático común. Todo este sistema de conductos requiere de la anatomía vascular más compleja del organismo humano (Figura 18.A-B).





**Figura 18. Anatomía del hígado.** A) Anatomía regional del hígado humano. B) Anatomía macroscópica del hígado humano. C) Anatomía regional del hígado de rata. D) Anatomía macroscópica del hígado de rata. (Imágenes adaptada de Rogers & Dintzis, 2018 (A, C y D) y Harminder Bhogal, Pericleous, & Z. Khan, 2019 (B)).

La resección hepática hace referencia a la extirpación quirúrgica parcial del hígado. Esta operación se realiza mayormente en pacientes con metástasis de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular y conlleva una mortalidad y morbilidad aproximadas del 3,5% y 40% respectivamente (Finch et al., 2007; Reissfelder et al., 2011). En muchos de estos casos la resección hepática representa la única opción curativa para estas patologías.

La pérdida de sangre es una de las mayores preocupaciones durante la resección hepática. El sangrado difuso incontrolado de grandes superficies denudadas y de vasos sanguíneos puncionados o seccionados interfiere en la visión de las estructuras subyacentes, favorece la formación de hematomas postoperatorios y puede ocasionar infecciones (Jimenez-Castro, Elias-Miro, Casillas-Ramirez, & Peralt, 2013) Estas pérdidas

de sangre llegan a alcanzar los 0,2-2 litros por paciente pudiendo incluso causar la muerte (Gurusamy, Kumar, Ramamoorthy, Sharma, & Davidson, 2009). En un intento de minimizar el impacto de la pérdida de sangre durante la resección hepática, los especialistas han venido desarrollando una serie de mejoras (Eeson & Karanicolas, 2016; Moggia et al., 2016) como son:

- Técnicas no operativas: disminución de la presión venosa central, estrategias de autotransfusión como donación preoperatoria, hemodilución normovolémica aguda (ANH) y rescate celular intraoperatorio.
- Uso de fármacos como antifibrinolíticos (aprotinina y ácido tranexámico) o procoagulantes (Factor VIIa, antitrombina III y desmopresina), todos con decepcionantes resultados (Gurusamy, Li, Sharma, & Davidson, 2009).
- Optimización de métodos de transección hepática: electrobisturí, bisturí de argón y ultrasónico.
- Uso de agentes hemostáticos.

Estas técnicas de control sanguíneo se utilizarán según el grado de severidad del daño hepático. Para un control inicial del sangrado del parénquima se pueden utilizar la compresión manual, pinzamiento portal o empaquetamiento perihepático (packing). Si el sangrado continúa de manera moderada se usarán agentes hemostáticos de uso tópico, técnicas de electrocirugía y ligaduras de los vasos parenquimales. Y para heridas severas se podría necesitar técnicas de exclusión y control vascular (maniobra de Pringle o exclusión vascular total) (Jimenez-Castro et al., 2013). No existe una técnica única y superior a las demás, por lo que cada centro seguirá sus propios protocolos de disminución de la pérdida sanguínea durante las resecciones hepáticas.

Los modelos animales representan una herramienta fundamental para la investigación de la hemostasia hepática. Estos modelos se clasifican en cuatro grupos: espontáneos, inducidos, negativos y huérfanos. La resección hepática es un modelo manipulado quirúrgicamente, un subgrupo perteneciente a los modelos inducidos. En la elección del modelo experimental hay que tener en cuenta las diferencias y semejanzas entre especies. El uso de la rata como modelo animal conlleva ventajas como su manipulación, logística y coste. Sin embargo, la extrapolabilidad de los resultados puede verse limitada por su diferencia anatómica y su rápido metabolismo (Jimenez-Castro et al., 2013). A

diferencia del humano, las ratas poseen un hígado anatómicamente diverso con cuatro lóbulos hepáticos (derecho, medio, izquierdo y caudal) que se encuentran a su vez subdivididos en dos (a excepción del izquierdo) (Figura I8.C-D). Sin embargo, éste posee un sistema vascular (vena porta y arteria hepática) similar que los hace comparables.

Existen un gran número de estudios preclínicos de hepatectomía a considerar en el desarrollo de un modelo experimental. Ya en 1931, Higgins y Anderson (Higgins & Anderson, 1931) desarrollaron el modelo clásico de hepatectomía parcial en rata, un modelo sencillo que comprometía hasta aproximadamente el 70% del hígado. Con el tiempo se han desarrollado modelos de hepatectomías capaces de alcanzar la supervivencia de ratas con un 90% de hígado extirpado (Martins, Theruvath, & Neuhaus, 2008). Ante la amplia variedad del modelo experimental, la elección deberá tener como premisa el problema clínico que se quiere resolver.

## **1.5 Medicamentos Biológicos y de Terapias Avanzadas**

### **1.5.1 Concepto y clasificación de Medicamentos Biológicos**

Según el Real Decreto 1345/2007, *“Un medicamento biológico es un producto cuyo principio activo es biológico. Una sustancia biológica es aquella que se produce o se extrae a partir de una fuente biológica y que necesita, para su caracterización y determinación de su calidad, una combinación de ensayos físico-químico y biológico junto con el proceso de producción y su control. En el caso de los medicamentos biológicos, se entenderá por materiales de partida toda sustancia de origen biológico, tales como los microorganismos, órganos y tejidos de origen vegetal o animal, las células o fluidos (incluyendo sangre y plasma) de origen humano o animal y los diseños celulares biotecnológicos (sustratos celulares, sean o no recombinantes, incluidas las células primarias)”*(R.D. 1345/2007).

Se consideran por tanto medicamentos biológicos, los medicamentos derivados de la sangre o el plasma humanos; y los medicamentos de terapia avanzada.

La definición de medicamento biológico según las directrices regulatorias europeas resulta algo ambigua, permitiendo a las autoridades de cada país a especificar y regular con más precisión este tipo de medicamentos. Esto implica la existencia de diferencias

significativas entre países y conlleva a que un mismo producto pueda ser considerado biológico en un país y en otro no (Klein, De Bruin, Broekmans, & Stolk, 2015).

Las características generales que diferencian un medicamento biológico de un medicamento tradicional se muestran en la Tabla I4 (Cuñetti, 2014).

	<b>MEDICAMENTOS TRADICIONALES</b>	<b>MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS</b>
<b>Estructura</b>	Simple o poco compleja	Muy compleja
<b>Peso molecular</b>	Bajo (<1kD)	Alto (>50kD)
<b>Síntesis</b>	Orgánica (semisintéticos) Pocos pasos críticos	A partir de células/organismos vivos Muchos pasos críticos
<b>Estructura</b>	Caracterizada	No bien caracterizada
<b>Homogeneidad</b>	Homogeneidad en los principios activos	Complejas mezclas heterogéneas
<b>Dosis</b>	Dosis máxima tolerada	Dosis biológica óptima
<b>Curva dosis</b>	Respuesta lineal	Respuesta no lineal
<b>Mecanismos de acción</b>	Conocidos	Poco conocidos
<b>Eliminación</b>	Por metabolización	Por degradación

**Tabla I4. Diferencias principales entre los medicamentos tradicionales y los biológicos.**

Las características distintivas de los medicamentos biológicos generan algunas dificultades no encontradas en los medicamentos tradicionales (Tabla I4). No sólo deben mostrar su eficacia y seguridad como cualquier medicamento, además deben enfrentarse en ocasiones a complejos y costosos procesos productivos, al desarrollo de adecuados controles de calidad, a un riesgo mayor de inmunogenicidad, a un espectro farmacodinámico nuevo y a un perfil farmacocinéticos propio, entre otros (Ruiz & Sulleiro, 2011; Tamosiunas, 2020).

Los medicamentos biológicos se pueden clasificar según su uso en (European Medicines Agency, 2014):

- Sangre humana y derivados sanguíneos.
- Productos de terapia celular.
- Productos de terapia génica.
- Productos biotecnológicos.
- Productos de origen animal o humano.

La Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) considera como medicamentos biológicos los agentes hemostáticos derivados de plasma, aquellos que contienen como principio activo fibrinógeno y/o trombina combinados o no. Según la clasificación presentada en el capítulo anterior, las categorías de hemostáticos activos y sellantes de fibrina entrarían dentro de este grupo.

### 1.5.2 Concepto y clasificación de ATMP

Los medicamentos de terapias avanzadas (ATMP, del inglés Advanced Therapy Medicinal Products) son medicamentos de uso humano que se basan en genes, tejidos o células. Estos medicamentos incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico y ofrecen nuevas oportunidades innovadoras para el tratamiento de enfermedades y lesiones.

Los ATMP se pueden clasificar en tres tipos principales (Regulation (EC) 1394/2007) :

1. Medicamentos de Terapia Génica: aquellos cuyos principios activos son un ácido nucleico recombinante que conduce a un efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico. Generalmente se usan para tratar una variedad de enfermedades, incluidos trastornos genéticos, cáncer o enfermedades a largo plazo.
2. Medicamentos de Terapia Celular: contienen células somáticas o tejidos que han sufrido una manipulación sustancial para cambiar sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales para curar, diagnosticar o prevenir enfermedades.

3. Medicamentos de Ingeniería Tisular: aquel que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería y que se emplea o se administra a las personas para regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano.

Los medicamentos de ingeniería tisular incluyen, viables o no, células o tejidos de origen humano, animal, o ambos. Adicionalmente podrán contener biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, productos celulares y/o matrices.

Las células o tejidos se considerarán «manipulados por ingeniería» si cumplen al menos una de las condiciones siguientes: las células o tejidos han sido sometidos a manipulación sustancial para que puedan usarse para reparar, regenerar o reemplazar tejidos humanos; o si las células o tejidos no están destinados a emplearse para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante.

El concepto de manipulación sustancial puede resultar en ocasiones ambiguo, por este motivo se ha incluido en anexo I del Reglamento (CE) nº1394/2007 lo que no se considera dentro de esta definición, que es: corte; trituración; moldeo; centrifugación; imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas; esterilización; irradiación; separación, concentración o purificación celular; filtrado; liofilización; congelación; criopreservación y vitrificación. Hay que enfatizar que el cultivo celular, común en muchos tipos de terapias avanzadas, se considera manipulación sustancial.

Un medicamento que pueda corresponder tanto a la definición de producto de ingeniería tisular como a la de medicamento de terapia celular se considerará producto de ingeniería tisular. Además, existen ATMP combinados que son aquellos que contienen uno o más dispositivos médicos como parte integral del medicamento. Un ejemplo de estos son las células embebidas en una matriz o andamio biodegradable.

La pérdida de tejido y órganos causados por trauma, enfermedades o defectos congénitos han llevado a la comunidad científica a mejorar las terapias y tecnologías que puedan reparar y regenerar tejidos de forma fiable y segura (Dzobo et al., 2018). Ante este escenario, el trasplante de órganos y tejidos, los dispositivos mecánicos o la reconstrucción quirúrgica prevalecen como un sustituto del daño tisular (Carrel & Burrows, 1911). Sin embargo, la eficacia de estos métodos no siempre es la deseada, apareciendo complicaciones en algunas circunstancias: la demanda de órganos es

superior a las donaciones y en algunos casos se producen rechazo de los tejidos; los dispositivos mecánicos no son capaces de imitar por completo las funciones realizadas por el tejido natural; y las reconstrucciones quirúrgicas no siempre son eficaces (Sharma, Kumar, Sharma, Bhatt, & Dhot, 2019).

Aunque la ingeniería de tejidos se encuentra aún en una etapa de desarrollo, esta disciplina constituye una alternativa con alto potencial para satisfacer los problemas presentados. Actualmente las aplicaciones clínicas de terapias de ingeniería tisular están en expansión y posiblemente en un futuro cercano posean un gran impacto económico con el desarrollo de su actividad industrial (Lysaght, Michael J.; Hazlehurst, 2004). Aun así, existe la necesidad de realizar estudios que nos ayuden a encontrar sustitutos idóneos para la reparación y/o sustitución de tejidos dañados (Williams, 2004). Solo la investigación de sus herramientas (biomateriales, células y factores de crecimiento) nos permitirá superar este desafío (Sharma et al., 2019).

## **1.6 Hidrogeles de fibrina y agarosa**

Los hidrogeles son polímeros que forman unas redes tridimensionales capaces de albergar un alto contenido de agua. En función de la naturaleza del polímero que los constituye, los hidrogeles pueden clasificarse en naturales, sintéticos o híbridos. Estos materiales se entrecruzan mediante fuerzas que determinarán su resistencia a la expansión y su capacidad de absorción de agua. Como consecuencia, el hidrogel posee un estado de “hinchazón” que determinará propiedades como la difusión y transporte interno así como la resistencia mecánica (Roorda, BoddÉ, de Boer, & Junginger, 1986).

Desde su descubrimiento en los años '60 por Wichterle y Lim (Wichterle & Lím, 1960), los hidrogeles han despertado un especial interés en biomedicina por sus cualidades de biocompatibilidad y biodegradabilidad (Farhat et al., 2018). Con el tiempo se han ido superando sus limitaciones de formación bajo ciertas condiciones fisiológicas y de toxicidad de sus agentes de entrecruzamiento. De esta forma, se han conseguido materiales más versátiles que han supuesto terapias menos invasivas gracias a un mayor conocimiento de los procesos biológicos y de la química de los polímeros (Buwalda et al., 2014).

Uno de los materiales más conocidos para la formación de hidrogeles es la fibrina, cuya fuente principal es el fibrinógeno del plasma sanguíneo. En 1909 se realizó el primer uso clínico de una emulsión de fibrina para la cicatrización de una herida (Bergel, 1909). Desde entonces, la fibrina se ha utilizado en la reconstrucción de tejidos como la piel, los ojos, el corazón, nervio y otros órganos (De la Puente & Ludeña, 2014) gracias a sus propiedades que permiten la creación de estructuras tridimensionales con funciones y arquitecturas biomiméticas (Egorikhina et al., 2019).

Los andamios de fibrina facilitan la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular gracias a su alto nivel de hidratación, porosidad y estructura fibrilar (De la Puente & Ludeña, 2014). Sin embargo, estos hidrogeles poseen pobres propiedades mecánicas que los hacen frágiles y difícilmente manipulables (Oyen, 2014), por lo que suelen necesitar de otras estrategias para reforzar su función. Entre estas se encuentra la posibilidad de combinar la fibrina con un polímero secundario para generar un hidrogel con propiedades biológicas, estructurales y mecánicas deseadas (Annabi et al., 2014).

La agarosa es un polisacárido (polímero natural) lineal formado por unidades disacáridas de galactosa alfa y beta que se obtiene de algas marinas (*Gellidium* y *Gracillaria*). Es un material soluble a altas temperaturas y cuya gelación forma hidrogeles termorreversibles. Sus propiedades térmicas y mecánicas se ven afectadas por la concentración del polímero, el pH y el tipo de disolvente (Gómez-Mascaraque, Méndez, Fernández-Gutiérrez, Vázquez, & San Román, 2014). Posee múltiples aplicaciones como herramienta en el campo de la ingeniería tisular (Zarrintaj et al., 2018) gracias a su biocompatibilidad y su capacidad de formar geles muy resistentes incluso a bajas concentraciones.

Los hidrogeles pueden someterse a un proceso de compresión plástica llamado nanoestructuración. Cuando los hidrogeles son sometidos a esta técnica se produce una modificación de sus propiedades biomecánicas debido al aumento de la densidad y rigidez (Abou Neel, Cheema, Knowles, Brown, & Nazhat, 2006; Bitar, Salih, Brown, & Nazhat, 2007). Los hidrogeles sufrirán una deshidratación parcial como consecuencia de la nanoestructuración formando enlaces nanomoleculares entre fibras que no alteran significativamente la viabilidad celular (R. A. Brown, Wiseman, Chuo, Cheema, & Nazhat, 2005; Campos, 2017; Hadjipanayi et al., 2011). Por tanto, el grado de



nanoestructuración permitirá la modulación de las propiedades biomecánicas (Ionescu et al., 2011) para fabricar tejidos artificiales aptos para la aplicación deseada.

Durante los últimos quince años, el grupo de investigación de los Doctores Miguel Alaminos y Antonio Campos de la Universidad de Granada ha venido diseñando diferentes tejidos artificiales basados en hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados (NFAH). Entre estos tejidos artificiales encontramos sustitutos de córnea (Miguel Alaminos et al., 2006; Garzón et al., 2014; M. González-Andrades et al., 2009), piel (Vctor Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013), mucosa oral (M. Alaminos et al., 2007; Fernández-Valadés-Gámez et al., 2016; Garzón et al., 2013; Garzon et al., 2009; Martin et al., 2013; Rodriguez I. et al., 2012; Sanchez-Quevedo et al., 2007), nervios periféricos (V́ctor Carriel et al., 2013, 2015; V́ctor Carriel, Garzón, Alaminos, & Cornelissen, 2014), cartílago (García-Martínez et al., 2017; Nieto-Aguilar, Serrato, Garzón, Campos, & Alaminos, 2011), tejido óseo (Liceras-Liceras et al., 2017; Nieto-Aguilar et al., 2011) y vejiga (Jaimes-Parra et al., 2016). Los estudios preclínicos en animales han demostrado la biocompatibilidad y biodegradabilidad de estos hidrogeles que constituyen por tanto un sustituto tisular de gran aplicabilidad clínica (Miguel González-Andrades et al., 2017). En el ámbito clínico, se está utilizando los NFAH para el tratamiento de pacientes afectados de úlceras corneales refractarias (Miguel González-Andrades et al., 2017) y como cobertura para grandes quemados vía uso compasivo. Los resultados preliminares de los datos clínicos sugieren que el biomaterial de fibrina y agarosa y las técnicas de biofabricación utilizadas para la generación de estos hidrogeles mediante ingeniería tisular son seguras y altamente compatibles.

Los NFAH utilizados en estos estudios se fabrican a base de agarosa y plasma humano, el cual representa un porcentaje aproximado del 85% de la mezcla final. El fibrinógeno contenido en dicho plasma se gelifica artificialmente mediante la adicción de  $Ca^{2+}$  y ácido tranexámico (inhibidor de la fibrinólisis) para generar una malla de fibrina-agarosa que posteriormente se nanoestructura. Por tanto, el componente mayoritario de estos hidrogeles es la fibrina, un polímero cuya función principal es bloquear la pérdida masiva de sangre y participar en la reparación de tejidos dañados tras la ruptura vascular. Nuestra hipótesis de trabajo es que los NFAH podrían tener un efecto hemostático (no sólo por su posible efecto bioactivo debido a su composición sino también por un efecto

biomecánico protector de la herida) y poder ser así utilizarlos como agentes hemostáticos en resecciones hepáticas.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo principal

Evaluar la eficacia y la seguridad del uso de un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado (NFAH) como parche hemostático en cirugía hepática.

## 2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la eficacia hemostática de un apósito NFAH en un modelo moderado de hepatectomía con respecto a un agente hemostático comercial, Hemopatch.
- Evaluar la eficacia hemostática de un apósito NFAH en un modelo severo de hepatectomía con respecto a dos agentes hemostáticos comerciales, Hemopatch y Tachosil.
- Comparar la eficacia hemostática de apósitos NFAH acelularizados (a-NFAH) y celularizados (c-NFAH) para determinar si la matriz extracelular generada por los fibroblastos mejora la eficacia hemostática de la malla de fibrina.
- Evaluar la respuesta tisular e inflamatoria presentada por los animales tratados con apósitos NFAH respecto a los agentes hemostáticos comerciales.
- Evaluar la criopreservación de los NFAH mediante el uso de distintas soluciones crioprotectoras.
- Evaluar la eficacia hemostática de NFAH criopreservados (Fr-aNFAH) con respecto a NFAH “en fresco”.
- Evaluar la seguridad a largo plazo del tratamiento con NFAH con respecto al agente hemostático Tachosil.

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 3.1 Materiales

### 3.1.1 Población de estudio

El estudio se ha llevado a cabo en 102 ratas albinas macho de la variedad Wistar, pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus*, que tenían un peso aproximado de 250gr.

### 3.1.2 Instalaciones

Este trabajo de investigación ha sido realizado en las instalaciones de la Unidad de Producción y Reprogramación Celular (UPRC) de Sevilla, en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada y en el Servicio de Anatomía Patológica del HUVR.

Las intervenciones de los animales, así como su posterior estabulación y seguimiento hasta el sacrificio, se llevaron a cabo en el animalario del IBIS. Este centro está dotado del personal profesional necesario (veterinaria, enfermeros, auxiliares y celadores) para llevar a cabo nuestras actividades y asegurar la atención de los animales.

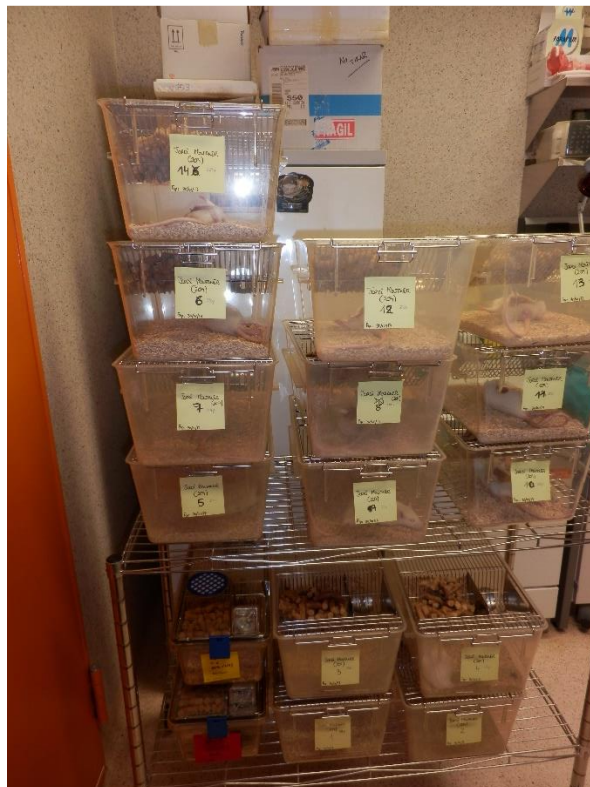


Figura I1: Animalario

### 3.1.3 Material fungible de laboratorio

#### 3.1.3.1 Material para fabricación de NFAH

- Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich)
- Gentamicina (Normon Laboratories)
- Vancomicina (Normon Laboratories)
- Tampón fosfato salino (PBS) (Sigma)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich)
- Colagenasa (SERVA Electrophoresis GmbH)
- Suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich)
- Aminoácidos no esenciales (NEAA) (Sigma-Aldrich)
- Glutamax (Gibco, Fisher Scientific)
- Cryostor CS10 (StemCell Technologies)
- Trypan blue (Sigma-Aldrich)
- Cubreobjetos circulares (VWR)
- Placas de cultivo de 24 pocillos (Nalgene Nunc International)
- Cámara Neubauer
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich)
- ProLong™ Gold Antifade Mountant con DAPI (Thermo Fisher Scientific)
- Anticuerpos primarios y secundarios (Tabla M1)
- Anticuerpos conjugados (Tabla M2)
- Yoduro de propidio (Miltenyi Biotec)
- Plasma humano AB (Tebu-bio)
- Ácido tranexámico 500 mg (Rottapharm)
- Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) 10% (B.Braun)
- Agarosa tipo VII (Sigma-Aldrich)
- Trehalosa (Sigma)
- Bolsas para sangre de EVA (Macopharma)
- Papel de filtro extra grueso (88620; Thermo Fisher Scientific)
- Filtros de nailon de 10 µm (NY-1009000; Merck Millipore)
- Flasks de cultivo celular (Nalgene Nunc International)
- Placas de 24 pocillos (Nalgene Nunc International)
- Tubos falcons (Corning)
- Pipetas serológicas (Corning)
- Transwells de policarbonato de 12 y 24 mm de diámetro (Corning)

#### 3.1.3.2 Material para Análisis de muestras

- Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Molecular Probes, Invitrogen).
- Colchicina
- Tripsina (Gibco)
- Cloruro potásico (KCl)
- Metanol
- Ácido acético

- Tripsina-Giemsa (GTG).
- Tubos con anticoagulante EDTA (BD Bioscience, NJ, USA)
- Glutaraldeido (Sigma)
- Tampón cacodilato
- Bálsamo DPX
- Etanol (Sigma)
- Formaldehido (Sigma)
- Paraformaldehido
- Xilol (Sigma)
- Kits para ELISA :
  - Rat C-reactive protein (CRP) (Catalog N° ELR-CRP, RayBiotech Inc.)
  - Rat Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Catalog N° E-EL-R0012, Elabscience)
  - Rat tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (Catalog N° CSB-E11987R, Cusabio Technology LLC)
- Hematoxilina (Sigma-Aldrich)
- Eosina (Sigma-Aldrich)
- Kit Tricrómico de Mason (Sigma-Aldrich)
- Eppendorf (Thermo-Fisher)
- Puntas de micropipetas (Thermo-Fisher)

### 3.1.4 Material quirúrgico

- Caja de instrumental simple (Figura I2):
  - Porta agujas
  - Tijeras de Mayo
  - Bisturí con hoja desechable número 15
  - Pinzas de disección con dientes y sin dientes.
  - Pinzas de hemostasia tipo mosquito sin dientes.
  - Compresas y gasas hidrófilas estériles.
- Suturas:
  - Fascia muscular: Polidioxanona 3/0
  - Piel: Seda trenzada de 3/0



**Figura I2. Material quirúrgico**

### 3.1.5 Material específico

- Microscópio óptico Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments)
- Microscopio invertido de fluorescencia Nikon Ti-S (Nikon Instruments).
- Microscopio Leica DM5500 (Leica)
- Microscopio FEI Quanta 200



- Microtomo
- Citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec)
- Software de análisis Ikaros Karyotyping System (Metasystems).
- Software de análisis FlowJo v10 (FlowJo LLC)
- Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)
- Software ImageJ (C. A. Schneider, Rasband, Eliceiri, & Instrumentation, 2017)
- Termómetro de infrarrojos
- Micropipetas (Gilson)
- Incubadores
- Centrífugas Haraeus Megafure (Thermo Scientific)

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Diseño y grupos de estudio

Se ha realizado un estudio comparativo de agentes hemostáticos en dos modelos de resección hepática en rata, uno moderado y otro severo. Las 102 ratas utilizadas fueron distribuidas en 5 grupos de estudio:

- Grupo c-NFAH: se incluyeron 20 ratas que fueron tratadas con un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado con células tras una resección hepática moderada (10 ratas) o severa (10 ratas).
- Grupo a-NFAH: se incluyeron 17 ratas que fueron tratadas con un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado sin células tras una resección hepática severa.
- Grupo Fr-aNFAH: se incluyeron 20 ratas que fueron tratadas con un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado sin células criopreservado tras una resección hepática severa.
- Grupo Hemopatch: se incluyeron 25 ratas que fueron tratadas con un hemostático comercial de NHS-PEG tras una resección hepática moderada (10 ratas) o severa (15 ratas).
- Grupo Tachosil: se incluyeron 20 ratas que fueron tratadas con un hemostático comercial de fibrinógeno, trombina y colágeno tras una resección hepática severa.

### 3.2.2 Consideraciones legales y éticas

Este proyecto de investigación recibió informe favorable tras su valoración del Comité de Ética de la Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío (Referencia Interna: 1131-N-15).

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la “Normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia” publicadas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (R.D. 53/2013, Ley 32/2007) y las Directivas del Parlamento Europeo 2010/63/UE.

### 3.2.3 Fabricación de Hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados

#### 3.2.3.1 Cultivo celular

Los fibroblastos se obtuvieron a partir de una biopsia de piel de ratas Wistar. El tejido se lavó en PBS con penicilina-estreptomicina, 20 µg/ml gentamicina y 50 µg/ml vancomicina. El tejido se fragmentó en trozos de aproximadamente 1×1 mm<sup>2</sup>.

Se prepararon varios tubos de 50ml con 5ml de una solución atemperada a 37°C de colagenasa 0.5 U/ml preparada en DMEM y se añadieron veinte fragmentos de tejido a cada uno. Las muestras se incubaron durante aproximadamente 16 horas a 37°C en agitación. La digestión fue posteriormente neutralizada añadiendo DMEM suplementado con FBS al 10%, NEAA al 0.1 mM, Glutamax al 2 mM y penicilina-estreptomicina dilución 1:100.

Por último, la suspensión celular se centrifugó a 430g y 4°C durante 10 minutos, se contaron las células y se sembraron en flask de 25 cm<sup>2</sup> en incubadores humidificados al 5% CO<sub>2</sub> y 37°C con el medio suplementado indicado anteriormente. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia aproximada del 90%, se les dio un pase a las células para expandirlas nuevamente, sembrándolas a una densidad celular de aproximadamente 10.000 céls/cm<sup>2</sup>. Por último, las células se criopreservaron en pase 2 con Cryostor CS10 en nitrógeno líquido hasta la generación del hidrogel. Todos los procedimientos que se realizaron referentes al cultivo celular se hicieron siguiendo un sistema documental

acorde a las normas de correcta fabricación (GMP, del inglés “Good Manufacturing Practices”) de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

### 3.2.3.2 Contaje celular

Tras el levantamiento de los cultivos o la descongelación, las células se tiñeron con Trypan blue a una dilución 1:2 y se realizó un contaje manual usando una cámara Neubauer. Para ello se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse TS100 con un objetivo 10X.

### 3.2.3.3 Inmunofluorescencia

Los fibroblastos se sembraron sobre cubreobjetos circulares en placas de 24 pocillos que se guardaron en incubadores humidificados con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Una vez los cultivos alcanzaron confluencia, los cubreobjetos cubiertos de células se lavaron en PBS y se fijaron con formaldehído al 3.7% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron entonces lavados tres veces con PBS y las células permeabilizadas con Triton X-100 al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

ANTICUERPOS Y CONTROL ISOTÍPICO ASOCIADO					
ANTICUERPOS PRIMARIOS			ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
Anticuerpo	Referencia/ Proveedor	Dilución a usar	Anticuerpo	Referencia/ Proveedor	Dilución a usar
<b>Vimentina</b> (Mouse IgG1 Clon VI-10).	Ab20346 Abcam	<b>Dil.: 1:1000</b>	<b>Alexa Fluor 594</b> Anti-Mouse	A11005 Thermo Fisher Scientific	<b>Dil.: 1:200</b>
<b>Colágeno tipo I</b> (Rabbit IgG Polyclonal).	Ab34710 Abcam	<b>Dil.: 1:500</b>	<b>Alexa Fluor 488</b> Anti-Rabbit	A21206 Thermo Fisher Scientific	<b>Dil.: 1:200</b>
<b>Colágeno tipo III</b> (Rabbit IgG Polyclonal).	Ab7778 Abcam	<b>Dil.: 1:1000</b>	<b>Alexa Fluor 555</b> Anti-Rabbit	A31572 Thermo Fisher Scientific	<b>Dil.: 1:200</b>

*Tabla M1. Anticuerpos usados para caracterización de fibroblastos de rata por Inmunofluorescencia.*

Más tarde las muestras se bloquearon con BSA al 1% diluido en PBS durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se incubaron seguidamente con los anticuerpos primarios (ver Tabla M1) diluidos en PBS con BSA al 0.1% durante 30 minutos a 37°C.

Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario (ver tabla M.1) durante 30 minutos a 37°C.

Tras la incubación, las muestras se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos con ProLong™ Gold Antifade Mountant con DAPI para teñir los núcleos de las células. Las muestras se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Ti-S.

#### 3.2.3.4 Citometría de flujo

Las células se resuspendieron en PBS y se incubaron con las concentraciones de anticuerpos que aparecen la Tabla M2. Para ello, se prepararon tantos tubos eppendorfs como anticuerpos a utilizar y se les añadió a cada tubo 50µL de suspensión celular que contenía un número total de células entre 100.000 y 150.000.

Todas las muestras fueron incubadas en hielo durante 10 minutos con sus respectivos anticuerpos, a excepción de la IgG2a-FITC de BD Bioscience que se incubó en hielo durante 15 minutos tal y como indica el fabricante. Los controles isotípicos se adquirieron en paralelo con las muestras para dar idea de la inespecificidad del anticuerpo y para establecer la población negativa. Tras la incubación se realizaron dos lavados con PBS. Justo antes de la adquisición, se utilizó yoduro de propidio en dilución 1:100 para determinar la viabilidad. Las muestras fueron adquiridas con el citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 y los resultados fueron analizados con el programa FlowJo v10. La población analizada fue aquella seleccionada tras la discriminación de dobletes y de células muertas. Se analizaron en todos los casos un número de eventos superior a 10.000.

ANTICUERPOS Y CONTROL ISOTÍPICO ASOCIADO					
MARCADORES			CONTROLES ISOTÍPICOS		
Anticuerpo	Referencia /Proveedor	Concentración y dilución a usar	Control isotípico asociado (CI)	Referencia/ Proveedor	Concentración y dilución a usar
<b>CD44H-FITC</b> (Mouse IgG2a Anti-rat. Clon OX-49).	203906 Biolegend	Conc.: 0,5mg/ml <b>Dil.: 1:50</b>	<b>IgG2a-FITC</b> (Mouse IgG2a. Clon G155-178).	554647 BD Bioscience	Conc.: 0,5mg/ml <b>Dil.: 1:50</b>
<b>CD29-FITC</b> (Armenian Hamster IgG Anti-mouse/rat. Clon HMβ1-1).	102205 Biolegend	Conc.: 0,5mg/ml <b>Dil.: 1:50</b>	<b>IgG1-FITC</b> (Armenian Hamster IgG. Clon HTK888).	400905 Biolegend	Conc.: 0,5mg/ml <b>Dil.: 1:50</b>
<b>CD90-FITC</b> (Mouse IgG1 k anti-rat. Clon 2E11).	206105 Biolegend	Conc.: 0,5mg/ml <b>Dil.: 1:50</b>	<b>IgG1-FITC</b> (Mouse IgG1. Clon MOPC-21)	400109 Biolegend	Conc.: 0,2mg/ml <b>Dil.: 1:20</b>

*Tabla M2. Anticuerpos usados para caracterización de fibroblastos de rata por Citometría de flujo.*

### 3.2.3.5 Análisis citogenético

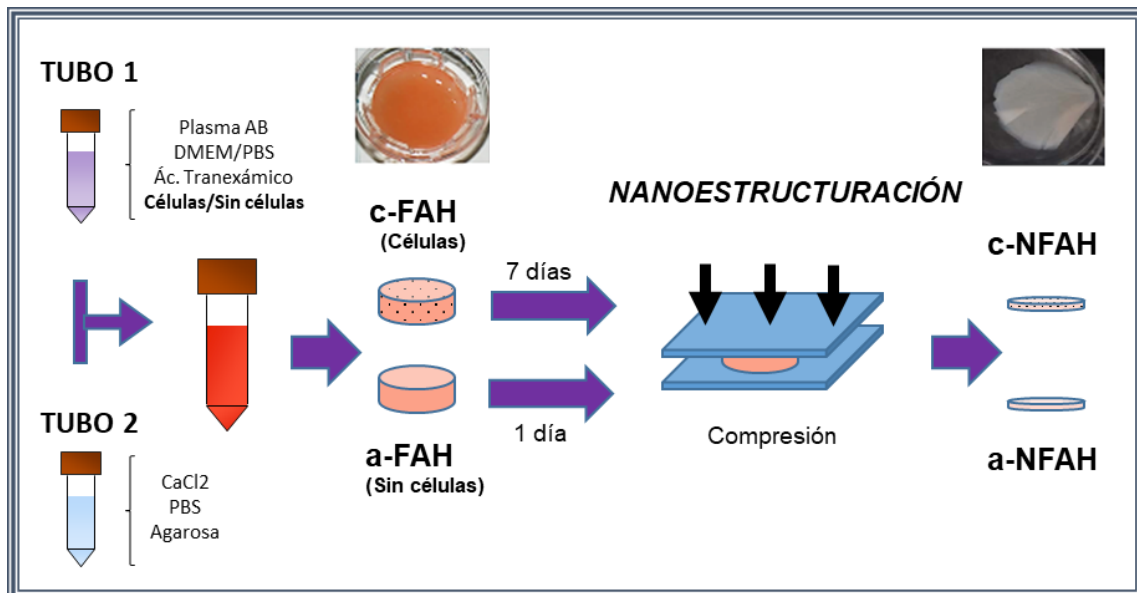
Los fibroblastos se cultivaron en un flask de 25cm<sup>2</sup> y se enviaron al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía para realizar un análisis de cariotipo con bandeado G. Para llevar a cabo el análisis, primero se incubaron las células en medio suplementado con 0,1 mg/ml de colchicina durante 4 horas. Posteriormente se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron. Las células se resuspendieron en una solución hipotónica de KCl (0.075 mol / L), se lavaron para eliminar los citoplasmas y los núcleos se fijaron con metanol/ácido acético en una proporción de 3:1 (vol/vol). Finalmente, las

metafases se fijaron sobre portaobjetos y se tiñeron las bandas con Tripsina-Giemsa (GTG). Se analizaron un mínimo de 20 metafases para cada línea celular asignando una fórmula cromosómica de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (McGowan-Jordan, Simons, & Schmid, 2016). Los cariotipos se analizaron utilizando un microscopio Leica DM5500 y el software de análisis Ikaros Karyotyping System (Metasystems).

### 3.2.3.6 Fabricación del hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado (NFAH)

El protocolo de fabricación del NFAH es una adaptación del método descrito anteriormente por el grupo de Miguel Alaminos y Antonio Campos de la Universidad de Granada (Miguel Alaminos et al., 2006; Víctor Carriel et al., 2012; Víctor Carriel et al., 2013; Víctor Carriel, Garzón, Campos, Cornelissen, & Alaminos, 2014; Garzón, Martín-Piedra, Alfonso-Rodríguez, González-Andrades, et al., 2014; Scionti et al., 2014). El esquema del proceso de fabricación puede verse en la Figura M3.

Inicialmente se fabricaron apósitos de fibrina y agarosa celularizados (c-NFAH) de 12mm de diámetro para utilizar en el modelo moderado de hepatectomía. Posteriormente,



**Figura M3. Esquema de fabricación de apósitos de fibrina y agarosa nanoestructurados.** El esquema muestra el proceso general de fabricación de hidrogeles de fibrina y agarosa celularizados (c-FAH) y sin celularizar (a-FAH), la compresión y deshidratación posterior (Nanoestructuración) y la obtención de los apósitos finales celularizados (c-NFAH) y sin celularizar (a-NFAH).

para el modelo severo de hepatectomía se fabricaron apósitos celularizados y sin celularizar (a-NFAH) de 24mm de diámetro.

Para la fabricación de 6 apósitos celularizados de 24mm de diámetro se prepararon dos tubos con las cantidades de reactivos que se indican en la Tabla M3.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: plasma humano AB, ácido tranexámico, CaCl<sub>2</sub> 10%, PBS y agarosa tipo VII. Se fabricaron c-NFAH descongelando los fibroblastos de rata generados anteriormente (ver apartado “Cultivo celular”) y embebiéndolos directamente en el hidrogel a razón de 150.000 fibroblastos/ml para que la dosis en el c-NFAH fuese de 100.000 cels/ml (dosis usada en clínica).

	<b>REACTIVO</b>	<b>Volumen para 6 apósitos c-NFAH en transwell de 24mm</b>
<b>TUBO 1</b>	<b>1.- Plasma Humano AB*</b>	<b>25 ml</b>
	<b>2.- DMEM suplementado</b> <b>+</b> <b>3.- Volumen de suspensión celular</b> <b>(Volumen total y nº de fibroblastos por apósito, teniendo en cuenta una densidad de 150.000 células/mL)</b>	<b>2 ml (Volumen de mezcla)</b> <b>(4.500.000 fibroblastos)</b>
	<b>4.- Ácido Tranexámico</b>	<b>0.5 ml</b>
	<b>5.-CaCl<sub>2</sub> 10%</b>	<b>0.6 ml</b>
<b>TUBO 2</b>	<b>6.- PBS</b>	<b>0.4 ml</b>
	<b>7.- Agarosa tipo VII 2,2%</b>	<b>1.5 ml</b>
<b>Volumen final</b>		<b>30 ml</b>

**Tabla M3.** Volúmenes de reactivos necesarios para la fabricación de c-NFAH.

\* En el estudio comparativo de viabilidad celular, los apósitos fueron fabricados tanto con plasma humano como de rata (Zen-Bio Inc.).

Para la fabricación de 6 apósitos sin celularizar de 24mm de diámetro se prepararon dos tubos con reactivos tal y como se indica en la Tabla M4.

Se añadieron a los tubos todos los reactivos, a excepción de la agarosa, se mezcló bien el contenido, y se conservaron en el incubador a 37°C hasta su uso. La solución de agarosa se calentó al microondas, se introdujo en cabina y se agitó suavemente hasta alcanzar aproximadamente 39-41°C (temperaturas por encima de las indicadas podrían afectar a los factores de coagulación tras la mezcla de reactivos y evitar que las láminas coagulasen correctamente). Una vez alcanzada la temperatura indicada, se tomó el volumen de agarosa descrito en las tablas y se añadió rápidamente al TUBO 2. Tras pipetear la mezcla rápidamente 1 o 2 veces hasta homogeneizarla, se añadió el contenido del TUBO 1 por volcado al TUBO 2 y se mezcló rápida y suavemente, volteando el tubo de 2 a 3 veces. Tras la mezcla, el volumen se repartió en transwells de policarbonato añadiendo 5mL de mezcla por transwell de 24mm de diámetro y 1mL de mezcla por transwell de 12mm de diámetro.

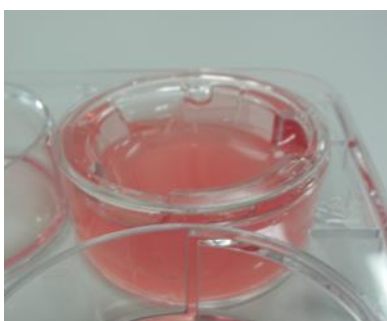
	<b>REACTIVO</b>	<b>Volumen para 6 apósitos <math>\alpha</math>-NFAH en transwell de 24mm</b>
<b>TUBO 1</b>	<b>1.- Plasma Humano AB</b>	<b>25 ml</b>
	<b>2.- DMEM suplementado/PBS*</b>	<b>2 ml</b>
	<b>4.- Ácido Tranexámico</b>	<b>0.5 ml</b>
<b>TUBO 2</b>	<b>5.-CaCl<sub>2</sub> 10%</b>	<b>0.6 ml</b>
	<b>6.- PBS</b>	<b>0.4 ml</b>
	<b>7.- Agarosa tipo VII 2,2%</b>	<b>1.5 ml</b>
<b>Volumen final</b>		<b>30 ml</b>

**Tabla M4.** Volúmenes de reactivos necesarios para la fabricación de  $\alpha$ -NFAH.

\*En la fabricación de los apósitos  $\alpha$ -NFAH destinados a la criopreservación, el DMEM suplementado fue sustituido en todos los casos por PBS.



Las placas se trasladaron entonces al incubador donde permanecieron 2 horas aproximadamente para su gelificación. Una vez que los constructos gelifican formando el hidrogel de fibrina y agarosa (FAH), éstos muestran un tono más blanquecino (Figura M4). Es entonces cuando los hidrogeles fueron introducidos nuevamente en cabina para añadirles DMEM suplementado hasta cubrirlos completamente; en el caso de los hidrogeles destinados a la criopreservación se cubrieron con PBS. Seguidamente fueron trasladados al incubador donde permanecieron durante 7 días en el caso de los hidrogeles de fibrina y agarosa celularizados (c-FAH) para permitir el crecimiento celular y 1 día en el caso de los hidrogeles sin celularizar (a-FAH).



**Figura M4. Fotografía de un hidrogel de fibrina y agarose (FAH).** Tras las incubación se produce la gelificación de la mezcla y el FAH muestra un tono blanquecino.

La nanoestructuración es un proceso de compresión y deshidratación. Esta técnica conserva la estructura de la fibrina mientras elimina la mayor parte del contenido de agua. Como consecuencia, las propiedades reológicas de los FAH cambian aumentando la elasticidad y la resistencia (Ionescu et al., 2011). Para este propósito, se colocó el FAH entre dos papeles de filtro extra grueso. Entre el hidrogel y el papel secante se colocaron dos filtros de nailon de 10  $\mu\text{m}$  para evitar la adherencia. Rápidamente, una superficie plana de vidrio de 0.25 Kg se posicionó para la compresión en la parte superior el papel de filtro absorbente durante 30 segundos y 1 minuto 40 segundos para los hidrogeles de 12mm y 24 mm de diámetro respectivamente. El hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado (NFAH) final alcanza así una alta densidad con aproximadamente 80% de deshidratación y un espesor cercano a 50-60  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3.7 Viabilidad de lámina por tinción de Homodímero de Etidio y Calceína (LIVE/DEAD)

Para determinar la viabilidad celular en los FAH se utilizó el kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. Éste es un ensayo rápido de dos colores para determinar la viabilidad de las células en una población basándose en la integridad de la membrana plasmática y la actividad de la esterasa. El protocolo del fabricante fue adaptado para el análisis de FAH sin nanoestructurar y nanoestructurados (NFAH). De forma resumida, se cortaron en secciones de 2x2cm y se pasaron a una placa Petri donde las muestras fueron lavadas tres veces con PBS. Seguidamente se introdujeron en un pocillo de una placa T6 donde se incubaron con 2mL de solución T compuesta de 2 mL de PBS, 4 µL de EthD (2Mm), 1 µL de calceína anhidra (4Mm), y 2 µL de Hoechst 10mg/mL (dilución 1:1000) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las secciones se lavaron tres veces y se conservaron en PBS hasta su análisis. El número de células vivas (verde) y muertas (rojo) se observaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-S. Las células se contaron con Adobe Photoshop CS5 en un mínimo de cuatro campos para cada sección de hidrogel.

### 3.2.3.8 Criopreservación de láminas de fibrina agarosa

En un estudio preliminar, se criopreservaron apósitos a-NFAH bajo dos concentraciones de trehalosa diferentes, 0.13M y 0.4M. Para ello, se fabricaron tres lotes de láminas a-NFAH cada uno con un plasma de diferente donante que, tras la nanoestructuración, fueron envasadas en bolsas para sangre de EVA (Macopharma) con las soluciones de trehalosa indicadas. Las láminas embebidas en trehalosa 0.13M fueron directamente almacenadas en nitrógeno líquido, mientras que las láminas en trehalosa 0.4M se pre-incubaron durante 120 min a temperatura ambiente antes de almacenarse en nitrógeno líquido (-196°C) tal y como se había publicado anteriormente (Serrato et al., 2009). Las láminas permanecieron en nitrógeno líquido durante 7 días hasta que se descongelaron para ser analizadas por microscopía óptica y electrónica. Como control comparativo se utilizaron apósitos a-NFAH conservados a 4°C en una solución salina de Ringer lactato durante el mismo periodo de tiempo.

Tras confirmar que la mejor solución de criopreservación estudiada para las láminas de fibrina y agarosa era trehalosa 0.4M, se realizó un estudio posterior donde se analizaron

tres lotes diferentes de a-NFAH antes (t=0) y después de tres meses de congelación (t=3 meses) a -20°C, en lugar de -196°C, en la solución de trehalosa 0.4M. La única diferencia de composición entre lotes de a-NFAH era el donante de plasma utilizado. Se realizó un análisis histológico, tanto por microscopía óptica como por electrónica, a las láminas antes (t=0) y después de la congelación (t=3 meses).

### 3.2.4 Protocolo animal y resección hepática

#### 3.2.4.1 Periodo preoperatorio

Previo a la intervención, los animales fueron aclimatados y observados para la detección de signos de enfermedad. En todo momento los animales tuvieron acceso al agua y a la comida (alimento estándar en pellets) *ad libitum*, no se realizó preparación intestinal ni profilaxis antibiótica.

Los animales fueron colocados en posición decúbito supino, con las cuatro extremidades fijadas y se les rasuró la parte abdominal para practicarles una laparotomía.

#### 3.2.4.2 Periodo operatorio

##### 3.2.4.2.1 Procedimiento anestésico

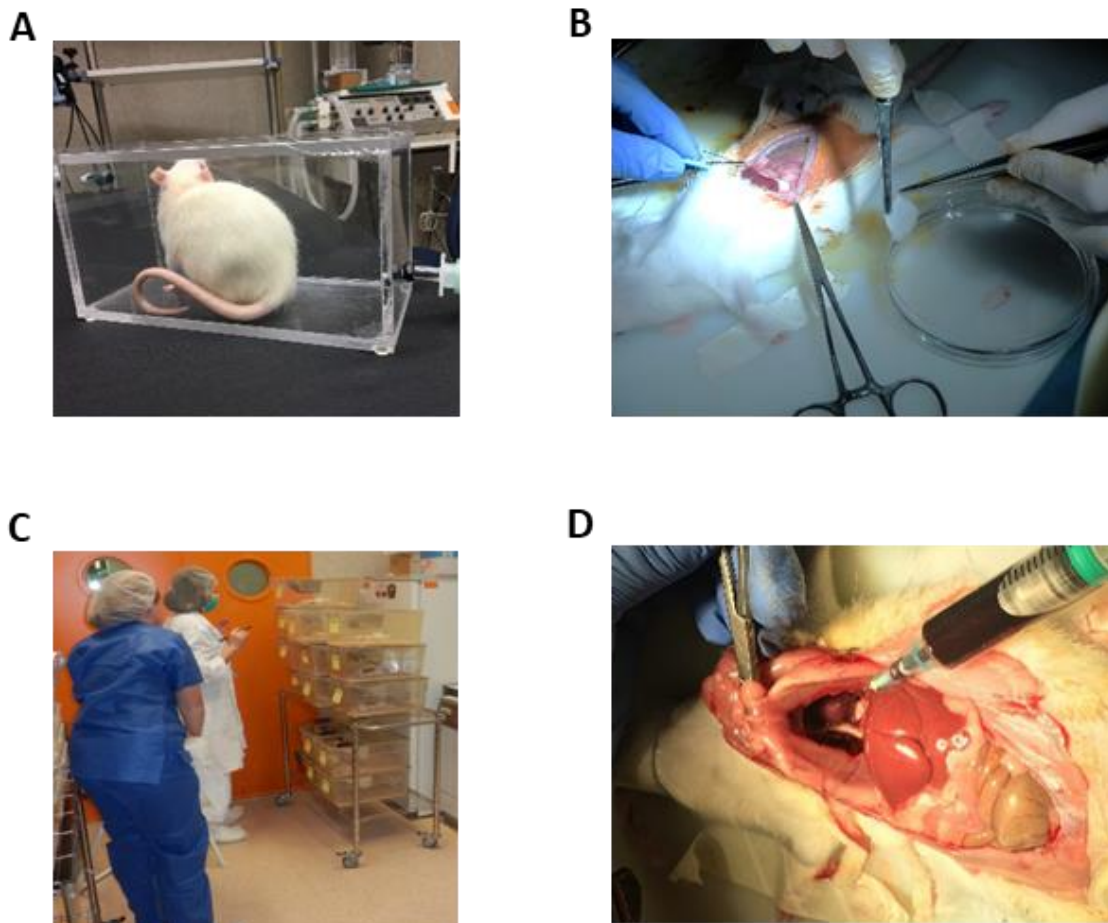
La anestesia se indujo mediante punción intraperitoneal aplicando 80 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina. Para ello, los animales fueron previamente pesados para el cálculo de la dosis. Los animales se mantuvieron anestesiados durante la cirugía, aplicando, si se consideraba necesario, un sistema de inhalación de isoflurano (Figura M5.A). En todo momento se realizó un control de la profundidad anestésica, y ante una respuesta de estimulación podal se administró una nueva dosis igual a la mitad de la suministrada inicialmente.

##### 3.2.4.2.2 Procedimiento quirúrgico

Se aplicó povidona yodada y se rasuró la parte abdominal de las ratas para practicarles una laparotomía media supraumbilical de aproximadamente de 5 cm por debajo del xifoides en dirección craneocaudal. De esta forma se dejó expuesto el parénquima hepático para proceder a la cirugía.

Se establecieron dos modelos de resección hepática:

1. Modelo de resección hepática moderado, en el cual a los animales se les practicó una incisión corta de 0,5 cm de longitud del parénquima hepático.
2. Modelo de resección hepática severo, en el cual se practicó una incisión larga de 1,5 cm al parénquima hepático de los animales.



**Figura M5. Protocolo animal. (A)** Procedimiento de anestesia con isofluorano. **(B)** Aplicación del agente hemostático NFAH. **(C)** Estabulación de los animales. **(D)** Toma de muestra de sangre para análisis de factores inflamatorios.

Estos modelos de resección fueron practicados a los animales en los siguientes estudios comparativos:

- I. Modelo de resección hepática moderado incluyó un estudio comparativo:
  - c-NFAH (n = 10) vs Hemopatch (n = 10).
- II. Modelo de resección hepática severo incluyó los siguientes estudios comparativos:

- c-NFAH (n = 10) vs a-NFAH (n = 10) vs Hemopatch (n = 15) vs Tachosil (n =10);
- a-NFAH (7 ratas) vs Fr-aNFAH (10 ratas); y
- Fr-aNFAH (10 ratas) y Tachosil (10 ratas).

Las incisiones se realizaron sobre el lóbulo medio localizado bajo el diafragma. Inmediatamente tras la resección hepática se aplicó el agente hemostático correspondiente al grupo en estudio y se determinó el tiempo en alcanzar la hemostasia. Todos los agentes hemostáticos aplicados tenían forma circular con un diámetro de 12 mm y 24 mm para las incisiones cortas y largas respectivamente (Figura M5.B).

Calculado el tiempo de hemostasia, los animales permanecieron bajo control durante 5 minutos para confirmar que no hubiese alguna hemorragia inmediatamente antes de proceder a la sutura de la fascia muscular y de la piel. El tiempo medio del acto quirúrgico fue aproximadamente de 10-15 minutos por animal.

#### 3.2.4.3 Procedimiento postquirúrgico

Tras la recuperación, las ratas fueron estabuladas en jaulas ventiladas individuales con acceso libre a comida y agua (Figura M5.C). El personal técnico del animalario se encargó de los cuidados necesarios durante la estabulación. Como analgésico tras la cirugía se les suministró ketoprofeno.

Dependiendo del estudio realizado, las ratas fueron sacrificadas aproximadamente 24 horas, 7 días o 1 mes después de la cirugía para evaluar posibles hemorragias postoperatorias, presencia de hematomas, migración del agente hemostático y evaluación de las adherencias intra-abdominales del agente hemostático a tejidos intactos adyacentes a la herida. Además se tomaron datos sobre la evolución de la temperatura y el peso de los animales.

Para la eutanasia del animal se usó ketamina de forma intraperitoneal, a razón de 0'2 ml por gramo de peso. Una vez se alcanzaba una anestesia profunda, con una depresión respiratoria parcial sin dolor ni sufrimiento, se procedía a realizar una punción cardíaca para desangrar el animal.

Las muestras de sangre (Figura M5.D) se conservaron con anticoagulante EDTA para medir los niveles de los factores de inflamación (CRP, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) mediante ELISA y se

seccionaron fragmentos de tejido hepático adyacentes al agente hemostático que se fijaron con paraformaldehído al 4% para análisis histopatológico.

### 3.2.5 Análisis de muestras

#### 3.2.5.1 ELISA

Las muestras de sangre tomadas en tubos con anticoagulante EDTA se centrifugaron a 1.480 g durante 5 minutos para la obtención del plasma y se congelaron a -20°C ó -80°C en pequeños volúmenes para evitar repetidos ciclos de congelación y descongelación. Para el análisis de los factores inflamatorios se utilizaron los siguientes kit ELISA: rat C-reactive protein (CRP), rat Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y rat tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Para el procesamiento de las muestras se siguieron las instrucciones indicadas por los fabricantes.

#### 3.2.5.2 Análisis histopatológico de tejido hepático

Las muestras de tejido hepático fueron inicialmente fijadas con PFA 4% en PBS para la posterior inclusión en bloques de parafina. Una vez obtenidos los bloques, se realizaron cortes de 4  $\mu$ m de grosor al microtomo. Para desparafinar, los portas fueron introducidos a 60°C durante 1 hora y tratados con xilol entre 15 y 20 minutos. Tras aclarar con xilol limpio, las secciones se hidrataron con una serie decreciente de alcoholes de 100%, 96%, 90%, 80% y 70% para las muestras destinadas a la tinción tricrómica de Masson y de 100%, 96%, 70% y 50% para las muestras destinadas a la tinción con hematoxilina-eosina. Para las coloraciones se procedió de forma diferente según la tinción:

1. Tinción con hematoxilina-eosina para el análisis de la estructura tisular y presencia de células inflamatorias. Los cortes se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos. Tras lavar con agua se introdujeron en carbono activo 1-1,5 minutos y se enjuagaron nuevamente con agua. Se añadió la eosina durante 1 minuto y se lavaron las muestras para eliminar el exceso de colorante. Se deshidrataron con una serie creciente de alcoholes (70%, 80%, 96% y 100%) durante 30 segundos por concentración. Tras dos aclarados de xilol de 30 segundos, las muestras se montaron con DPX y se visualizaron con el microscopio óptico.

2. Tinción tricrómica de Masson para el análisis de presencia de fibras de colágeno. A los cortes se les aplicó líquido de Bouin a 56°C durante 15 minutos. Tras un lavado con agua las muestras se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos. Después de aclarar con agua, se añadió la fucsina ácida durante 5 minutos, se enjuagó con agua y se colocaron las muestras en la solución fosfotúngstico/fosfomolibdico durante 5 minutos. De ahí se pasaron a la solución azul de anilina por 5 minutos y posteriormente en ácido acético al 1% durante 2 minutos. Finalmente, se enjuagaron los portos, se deshidrataron en alcoholes crecientes (70%, 80%, 90%, 96% y 100%) y, por último, en xilol.

El análisis microscópico de las muestras se realizó de forma ciega por el patólogo y se analizaron las muestras tres veces en días diferentes.

### 3.2.5.3 Análisis histológico de apósitos NFAH

Para los análisis histológicos por microscopía óptica, los apósitos se fijaron en formalina neutra al 10% y se incluyeron en parafina, tras lo cual se obtuvieron secciones histológicas de 4µm de espesor utilizando un microtomo. Los cortes histológicos se tiñeron posteriormente con hematoxilina-eosina. Para ello, se procedió a su secado en un horno a 60°C y se eliminó la parafina mediante tres lavados de 5 minutos en xilol. Posteriormente, se lavaron las muestras en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 80% y 70%) y se rehidrataron en agua destilada (3 minutos en cada uno). Para teñir los núcleos celulares y el material basófilo, se utilizó hematoxilina durante 5 minutos, lavándose en agua a continuación. Para teñir el material acidófilo, se utilizó eosina hidroalcohólica durante 5 minutos, lavándose brevemente. A continuación, se deshidrataron las muestras en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 96% y 100%), se impregnaron en xilol y se cubrieron con DPX y cubreobjetos. El tamaño de poro se calculó con el software ImageJ (C. A. Schneider et al., 2017).

Para el estudio mediante microscopía electrónica, las láminas se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato, lavándose a continuación con este tampón. Se sometieron al método del punto crítico deshidratándolas en concentraciones crecientes de acetona y desecándolas utilizando CO<sub>2</sub> líquido a alta

presión. Tras ello, se recubrieron de oro-paladio y se analizaron en un microscopio FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

### 3.2.6 Variables

- Tiempo de hemostasia. El tiempo de hemostasia se definió como el tiempo necesario para interrumpir la hemorragia tras la aplicación del agente hemostático. Se dio inicio al cronómetro en el momento de la aplicación del agente hemostático sobre la superficie hepática lesionada y se detuvo justo cuando se logró un cese completo de la extravasación de sangre a través de la superficie de resección.
- Presencia de hematomas: acumulación de sangre coagulada o parcialmente coagulada en el tejido hepático debido a la rotura de un vaso sanguíneo. Se determinó en el momento del sacrificio.
- Migración del agente hemostático, se definió como el desplazamiento del agente hemostático ocurrido entre el final de la intervención quirúrgica y el momento del sacrificio.
- Adherencias postoperatorias, son bandas de tejido similar al tejido cicatricial que se forman entre dos superficies dentro del animal y hacen que éstas se peguen. Se producen en respuesta a la intervención quirúrgica y/o a la presencia del agente hemostático aplicado. Las adherencias se han categorizado en:
  0. Ausencia de adherencias.
  1. Adherencias delgadas, separables mediante gravedad.
  2. Adherencias gruesas, no separables por gravedad.
- Factores inflamatorios en sangre. Se analizaron los niveles en sangre del reactante de fase aguda Proteína C reactiva (CRP), la interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en el momento del sacrificio.
- Temperatura corporal, tomada con una sonda rectal.
- Incremento del peso corporal.



- Parámetros histológicos. Las variables histopatológicas analizadas por microscopía óptica fueron hemorragia, inflamación y necrosis, y se clasificaron como se indica en la Tabla M5.

Categoría Variable	Ausente (0)	Leve (1)	Moderada (2)	Severa (3)
<b>Hemorragia</b>	Grupos de eritrocitos que se unen sin formar una zona libre de hemorragia	Área de hemorragia <1 mm de diámetro.	Área de hemorragia 1–2.5 mm de diámetro y menos de un cga (X40) † de profundidad	Area de hemorragia >2.5 mm de diámetro y más de un cga (X40) de profundidad
<b>Inflamación</b>	-	Pocos granulocitos	Algunos infiltrados, manguito perivascular	Infiltración masiva
<b>Necrosis</b>	-	0.1–0.4 cga	0.5–1.2 cga	>1.2 cga

**Tabla M5.** Criterios de categorización para las variables histopatológicas estudiadas por análisis microscópico. †cga: campos de gran aumento.

### 3.2.7 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 5.0. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se determinó mediante la prueba t Student o U de Mann-Whitney. En el caso de más de dos grupos experimentales, se utilizó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas a un valor  $p \leq 0.05$ .

Teniendo en cuenta datos preliminares, el tamaño poblacional de los grupos se calculó para una precisión  $d = 0.55$ , con una potencia del 80% y un nivel de significancia 0.05. Esto requiere un mínimo de 10 animales por grupo (<https://www.anzmtg.org/stats/PowerCalculator/PowerANOVA>).



# 4. RESULTADOS

## 4.1 Puesta a punto de la fabricación del c-NFAH

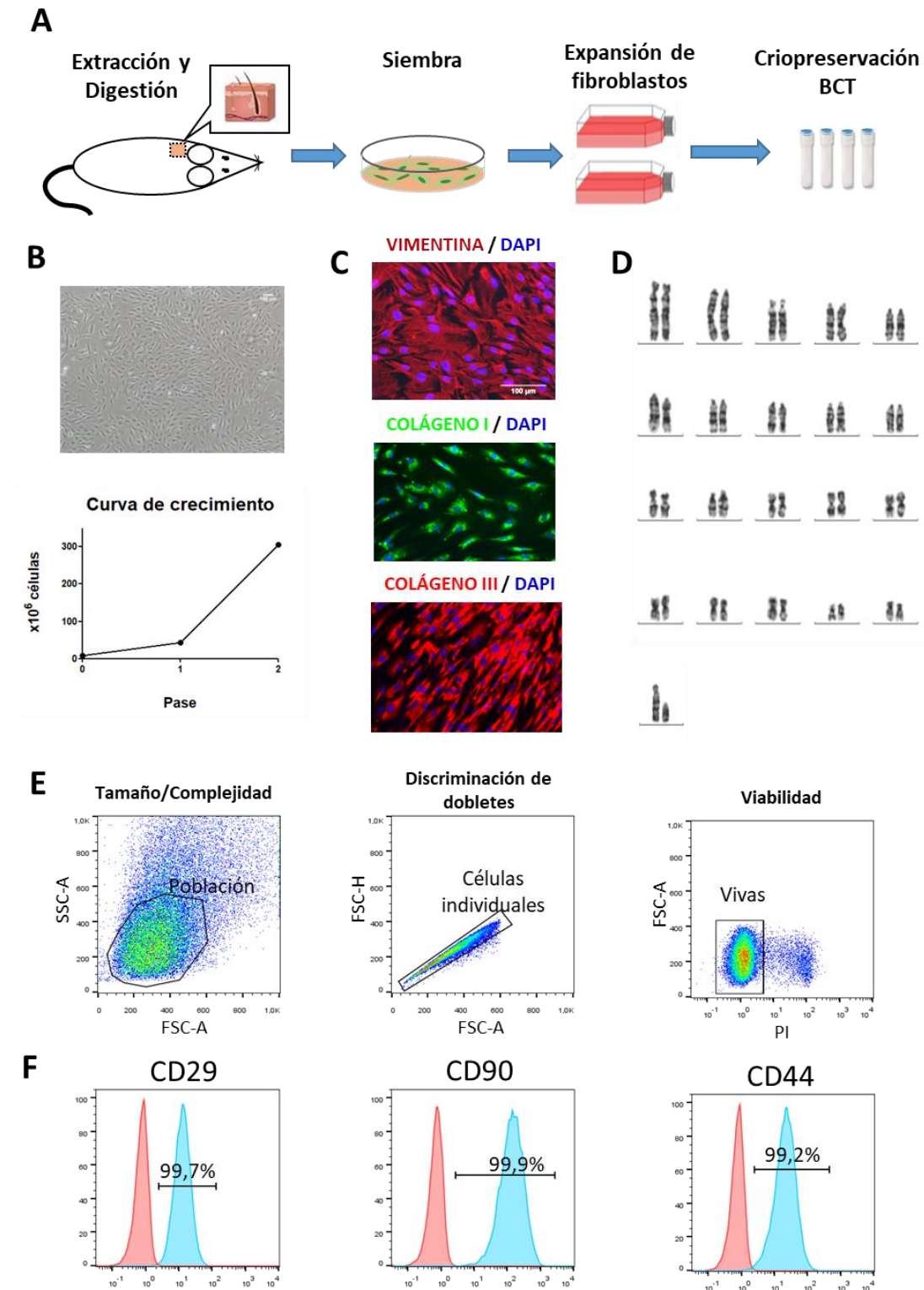
Para la fabricación de los hidrogeles de fibrina y agarosa celularizados (c-NFAH) se aislaron fibroblastos dérmicos a partir de una biopsia de piel de rata y se expandieron para fabricar un banco celular de trabajo (BCT) de igual forma que se hace en nuestras instalaciones para la fabricación de medicamentos a base de fibroblastos. Se fabricaron siguiendo los procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) que utilizamos en nuestra sala blanca y acorde al flujo de proceso indicado en la Figura R1.A.

Los fibroblastos se añadieron inicialmente porque generan proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina que podrían potencialmente mejorar la eficacia hemostática de la malla de fibrina y agarosa (Costa-Almeida, Soares, & Granja, 2018; Hou et al., 2015; Krafts, 2010).

Los cultivos celulares mostraron una morfología alargada y fusiforme típica de fibroblastos y proliferaron adecuadamente in vitro (Figura R1.B).

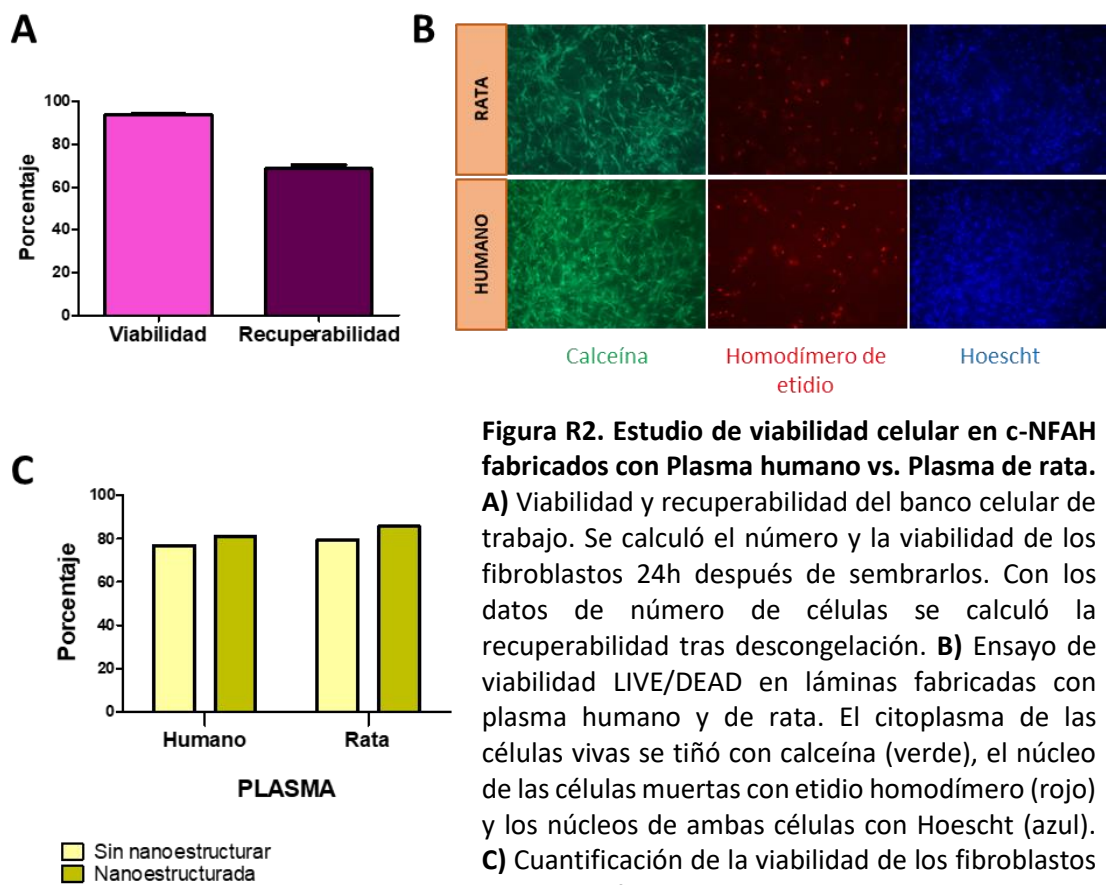
Las células fueron caracterizadas analizando la expresión de marcadores específicos de fibroblastos (Denu et al., 2016; Lorenz et al., 2008; Lysy, Smets, Sibille, Najimi, & Sokal, 2007). Éstas mostraron expresión de vimentina, colágeno tipo I y colágeno tipo III por inmunofluorescencia (Figura R1.C) así como un alto porcentaje de CD29, CD44 y CD90 por citometría de flujo (Figura R1.E-F). Adicionalmente, las células mostraron un cariotipo normal (Figura R1.D).

Para evaluar la recuperabilidad celular tras la descongelación de las células banqueadas se descongelaron tres crioviales de fibroblastos y se sembraron sus células en flasks a una densidad de 4.000-6.000 células/cm<sup>2</sup>. Los cultivos se levantaron a las 24 horas para determinar la viabilidad y calcular así la recuperabilidad. La viabilidad media de los cultivos a las 24 horas fue de media 93.7±1% (Figura R2.A), mientras que su recuperabilidad fue del 68.5±3%.



**Figura R1. Caracterización de los fibroblastos dérmicos de rata. A)** Esquema de obtención del Banco celular de trabajo (BCT). **B)** Imagen de contraste de fase y curva de crecimiento del cultivo de fibroblastos de rata. **C)** Expresión de marcadores de fibroblastos determinada mediante inmunofluorescencia. **D)** Análisis del cariotipo del BCT. **E)** Estrategia de regiones para el análisis por citometría de flujo. **F)** Expresión de marcadores de fibroblastos.

Los datos de viabilidad obtenidos coincidieron con estudios precedentes de constructos de fibrina y agarosa celularizados con células humanas y fabricados a partir de plasma humano (Campos, Garzón, Rodríguez, & Martín-Piedra, 2016; Jaimes-Parra et al., 2016), y cumplen con la especificación establecida por la FDA para la fabricación de productos a base de células ("Guidance for FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)" 2008).



**Figura R2. Estudio de viabilidad celular en c-NFAH fabricados con Plasma humano vs. Plasma de rata.** **A)** Viabilidad y recuperabilidad del banco celular de trabajo. Se calculó el número y la viabilidad de los fibroblastos 24h después de sembrarlos. Con los datos de número de células se calculó la recuperabilidad tras descongelación. **B)** Ensayo de viabilidad LIVE/DEAD en láminas fabricadas con plasma humano y de rata. El citoplasma de las células vivas se tiñó con calceína (verde), el núcleo de las células muertas con etidio homodímero (rojo) y los núcleos de ambas células con Hoescht (azul). **C)** Cuantificación de la viabilidad de los fibroblastos en c-NFAH fabricados con plasma humano y de rata antes y después de la nanoestructuración.

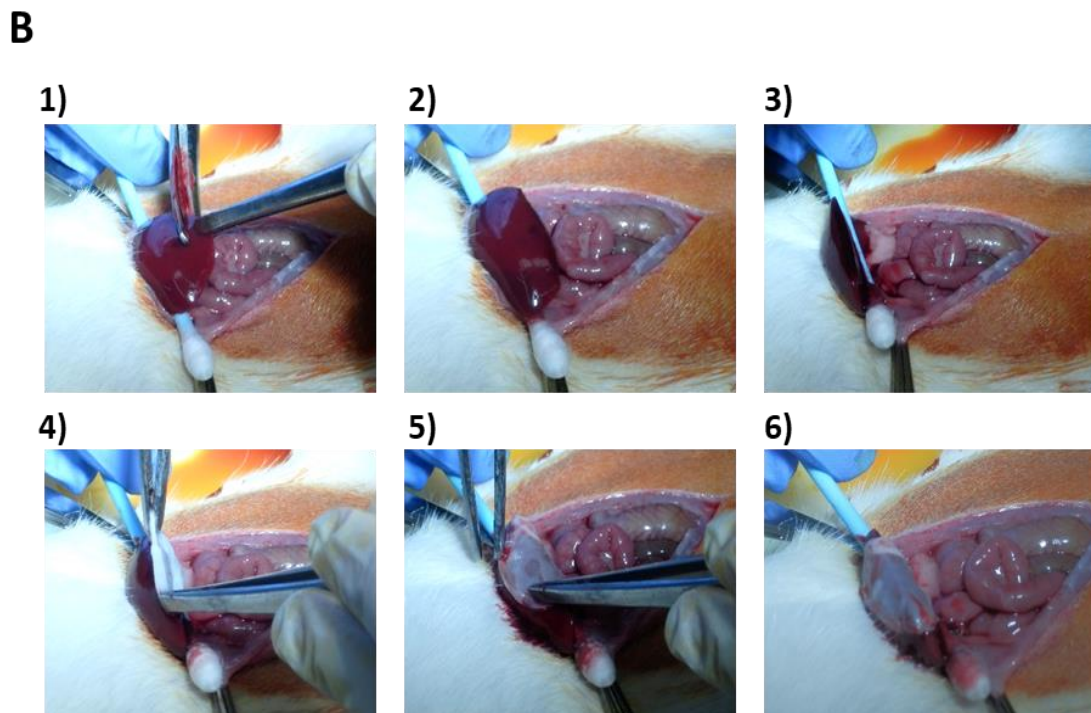
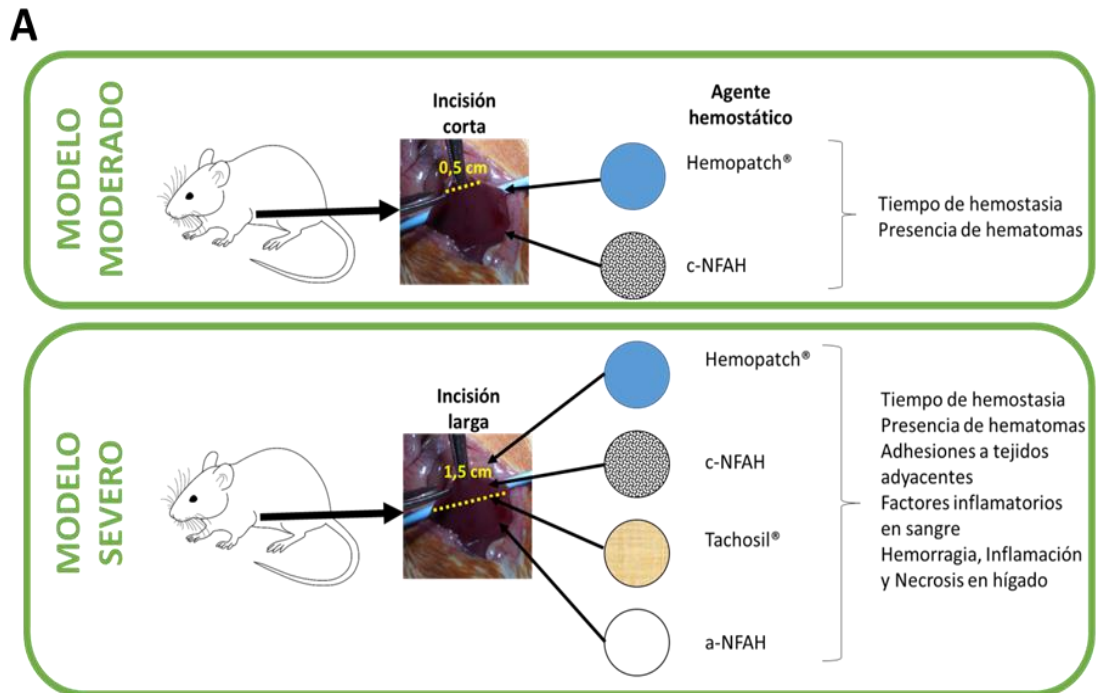
Para el estudio de hemostasia se eligió un modelo animal homólogo en el cual utilizar apósitos fabricados con fibroblastos y plasma de esa misma especie. Sin embargo, problemas de coagulación presentados por el plasma de rata tras la descongelación forzaron que todos los estudios incluidos en esta tesis se hicieran con apósitos de fibrina y agarosa fabricados con plasma humano. Por este motivo, se decidió comprobar si la viabilidad de los fibroblastos de rata embebidos en plasma humano era similar a la viabilidad de estos embebidos en plasma de rata. Por ello, se fabricaron apósitos c-NFAH

(con plasma humano o plasma de rata) descongelando fibroblastos de rata y embebiéndolos directamente en el hidrogel a razón de 150.000 fibroblastos/ml. La viabilidad celular en los hidrogeles se analizó 7 días después de la fabricación y se realizó por microscopía de fluorescencia tras la tinción con homodímero de etidio y calceína (LIVE/DEAD) (Figura R2.B). En el estudio se incluyeron muestras de hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurados (NFAH) y sin nanoestructurar (FAH) para comparar una posible pérdida de viabilidad debida al proceso de compresión y deshidratación. Las medias de viabilidad de los hidrogeles sin nanoestructurar fueron similares (79.5% y 76.9% respectivamente) y no se observó una pérdida de viabilidad tras la nanoestructuración (85.6% y 81.1% respectivamente) (Figura R2.C).

## **4.2 NFAH tiene efecto hemostático**

Se realizó un estudio preliminar para analizar el efecto hemostático de los c-NFAH en un modelo moderado de resección hepática (incisión corta, 0,5 cm) comparándolo con Hemopatch, un agente hemostático sellante comercial ampliamente utilizado en cirugía hepática (Figura R3.A). Para ello, se prepararon c-NFAH con forma redondeada y diámetro de 12 mm, los cuales se colocaron sobre la superficie de sangrado inmediatamente después de la resección hepática en rata del mismo modo que se muestra en la Figura R3.B. Los parches de Hemopatch se recortaron para tener la misma dimensión y se aplicaron según las instrucciones del fabricante.

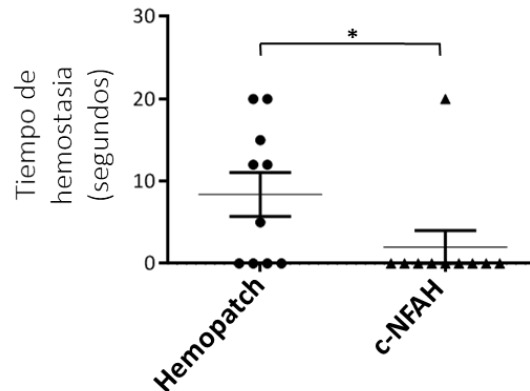
Los resultados mostraron que la eficacia hemostática del apósito c-NFAH fue mayor con respecto a la almohadilla de Hemopatch en el modelo de resección hepática moderado ( $p$  valor= 0.045), con un tiempo medio de hemostasia de  $2 \pm 2$  segundos ( $N = 10$ , rango = 0-20) y  $8.4 \pm 2.6$  segundos ( $N = 10$ , rango = 5-20), respectivamente (Figura R4).



**Figura R3. Modelo animal de resección hepática. A)** Esquema resumen de los agentes hemostáticos utilizados en cada modelo de resección y parámetros evaluados. **B)** Aplicación secuencial del apósito nanoestructurado de fibrina y agarosa (NFAH) en la resección hepática en rata. Las imágenes muestran la incisión hepática, la exposición de la herida (1–3), la aplicación y colocación final del NFAH (4–6).



## Incisión Corta



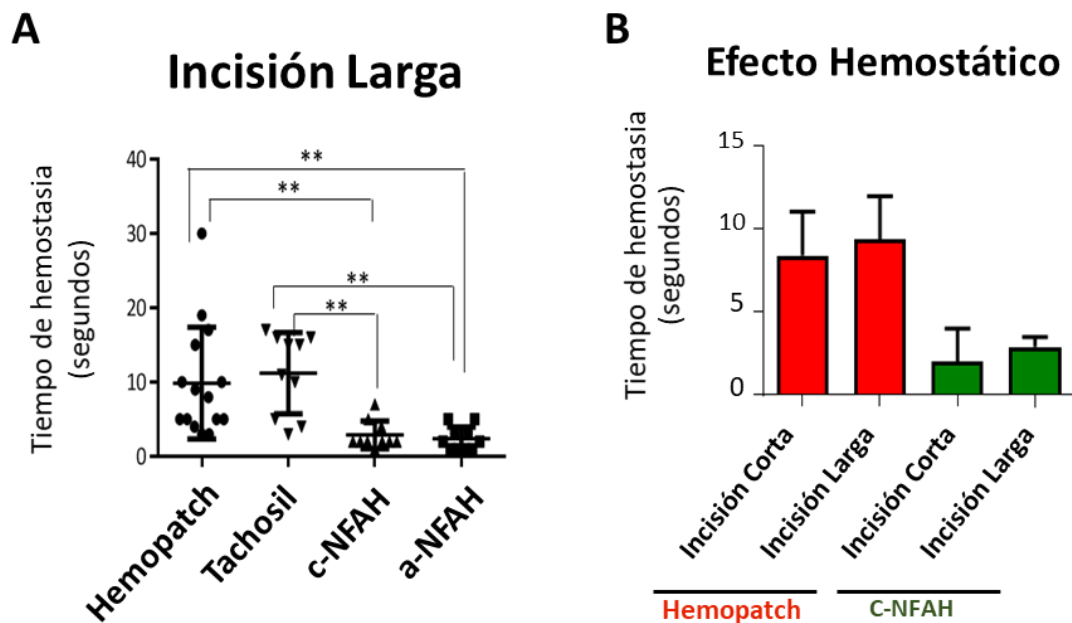
**Figura R4. Hemostasia en el modelo moderado de hepatectomía.** Tiempo en alcanzar la hemostasia aplicando los agentes hemostáticos tras realizar una incisión hepática corta (0,5 cm). Los resultados se presentan como media  $\pm$  SEM y el método estadístico aplicado en este experimento fue la Prueba de la U de Mann-Whitney (\* P value < 0.05).

Tras comprobar que el efecto hemostático de los apósitos de c-NFAH era mejor que el de Hemopatch en el modelo moderado de resección hepática, se decidió probar el efecto hemostático del apósito de c-NFAH en un modelo severo de resección hepática (incisión larga, 1,5 cm). Para este análisis se incluyeron tres grupos de tratamiento adicionales: a-NFAH, para evaluar si los fibroblastos tenían o no un efecto beneficioso en el proceso hemostático; Tachosil, para comparar el efecto hemostático de c-NFAH respecto a otro producto hemostático comercial basado también en fibrina; y Hemopatch, para comparar los productos a base de fibrina con respecto a un sellante de PEG y que se utilizó en el modelo de resección moderada (Figura R3.A). La clasificación de estos cuatro agentes hemostáticos utilizados en el estudio, su composición, mecanismo de acción y aplicaciones están ilustrados en la Tabla R1. Al igual que en el estudio preliminar, los hemostáticos comerciales se recortaron para tener la misma dimensión que los apósitos de fibrina y agarosa y se aplicaron según las instrucciones del fabricante. A diferencia de Hemopatch y Tachosil que se aplicaron mediante presión manual según lo indicado por los fabricantes, los NFAH se colocaron sobre la herida sin aplicar ninguna presión adicional (Figura R3.B).

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	CATEGORÍA	ACCIÓN	INDICACIONES	APLICACIÓN
<b>Hemopatch</b>	Colágeno bovino recubierto de monómeros de NHS-PEG	Sellante PEG	Cuando el recubrimiento de NHS-PEG entra en contacto con la sangre, mejora sus propiedades de adherencia al tejido y sella la superficie sangrante. Además, en contacto con la sangre, el colágeno induce la agregación plaquetaria.	Control de hemorragias o fugas de fluidos corporales o aire Cierre de defectos duros	El parche se aplicó en seco, con ayuda de una gasa, ejerciendo presión e irrigándolo para no desplazarlo al retirar la presión
<b>Tachosil</b>	Colágeno equino recubierto con fibrinógeno (5.5 mg/cm <sup>2</sup> ) y trombina humana (2 UI /cm <sup>2</sup> )	Sellante de fibrina	En contacto con fluidos fisiológicos, el fibrinógeno se convierte en monómeros de fibrina que polimerizan para formar un coágulo que mantiene la esponja de colágeno adherida a la superficie de la herida. La fibrina queda unida mediante enlaces cruzados por el FXIII endógeno.	Mejora de la hemostasia Promover el sellado de tejidos Soporte de suturas en cirugía vascular Sellado de soporte de la duramadre	El parche se humedeció en solución salina durante pocos segundos y se aplicó con ayuda de una gasa ejerciendo presión
<b>c-NFAH</b>	Fibrina, agarosa 0,1%, CaCl <sub>2</sub> 0,2%*, ácido tranexámico (4,6 pg /cm <sup>2</sup> )* y fibroblastos dérmicos	Sellante de fibrina	La matriz nanoestructurada de fibrina y agarosa facilita la formación del coágulo evitando el flujo sanguíneo. Potencial efecto hemostático de las proteínas de matriz extracelular generadas por los fibroblastos.	Tratamiento de úlceras corneales (actualmente en ensayo clínico - NCT01765244) y grandes quemados (uso por exención hospitalaria). Potencial agente hemostático para múltiples disciplinas quirúrgicas (en estudio).	El apósito que venía en solución salina se aplicó sin ejercer presión
<b>a-NFAH</b>	Fibrina, agarosa 0,1%, CaCl <sub>2</sub> 0,2%* y ácido tranexámico (4,6 pg /cm <sup>2</sup> )*	Sellante de fibrina	La matriz nanoestructurada de fibrina y agarosa facilita la formación del coágulo evitando el flujo sanguíneo.	Potencial agente hemostático para múltiples disciplinas quirúrgicas (en estudio).	El apósito que venía en solución salina se aplicó sin ejercer presión

**Tabla R1.** Clasificación de los agentes hemostáticos utilizados en el estudio. NHS-PEG: pentaeritrol poli etilenglicol éter tetra-succinimidil glutarato de N-hidroxisuccinimida. PEG: poli etilenglicol.

Los resultados mostraron diferencias significativas en el tiempo de hemostasia entre los agentes hemostáticos ( $p$  valor $<0.001$ ). El grupo de animales tratados con a-NFAH presentó el tiempo más bajo en alcanzar la hemostasia con  $2.4 \pm 0.58$  segundos ( $N = 10$ , rango = 1–5), seguido de c-NFAH con  $2.9 \pm 1.72$  segundos ( $N = 10$ , rango = 1–7). Ambos tratamientos mostraron un efecto hemostático significativamente superior al Hemopatch con  $9.8 \pm 1.02$  segundos ( $N = 15$ , rango = 3–30) y al Tachosil con  $11.2 \pm 0.49$  segundos ( $N = 10$ , rango = 3–17) (Figura R5.A).



**Figura R5. Hemostasia en el modelo severo de hepatectomía. A)** Tiempo en alcanzar la hemostasia aplicando los agentes hemostáticos tras realizar una incisión hepática larga (1,5 cm). Los resultados se presentan como media  $\pm$ SEM y el método estadístico aplicado en este experimento fue un análisis de la varianza de Kruskal-Wallis seguido de una prueba post-hoc Test Dunn (\*\* $P$  value $<0.01$ ). **B)** Comparación del tiempo de hemostasia entre los modelos de hepatectomía moderada (Incisión corta) y severa (Incisión larga) tras los tratamientos con Hemopatch y c-NFAH.

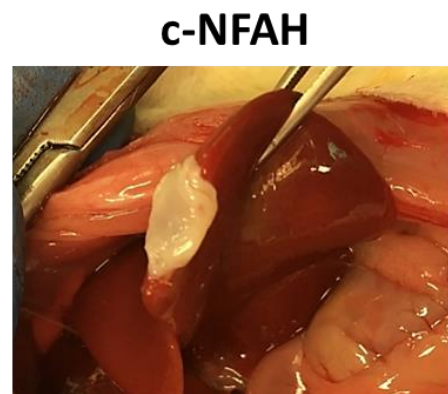
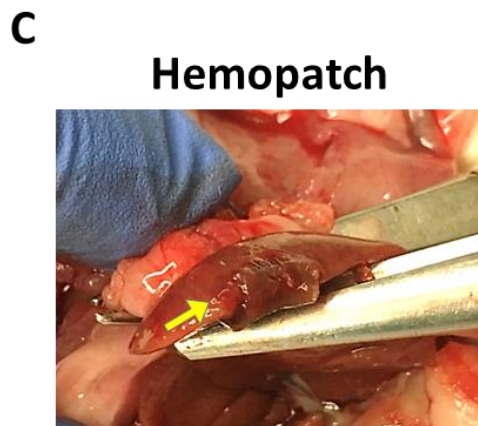
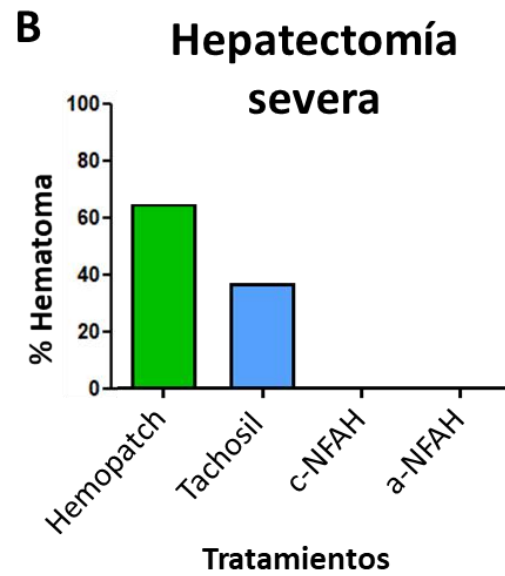
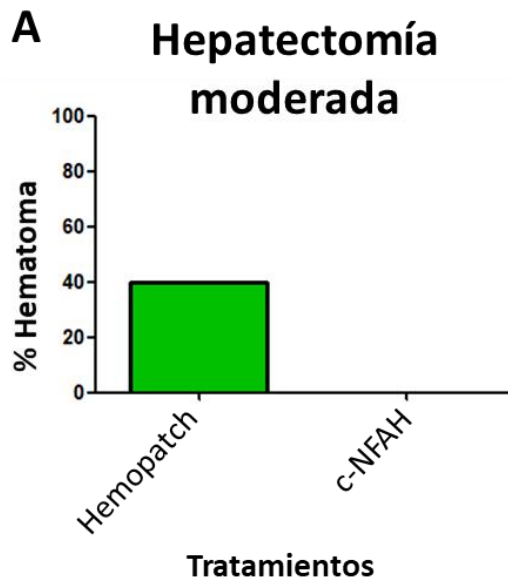
El tiempo de hemostasia fue ligeramente superior en el modelo severo aunque las diferencias no fueron significativas (Figura R5.B).

Después de 24 horas, cuando los animales fueron diseccionados, no se encontró resangrado en ningún grupo tratado, y sólo un parche de Tachosil se encontró parcialmente desplazado en un animal.

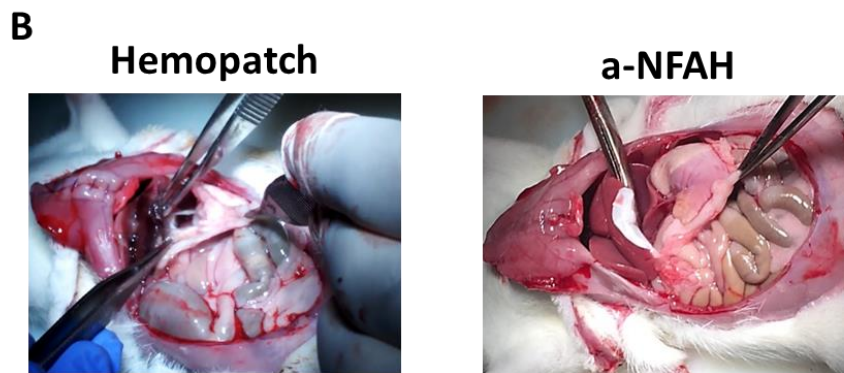
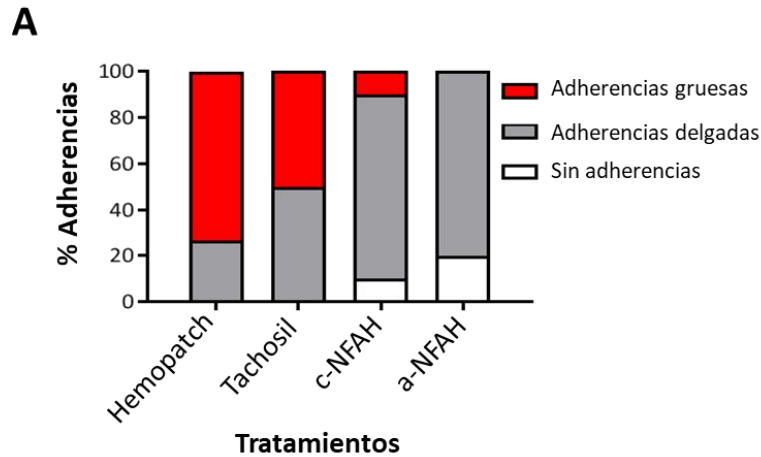
### **4.3 NFAH tiene resultados favorable en la respuesta tisular e inflamación**

La inspección visual de la herida 24 horas después del procedimiento en los animales sometidos al modelo moderado de resección hepática no reveló incidencia alguna de hematoma macroscópico en el grupo c-NFAH pero si con Hemopatch (40%) (Figura R6.A). Se obtuvieron resultados similares en el modelo severo de hepatectomía donde hubo una ausencia completa de hematomas en los grupos de c-NFAH y a-NFAH, mientras que por el contrario, el hematoma perilesional estaba presente en ratas tratadas con Hemopatch y Tachosil (73.3% y 40%, respectivamente) (Figura R6.B). Ejemplos de hematoma con la aplicación de Hemopatch y sin hematoma con la aplicación de a-NFAH se muestran en la Figura R6.C.

Se evaluó la presencia de adherencias postoperatorias no deseadas a tejidos sanos circundantes en el momento del sacrificio. Para ello, la adherencia en cada animal fue clasificada con un valor entre 0 y 2, siendo: 0, sin adherencias; 1, delgadas adherencias separables por gravedad; y 2, gruesas adherencias no separables por gravedad. Los resultados mostraron diferencias entre los grupos, presentando resultados similares las ratas tratadas con c-NFAH o a-NFAH. Sorprendentemente, algunos de estos animales no mostraron ninguna adherencia, y la mayoría presentó solo delgadas adherencias. Por el contrario, los animales tratados con Hemopatch y Tachosil mostraron adherencias consistentemente más gruesas a tejidos adyacentes (Figura R7.A). Se muestran ejemplos de adherencias de alto grado inducidas por Hemopatch y no adherencias por a-NFAH (Figura R7.B).



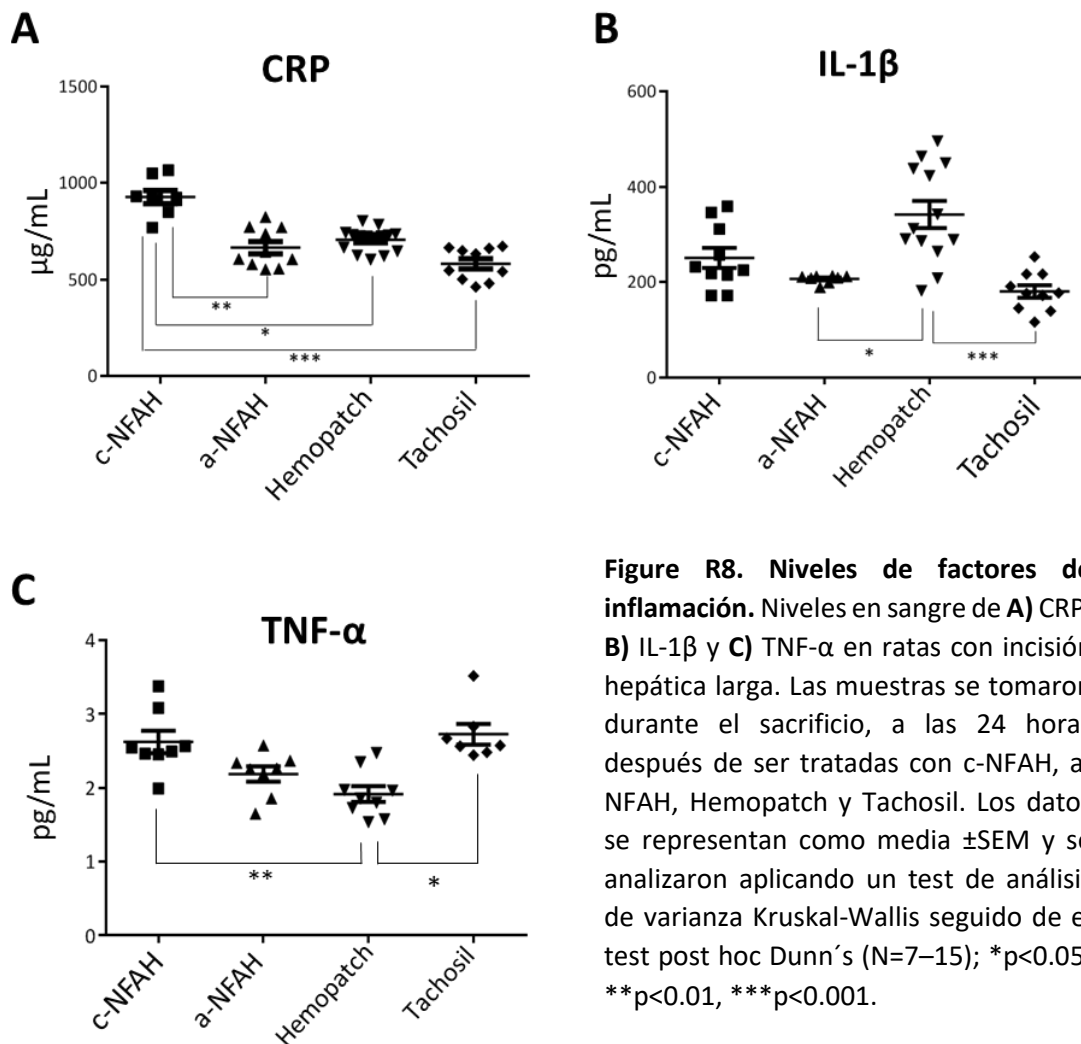
**Figura R6. Ausencia de hematoma hepático en apósitos NFAH. A)** Porcentaje de ratas con hematoma 24 horas después de la aplicación de diferentes agentes hemostáticos en un modelo moderado de resección hepática en ratas (Incisión corta: 0,5 cm). **B)** Porcentaje de ratas con hematoma 24 horas después de la aplicación de diferentes agentes hemostáticos en un modelo severo de resección hepática en ratas (Incisión larga: 1,5 cm). **C)** Imágenes representativas de presencia (Hemopatch) y ausencia (NFAH) de hematoma 24 horas después de la aplicación del tratamiento hemostático en un modelo moderado de resección hepática (Incisión corta: 0,5 cm).



**Figure R7. Grado de adherencias postoperatorias ocasionadas por los diferentes agentes hemostáticos en ratas sujetas a incisión hepática larga. A).** La adherencia en cada muestra fue clasificada con un valor entre 0 y 2: 0, sin adherencias; 1, delgadas adherencias separables por gravedad; y 2, gruesas adherencias no separables por gravedad. **B)** Imágenes representativas de adherencias en incisiones hepáticas largas tratadas con Hemopatch y a-NFAH.

A continuación, se analizaron los factores inflamatorios en sangre (muestras tomadas durante el sacrificio) mediante ELISA para probar la respuesta inflamatoria a las 24 horas después de la cirugía (mínimo de N = 7 animales por grupo). Con respecto a los niveles de la proteína C-reactiva (CRP), no hubo diferencias significativas entre los grupos a-NFAH, Hemopatch o Tachosil. Sin embargo, los niveles de CRP en el grupo c-NFAH fueron significativamente más altos que en los grupos a-NFAH ( $p < 0.01$ ), Hemopatch ( $p < 0.05$ ) o Tachosil ( $p < 0.001$ ) (Figura R8.A). Por el contrario, el grupo de Hemopatch tuvo niveles significativamente más altos de IL-1 $\beta$  que los grupos a-NFAH o Tachosil ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente), mientras que no se observaron diferencias entre los grupos c-NFAH, a-NFAH y Tachosil (Figura R8.B). Además, no hubo diferencias significativas en los niveles de TNF- $\alpha$  entre el grupo a-NFAH y los otros 3 grupos. Sin embargo, los grupos

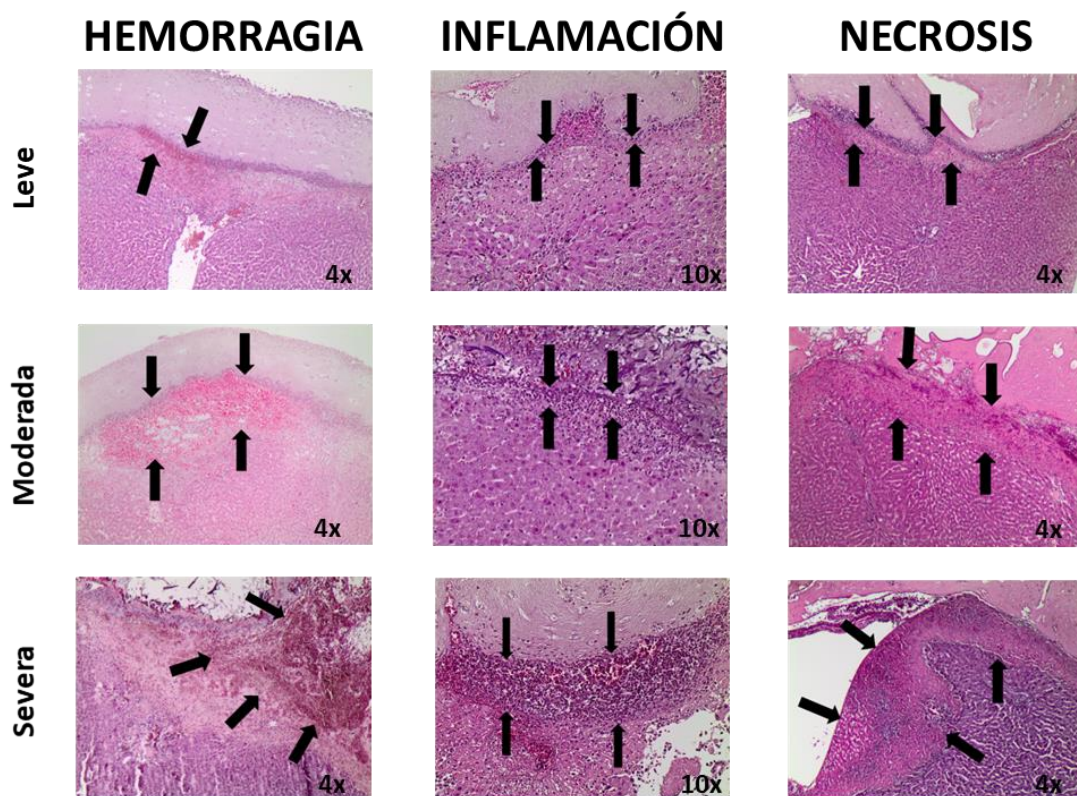
c-NFAH y Tachosil presentaron niveles significativamente más altos que el grupo de Hemopatch ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente) (Figura R8.C).



**Figure R8. Niveles de factores de inflamación.** Niveles en sangre de **A)** CRP, **B)** IL-1 $\beta$  y **C)** TNF- $\alpha$  en ratas con incisión hepática larga. Las muestras se tomaron durante el sacrificio, a las 24 horas después de ser tratadas con c-NFAH, a-NFAH, Hemopatch y Tachosil. Los datos se representan como media  $\pm$ SEM y se analizaron aplicando un test de análisis de varianza Kruskal-Wallis seguido de el test post hoc Dunn's ( $N=7-15$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Posteriormente se analizaron el grado de hemorragia, inflamación y necrosis en el tejido hepático circundante a la zona de aplicación del agente hemostático. Las variables histopatológicas fueron calificadas por un investigador ciego de acuerdo con los criterios descritos en Materiales y Métodos. Imágenes representativas de los diferentes grados de severidad de las variables estudiadas se muestran en la Figura R9.

Ambos tratamientos con NFAH mostraron menor hemorragia, respuesta inflamatoria y necrosis que los tratamientos con Hemopatch y Tachosil. El grupo de tratamiento con c-NFAH presentó el porcentaje general más bajo de animales con hemorragia a nivel



**Figura R9. Categorización de las variables histopatológicas.** Las imágenes son representativas de los diferentes grados de hemorragia, inflamación y necrosis tras la aplicación de un agente hemostático en el modelo severo de resección hepática en ratas (Incisión larga 1,5 cm). Los criterios de categorización de las variables se describen en detalle en la Tabla M5 el apartado “Análisis histopatológico” de la sección “Materiales y Métodos”.

microscópico, mostrando solo ausencia o hemorragia leve en algunos animales (40%) (Figura R10.A). Además, solo el 10% de los animales en el grupo a-NFAH mostró una hemorragia intensa, que fue similar al grupo Tachosil. Con respecto a la inflamación, ambos grupos de NFAH obtuvieron los mejores resultados, con sólo un 10% de los animales exhibiendo una inflamación intensa en el grupo de c-NFAH. Sin embargo, los tratamientos con Hemopatch y Tachosil mostraron más del 30% de los animales con inflamación intensa (Figura R10.B). Una tendencia similar se encontró para la necrosis (Figura R10.C). En consecuencia, los grupos NFAH presentaron el menor porcentaje de necrosis, sin eventos de necrosis severa, mientras que las ratas tratadas con Hemopatch y Tachosil presentaron un mayor porcentaje de necrosis moderada y/o severa.



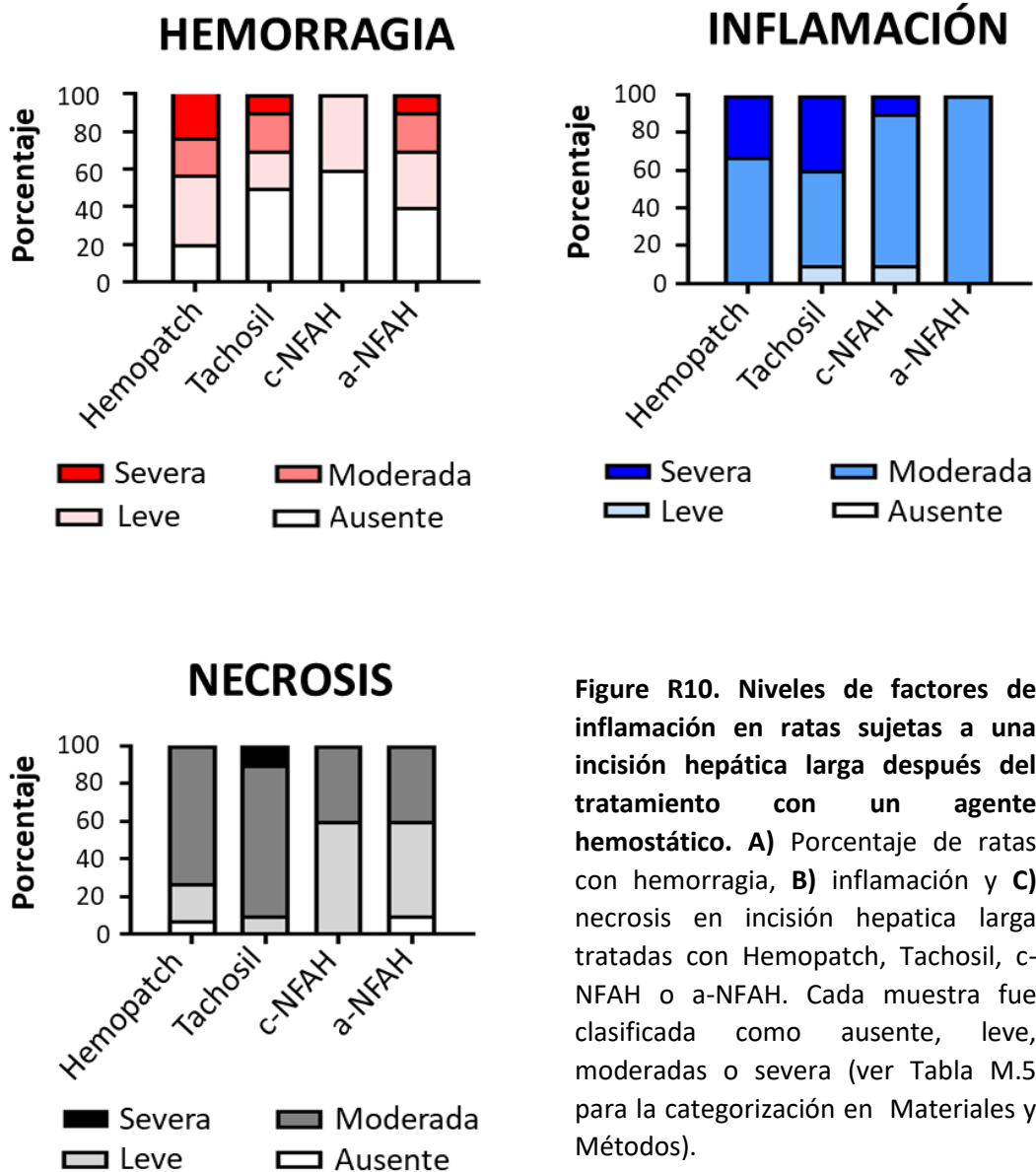


Figure R10. Niveles de factores de inflamación en ratas sujetas a una incisión hepática larga después del tratamiento con un agente hemostático. A) Porcentaje de ratas con hemorragia, B) inflamación y C) necrosis en incisión hepática larga tratadas con Hemopatch, Tachosil, c-NFAH o a-NFAH. Cada muestra fue clasificada como ausente, leve, moderadas o severa (ver Tabla M.5 para la categorización en Materiales y Métodos).

#### 4.4 Efecto hemostático del a-NFAH criopreservado

Los resultados mostraron una mayor tasa de éxito hemostático de los NFAH, menores adherencias postoperatorias a los tejidos adyacentes, ausencia de hematoma y menores grados de hemorragia, inflamación y necrosis en el análisis histopatológico. Sin embargo nuestros datos se obtuvieron tras la aplicación de NFAH generados “en fresco”, es decir, la etapa final de fabricación de los hidrogeles (la nanoestructuración) se realizó el mismo día que se aplicó en el animal. Este tipo de producción “a demanda” es insostenible a escala industrial puesto que no es posible producir en fresco NFAH en cantidad

suficiente para satisfacer todas las necesidades quirúrgicas. Para superar estas limitaciones, es necesario encontrar condiciones de almacenamiento a largo plazo que mantengan las propiedades hemostáticas y, a su vez, permitan la disponibilidad inmediata de NFAH para cualquier cirugía no programada.

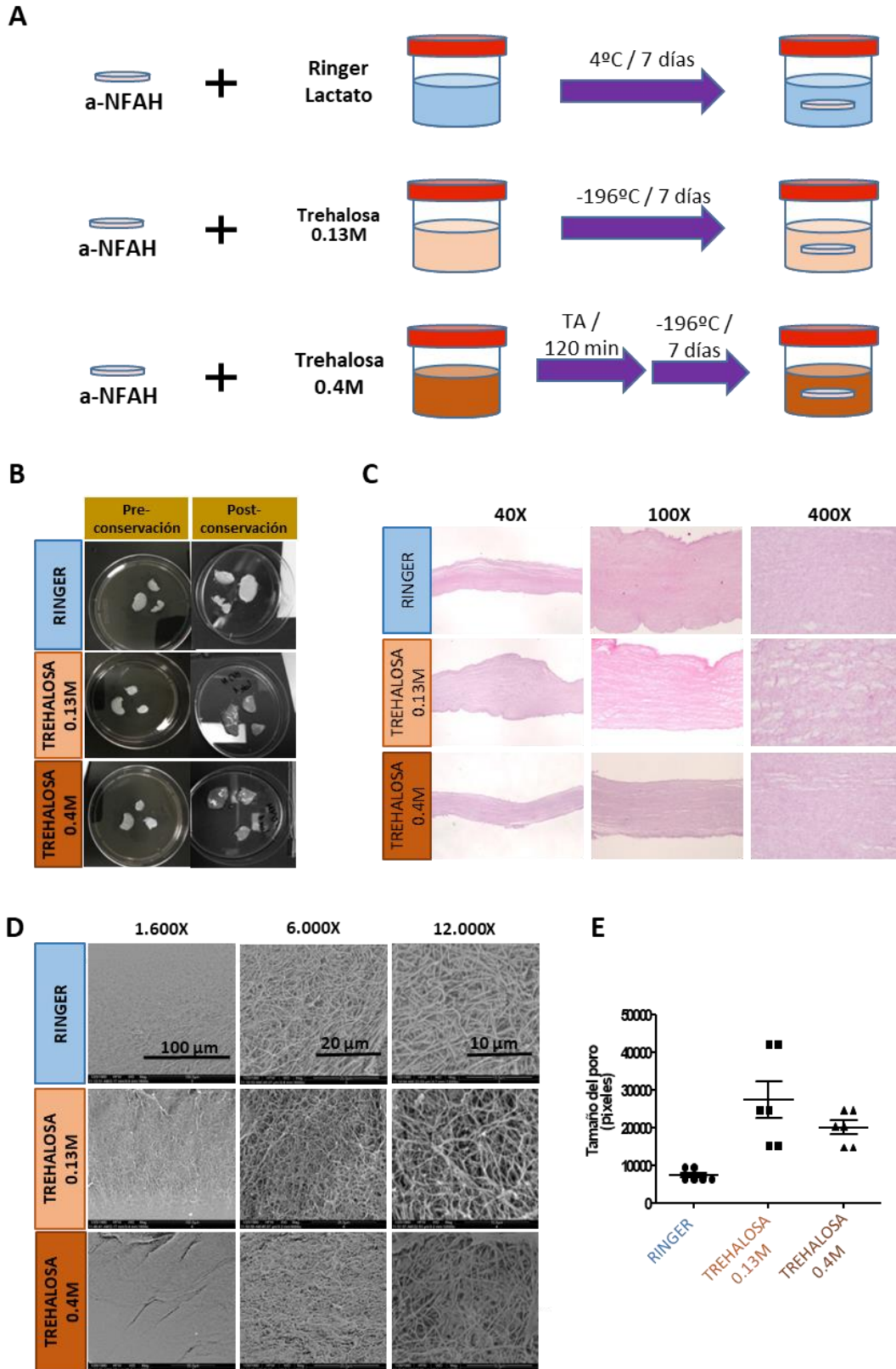
En estudios previos de criopreservación se demostró la eficacia de la trehalosa como agente crioprotector para los apósitos de fibrina y agarosa (Serrato et al., 2009). Así mismo, la criopreservación de proteínas con trehalosa para su posterior liofilización es un método ampliamente conocido y utilizado, por lo que una criopreservación eficaz con trehalosa abriría la posibilidad de liofilizar los apósitos NFAH en un futuro.

Por ello se realizó un estudio preliminar de criopreservación de NFAH. En este punto, se decidió continuar solamente con los apósitos no celularizados (a-NFAH) ya que nuestros resultados mostraban que las células no representaban ventaja alguna en cuanto al tiempo de hemostasia, presencia de hematomas, adherencias o niveles de inflamación.

Para el estudio preliminar de criopreservación se fabricaron tres lotes diferentes de a-NFAH y se preservaron bajo tres condiciones diferentes: 1) en solución salina Ringer Lactato a 4°C; 2) en solución de trehalosa 0.13M a -196°C; y 3) en solución de trehalosa 0.4M a -196°C. En el caso de los apósitos criopreservados con trehalosa 0.4M, éstos se incubaron en la solución de trehalosa a temperatura ambiente durante dos horas antes de ser transferidos al nitrógeno líquido (Figura R11.A).

La solución de trehalosa al 0.13M se eligió por corresponder a un 5% (peso/volumen), concentración utilizada en procesos de liofilización (Martín-Banderas et al., 2014). La solución de trehalosa al 0.4M se utilizó por haberse demostrado previamente su eficacia en la preservación de los apósitos de fibrina-agarosa (Serrato et al., 2009).

Tras 7 días de almacenamiento, las láminas criopreservadas se descongelaron a temperatura ambiente. Los a-NFAH conservados con las soluciones de trehalosa en nitrógeno líquido mostraron una estructura macroscópica similar a la que presentaban previamente a la criopreservación, sin mostrar signos de desintegración del hidrogel (Figura R11.B).



**Figura R11. Estudio preliminar de criopreservación del a-NFAH.** **A)** Esquema de criopreservación de a-NFAH. **B)** Análisis macroscópico de las láminas a-NFAH pre- y post-conservación. **C)** Imágenes representativas del análisis microscópico mediante tinción con hematoxilina-eosina. **D)** Imágenes representativas del análisis por microscopía electrónica de barrido. **E)** Tamaño de poro de las mallas en los diferentes grupos. TA: temperatura ambiente.

El análisis histológico de las muestras criopreservadas evidenció una estructura microscópica sin grandes poros o roturas, aunque las muestras congeladas en nitrógeno líquido con la solución de trehalosa 0.4M preservaron mejor su estructura que las criopreservadas en la solución de trehalosa 0.13M (Figura R11.C). El análisis de la microscopía electrónica de barrido mostró resultados similares a los encontrados en el análisis histológico con hematoxilina-eosina. La malla de fibrina y agarosa criopreservada con trehalosa 0.4M fue la que presentó una estructura tridimensional más íntegra y parecida a la lámina preservada a 4°C (Figura R11.D).

El tamaño de poro de los hidrogeles tras la criopreservación se cuantificó sin encontrarse diferencias significativas entre grupos, aunque el diámetro encontrado en la malla de fibrina y agarosa fue menor en la solución de trehalosa 0.4M que en la solución 0.13M de trehalosa (Figura R11.E).

Teniendo en cuenta que no todas las unidades quirúrgicas tienen fácil acceso a un criopreservador que permita conservar las láminas en nitrógeno líquido, se decidió hacer un estudio similar al anterior donde se comparase la conservación de los apósitos bajo una temperatura de congelación de -20°C. Una eficaz conservación de los apósitos a esta temperatura permitiría una sencilla distribución y almacenamiento en los quirófanos que normalmente disponen de congeladores convencionales en sus instalaciones.

En este estudio se fabricaron tres lotes diferentes de apósitos a-NFAH para la congelación. Una muestra de cada lote se envió para comprobar las condiciones histológicas de partida (precongelación) mediante análisis de microscopía óptica (Figura R12). Las demás láminas se traspasaron a la solución de trehalosa 0.4M donde permanecieron durante 120 minutos antes de introducirse en el congelador de -20 °C. A este nuevo producto criopreservado se le llamó Fr-aNFAH. Después de 3 meses, los Fr-aNFAH se descongelaron para el análisis histológico (postcongelación) mediante microscopía óptica y electrónica.

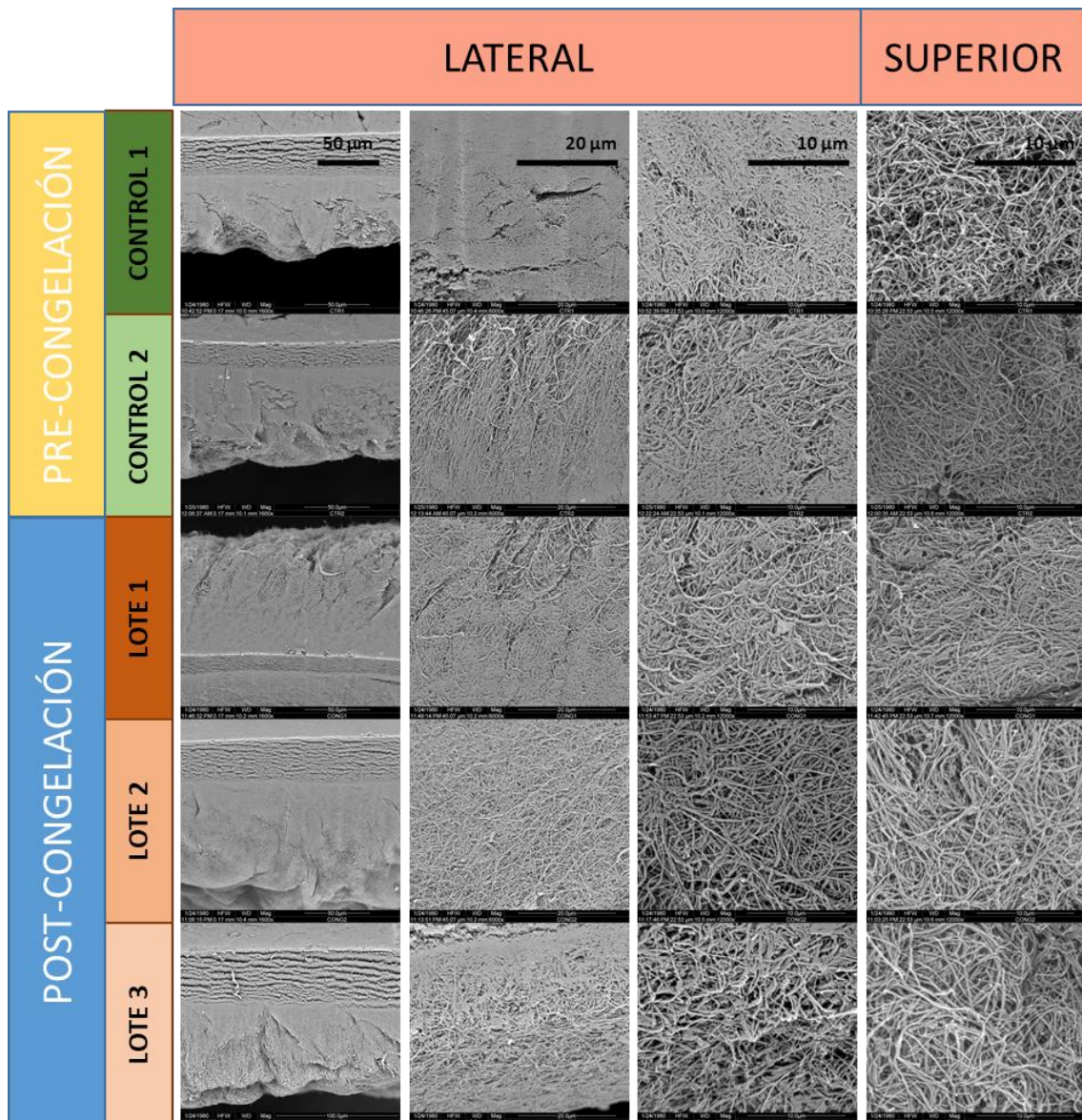
Los resultados de la microscopía óptica fueron similares en los tres lotes analizados (Figura R12). Aunque los apósitos presentaban pequeños poros, la estructura de la malla de fibrina-agarosa de las láminas tras la congelación fue muy parecida a la estructura

que tenían antes de la congelación. Del mismo modo, la microscopía electrónica mostró que las mallas de fibrina y agarosa no sufrieron cambios significativos bajo las condiciones de preservación utilizadas (Figura R13).



**Figura R12. Análisis histológico de Fr-aNFAH pre- y postcongelación.** Imágenes representativas del análisis por microscopía óptica mediante tinción con hematoxilina-eosina. Para el estudio se fabricaron tres lotes de apósitos a-NFAH fabricados con plasmas de diferentes donantes y se tomo una muestra de cada lote para analizarla antes y después de la congelación.

Para comprobar la eficacia hemostática de los Fr-aNFAH se compararon dos grupos de animales: un grupo control tratado con a-NFAH producidos “en fresco” el mismo día de la aplicación (a-NFAH) y otro grupo de animales tratados con a-NFAH congelados en



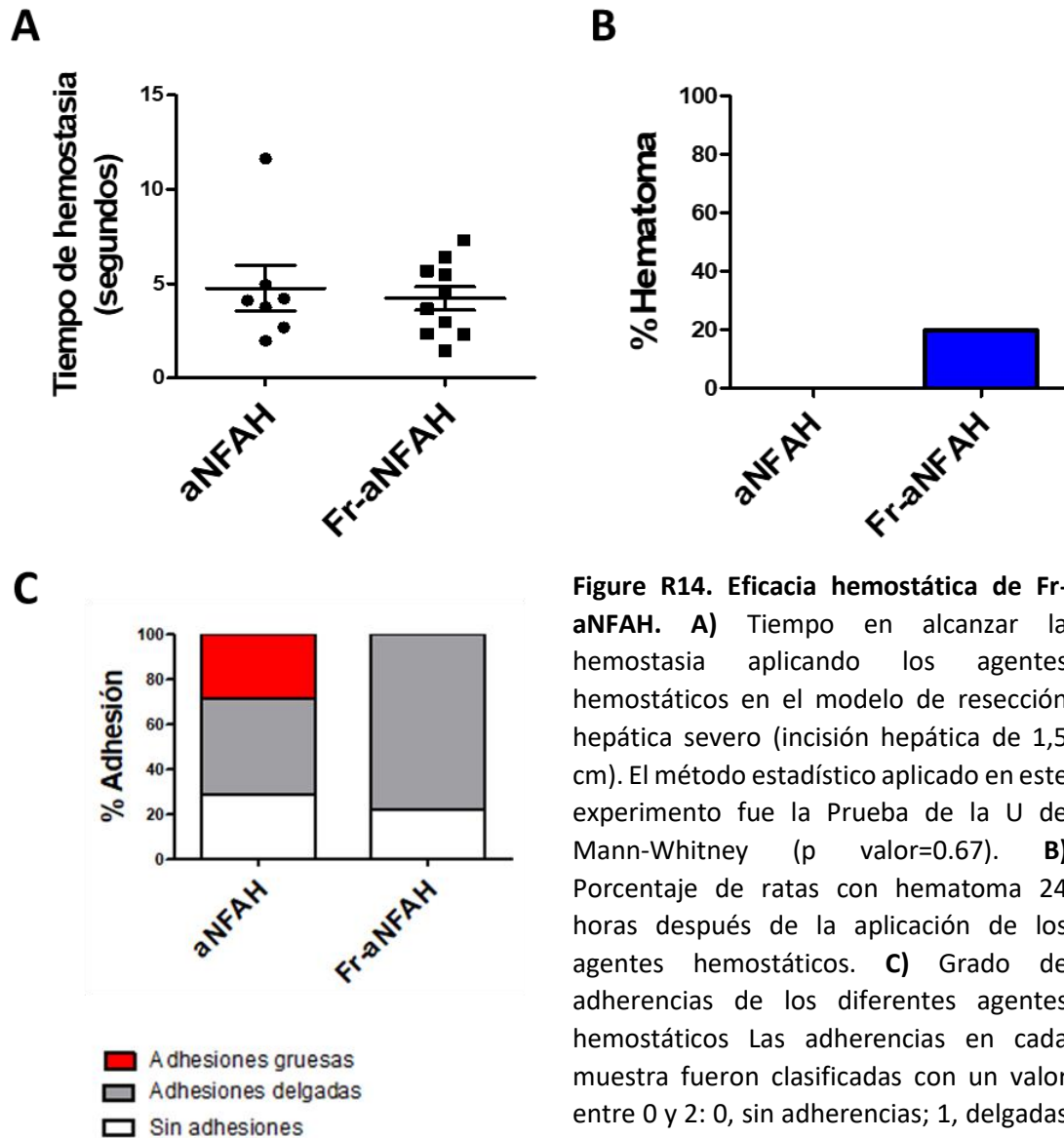
**Figura R13. Análisis histológico de Fr-aNFAH postcongelación.** Imágenes representativas del análisis por microscopía electrónica mediante recubrimiento oro-paladio. Para el estudio se utilizaron muestras descongeladas de los tres lotes de apósitos Fr-aNFAH fabricados con plasmas de diferentes donantes, mismas muestras que se utilizaron para el análisis por microscopía óptica (Figura R13). Para este análisis se incluyeron dos controles en fresco que no fueron congelados.

trehalosa 0.4M a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes (Fr-aNFAH). Se realizó una resección hepática en ratas con una incisión de 1.5 cm de longitud (modelo severo) y seguidamente se aplicó el apósito hemostático en estudio midiendo el tiempo de hemostasia. Al día siguiente los animales fueron sacrificados para analizar las siguientes variables: adherencias postoperatorias, presencia de hematomas, factores de inflamación y análisis histopatológico (hemorragia, inflamación y necrosis) del tejido hepático circundante a la zona de aplicación del apósito.

El tiempo de hemostasia en el grupo de apósitos a-NFAH fabricados “en fresco” fue de  $4.75 \pm 1.2$  segundos (N = 7, rango = 2-11.6); mientras que para el grupo de láminas congeladas Fr-aNFAH fue de  $4.2 \pm 1.2$  segundos (N = 10, rango = 1.4-7.3). No hubo por tanto diferencias significativas en el tiempo de hemostasia entre los grupos (p valor=0.67) (Figura R14.A).

Al momento del sacrificio, no se observó presencia alguna de hematomas en el grupo a-NFAH. Mientras que el grupo de animales tratados con láminas congeladas la incidencia de hematoma hepático fue del 20% (Figura R14.B).

Los resultados mostraron ausencia de adherencias en un 22,2% de los animales y un 77,8% de adherencias delgadas en el grupo Fr-aNFAH, sin presencia de adherencias gruesas. Por otro lado, el grupo aNFAH mostró un 28,5% de los animales sin adherencias, un 43% adherencias delgadas y un 28,5% de adherencias gruesas (Figura R14.C).



**Figure R14. Eficacia hemostática de Fr-aNFAH.** **A)** Tiempo en alcanzar la hemostasia aplicando los agentes hemostáticos en el modelo de resección hepática severo (incisión hepática de 1,5 cm). El método estadístico aplicado en este experimento fue la Prueba de la U de Mann-Whitney ( $p$  valor=0.67). **B)** Porcentaje de ratas con hematoma 24 horas después de la aplicación de los agentes hemostáticos. **C)** Grado de adherencias de los diferentes agentes hemostáticos. Las adherencias en cada muestra fueron clasificadas con un valor entre 0 y 2: 0, sin adherencias; 1, delgadas adherencias separables por gravedad; y 2, gruesas adherencias no separables por gravedad.

## 4.5 Seguridad del a-NFAH criopreservado

Tras comprobar la eficacia hemostática de los apósitos de fibrina y agarosa mantenida con el método de preservación analizado, se decidió proceder al estudio de seguridad. Hasta el momento todos los animales habían sido sacrificados a las 24 horas de su tratamiento, por lo que no se disponían de datos de ninguna de las variables en estudio más allá de ese periodo de tiempo. Se llevó a cabo un estudio de seguridad comparativo entre el apósito congelado (Fr-aNFAH) y el agente hemostático comercial de composición similar (Tachosil).



Los agentes hemostáticos se aplicaron en el modelo de resección hepática severo (incisión 1.5 cm). Al igual que anteriormente, los apósitos Fr-aNFAH fueron descongelados a temperatura ambiente en el momento de su uso tras 1 mes congelados en trehalosa 0.4M a -20°C. En el momento de la cirugía se analizó el tiempo de hemostasia y posteriormente se suturó la herida y se realizó un seguimiento de los animales para evaluar la posible aparición de efectos adversos tras el tratamiento. Se registró la evolución de la temperatura y del peso corporal.

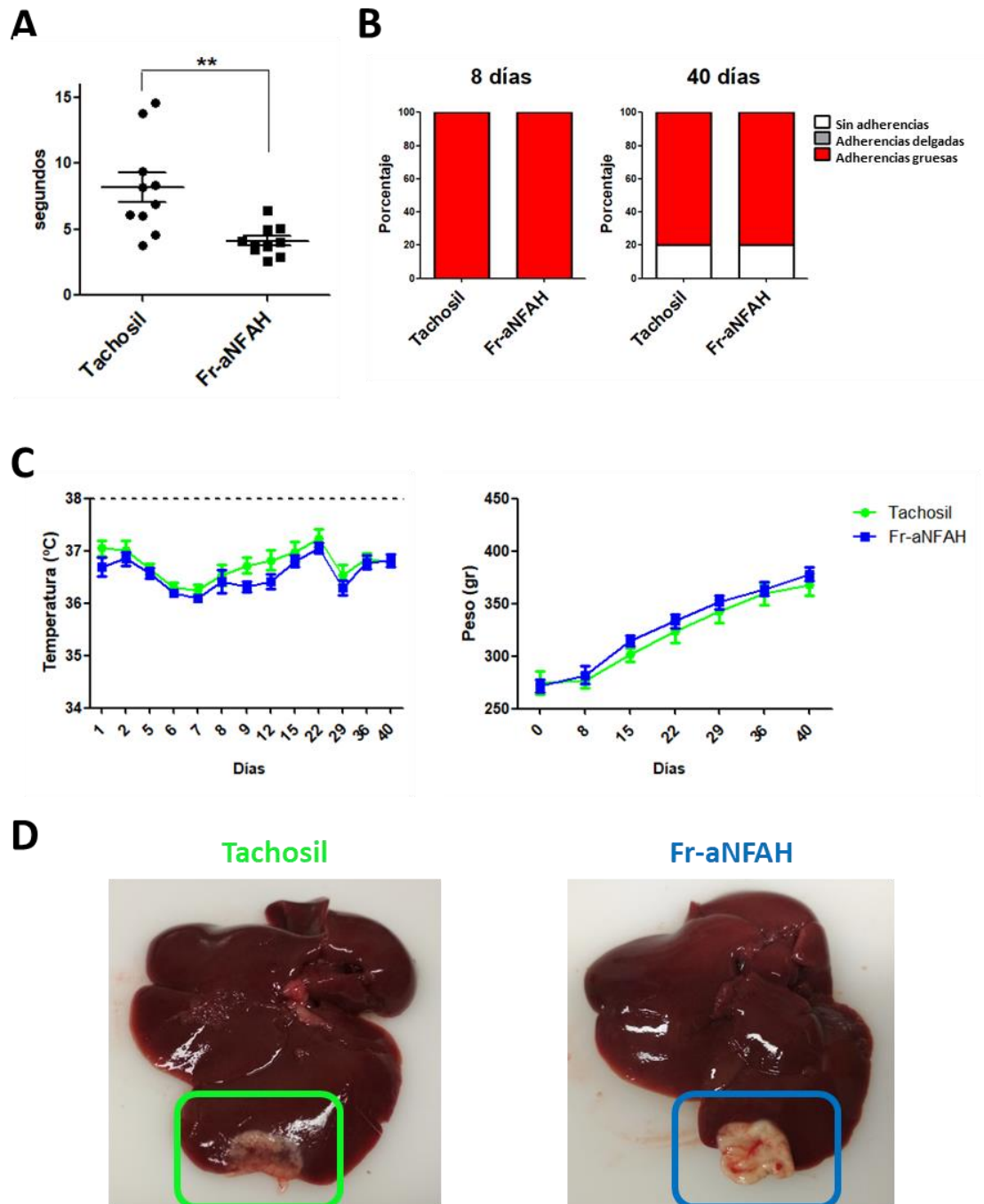
La mitad de los animales de cada grupo fueron sacrificados a los 8 días y la otra mitad a los 40 días, momentos en que se analizaron las adherencias postoperatorias y la presencia de hematomas del tejido hepático circundante a la incisión.

La diferencia en el tiempo de hemostasia entre grupos fue significativa (p valor=0.0033) con una media de tiempo en el grupo control Tachosil de  $8.16 \pm 1.1$  segundos (N = 10, rango = 3.7-14.6) y en el grupo Fr-aNFAH de  $4.1 \pm 0.3$  segundos (N = 10, rango = 2.6-6.4) (Figura R15.A).

Respecto a la presencia de hematomas, no se encontró hematoma alguno en ninguno de los dos grupos, ya fuese en los animales sacrificados a los 8 días como en los sacrificados a los 40 días.

El 100% de los animales mostraron adherencias gruesas 8 días después del tratamiento mientras que solo el 80% presentaron estas adherencias 40 días después del tratamiento estando el 20% restante libre de adherencias (Figura R15.B).

La temperatura corporal de los animales en los dos grupos se mantuvo dentro del rango de normalidad (36-38°C). El valor de temperatura corporal más alto (37,8°C) se alcanzó en un animal tratado con Tachosil (Figura R15.C).



**Figura R15. Eficacia y Seguridad del apósito de fibrina y agarosa Fr-aNFAH. A)** Tiempo en alcanzar la hemostasia aplicando los agentes hemostáticos en el modelo de resección hepática severo (incisión hepática de 1,5 cm). Los resultados se presentan como media  $\pm$ SEM y el método estadístico aplicado en este experimento fue la Prueba t Student (\*\* $p < 0.01$ ). **B)** Grado de adherencias postoperatorias ocasionadas por la aplicación de los diferentes agentes hemostáticos a 8 y 40 días postcirugía. Las adherencias en cada muestra fueron clasificadas con un valor entre 0 y 2: 0, sin adherencias; 1, delgadas adherencias separables por gravedad; y 2, gruesas adherencias no separables por gravedad. **C)** Evolución de la temperatura y el peso de los animales a lo largo de los 40 días de estudio. **D)** Imágenes representativas de la degradación de los agentes hemostáticos tras 40 días.

El incremento de peso en los animales fue progresivo durante los 40 días de estudio a excepción de la primera semana donde algunos animales tuvieron una pérdida de peso (Figura R15.C). Exactamente las pérdidas se produjeron en cuatro animales, dos de cada grupo, siendo los porcentajes de pérdida respecto al peso total igual al 1,96% y 4,2% para los animales del grupo control Tachosil y del 1,13% y 2,57% en el grupo Fr-aNFAH.

La supervivencia de los animales fue del 100% al finalizar el estudio. No se observaron reacciones adversas ni tumoración durante toda la duración del estudio con ninguno de los tratamientos. En general, se observó mayor degradación de los parches Tachosil que de los apósitos Fr-aNFAH después de 40 días (Figura 15.D).



# 5. DISCUSIÓN

A pesar de las continuas mejoras en las técnicas quirúrgicas existentes, la pérdida de sangre en pacientes sometidos a resección hepática o traumatismo hepático sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad perioperatoria (Dokmak et al., 2013). En este contexto, los agentes hemostáticos tópicos se han convertido en una herramienta esencial en los procedimientos quirúrgicos.

En nuestro grupo se ha venido fabricando una lámina de fibrina y agarosa celularizada para su uso en clínica como sustituto de córnea (Miguel González-Andrades et al., 2017) y piel (Arribas-Arribas, 2018) y cuya composición a base de fibrina sugería su potencial uso como agente hemostático sellante de fibrina.

En el desarrollo de esta tesis se ha demostrado la eficacia y seguridad de este hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado (NFAH) como agente hemostático. Inicialmente se realizó la comparación del hidrogel con fibroblastos embebidos en su matriz (c-NFAH) respecto a un agente hemostático sellante ampliamente utilizado, Hemopatch, en un modelo moderado de resección parcial hepática (incisión 0,5 cm). Posteriormente, se amplió el estudio aplicando estos agentes hemostáticos a un modelo severo de resección (incisión 1,5 cm) en el cual se incluyeron dos grupos experimentales más, uno que fue tratado con NFAH sin células (a-NFAH) y otro tratado con un sellante de fibrina, Tachosil. Una vez demostrada la eficacia de los NFAH, se investigó un método de preservación de los apósitos NFAH a medio-largo plazo mediante el uso de bajas temperaturas. Seguidamente, se analizó como afectaba este método de preservación a la eficacia hemostática. Finalmente, se realizó un estudio de seguridad de estos NFAH congelados (Fr-aNFAH) utilizando como grupo control el sellante de fibrina Tachosil.

## **5.1 Estudio preliminar de eficacia hemostática/Modelo moderado**

El estudio preliminar de eficacia hemostática en el modelo moderado de resección hepática demostró una superioridad de c-NFAH respecto al sellante hemostático Hemopatch, con un tiempo de hemostasia significativamente menor. El sencillo procedimiento de aplicación de los NFAH, sin ejercer presión sobre la herida (Figura R3), fue suficiente para alcanzar la hemostasia, lo que supuso una ventaja con respecto al

hemostático comercial. El hecho de no ejercer presión sobre la incisión probablemente está relacionado con la menor formación de hematomas, y podría ser por tanto una explicación a los resultados obtenidos en los porcentajes de presencia de hematomas en los animales sacrificados 24 horas después de la aplicación de los agentes hemostáticos. Las diferencias significativas en el tiempo de hemostasia junto con la ausencia de hematomas en el grupo experimental nos llevaron a profundizar en el potencial hemostático de los NFAH y extender el estudio a un modelo de incisión hepática más severo.

## **5.2 Eficacia hemostática de apósitos NFAH “en fresco”/Modelo severo**

En el modelo severo de resección hepática se incluyeron adicionalmente a los c-NFAH, apósitos NFAH acelularizados (a-NFAH) y los agentes hemostáticos comerciales Tachosil y Hemopatch. Se incorporó a-NFAH para evaluar si la presencia de fibroblastos y las proteínas de matriz generadas por éstos proporcionaba una mejora significativa en la hemostasia (Costa-Almeida et al., 2018; Hou et al., 2015; Krafts, 2010) frente a la hipótesis de que la matriz de NFAH podría explicar la mayor parte del potencial hemostático del apósito. Se incorporó Tachosil para comparar NFAH con un agente hemostático comercial de composición similar. En este segundo análisis, c-NFAH y a-NFAH mostraron un tiempo significativamente menor de hemostasia en comparación con Hemopatch y Tachosil; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre c-NFAH y a-NFAH indicando que la presencia de células no suponía ninguna ventaja en cuanto al potencial hemostático. En nuestro modelo severo de cirugía hepática, se logró una mejor hemostasia utilizando Hemopatch que Tachosil, en línea con un trabajo anterior realizado en un modelo de hepatectomía en conejo (Kevin M. Lewis, Schiviz, Hedrich, Regenbogen, & Goppelt, 2014).

Además del tiempo de hemostasia, se investigaron otros resultados relevantes, como la incidencia de formación de adherencias. A diferencia de los tratamientos Hemopatch y Tachosil, ambos tratamientos con NFAH mostraron una baja incidencia de adherencias gruesas.

Las adherencias quirúrgicas son bandas de tejido cicatrizante fibroso que se une a los tejidos y órganos como consecuencia de la irritación peritoneal por infección o trauma quirúrgico (Gormley et al., 2019). Las adherencias peritoneales representan un importante desafío clínico en cirugía gastrointestinal por ser una causa importante de morbilidad que ocasiona variedad de complicaciones (Arung, Meurisse, & Detry, 2011). Aunque se ha demostrado que el riesgo de adherencias es menor con el uso de parches hemostáticos de uso tópico en comparación con métodos convencionales de hemostasia (Coutinho et al., 2014; Demirel, Basar, Ongoren, Bayram, & Kisakurek, 2008; Kuschel et al., 2013; Nohuz et al., 2009), hay que decir que los biomateriales de estos pueden causar una respuesta inflamatoria en un esfuerzo por eliminarlos o contenerlos (Nissen, Hunter, Schrøder, Rütz, & Bollen, 2017).

Existe controversia sobre los estudios de adherencias en cirugía abdominal. No sólo se desconoce exactamente la fisiopatología de las adherencias peritoneales postoperatorias sino que además, su formación puede producirse en respuesta a otras causas que no están relacionadas directamente con el origen y/o composición del agente hemostático, como pueden ser hemorragia, irritación del peritoneo por prolongada exposición al aire, alteración de la fibrinólisis, respuesta inflamatoria, etc. (Arung et al., 2011).

Nuestros resultados mostraron que los grupos tratados con apósitos NFAH, celularizados o no, presentaban menores adherencias que los agentes hemostáticos comerciales, los cuales mostraron similares resultados entre ellos. Estos resultados coinciden con un estudio de adherencias en cirugía hepática en rata (Nissen et al., 2017) que comparó los agentes hemostáticos Hemopatch, Tachosil y Veriset (parche de celulosa con PEG) sin encontrar diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, otro estudio demostró que Hemopatch presentaba menores adherencias que Veriset (Slezak et al., 2018).

Seguramente, el hecho que los grupos de animales tratados con NFAH generen menor cantidad de adherencias es probablemente consecuencia de una combinación entre su eficacia hemostática y su composición con materiales biocompatibles. Los resultados de inflamación de la anatomía patológica (Figura R10.B) y adherencias encontradas en el sacrificio (Figura R7.A) en los grupos de investigación muestran una relación entre estas variables, situando los apósitos NFAH como los grupos que ocasionan menor respuesta



a cuerpo extraño. Sin embargo, algunos estudios establecen no encontrar relación directa entre respuesta inflamatoria y formación de adherencias (Nissen et al., 2017).

A diferencia de los tratamientos Hemopatch y Tachosil, ambos apósitos NFAH, celularizado y no, mostraron una ausencia completa de formación de hematoma. Estos resultados podrían deberse a una combinación de la rápida adherencia de los apósitos de NFAH, su menor tiempo de hemostasia y su fácil aplicación a la superficie de la herida sin necesidad de ejercer presión. A diferencia de los resultados publicados en un estudio comparativo de hemostasia en conejo (Kevin Michael Lewis, Kuntze, & Gulle, 2015), nuestros resultados mostraron que Hemopatch generaba mayor incidencia de hematomas respecto a Tachosil.

En general, a-NFAH fue superior a los otros grupos experimentales en cuanto a factores inflamatorios, con niveles iguales o inferiores a los encontrados con los productos comerciales. Sin embargo, c-NFAH tenía niveles de CRP más altos que a-NFAH, probablemente debido a la presencia de células. Del mismo modo, a nivel histopatológico, los grupos de tratamiento con NFAH tuvieron grados más bajos de hemorragia, inflamación y necrosis.

### **5.3 Preservación de apósitos NFAH**

A partir de este punto se decidió continuar solamente con los apósitos no celularizados (a-NFAH). El uso de apósitos celularizados (c-NFAH) en el estudio preliminar se debió al potencial de los fibroblastos para favorecer la cicatrización y/o la coagulación debido a la secreción de proteínas extracelulares (Jun & Lau, 2010; Krafts, 2010). Sin embargo, los resultados mostraron que las células no representaban ventaja alguna en cuanto al tiempo de hemostasia, presencia de hematomas, adherencias postoperatorias o niveles de inflamación. De esta forma, al carecer de células, el futuro parche hemostático a base de fibrina y agarosa sería clasificado como un medicamento biológico en lugar de un medicamento de terapias avanzadas (ATMP). Los ATMP difieren de los medicamentos biológicos convencionales por tener una mayor complejidad y un mayor potencial de riesgo con respecto a la seguridad, la calidad y la eficacia (C. K. Schneider et al., 2010). Además las ATMPs tienen requisitos postautorización adicionales como la trazabilidad y

la monitorización de efectos adversos (Regulation (EC) 1394/2007). Por tanto, el uso de hidrogeles de fibrina y agarosa clasificados como medicamentos biológicos disminuiría los costes y facilitaría las condiciones de producción y su traslación a la investigación clínica.

Para el desarrollo industrial de apósitos de fibrina y agarosa es deseable encontrar una forma de almacenamiento que evite su fabricación “en fresco” a demanda inmediata y permitir su uso en cualquier situación de sangrado no previsible como en el área de cirugía de urgencias y traumatismos. Inicialmente se decidió analizar la criopreservación como método de conservación de láminas. De esta forma se comprobaría si la estructura de la malla de fibrina y agarosa sufriría alteraciones bajo esta condición y además se abriría la posibilidad de continuar las investigaciones para una posible futura liofilización de las láminas.

Entre la amplia variedad de agentes crioprotectores utilizados en el campo de la ingeniería tisular, se decidió emplear la trehalosa ya que existían estudios previos que señalaban a este disacárido como un buen agente crioprotector de los hidrogeles de fibrina (Serrato et al., 2009). La trehalosa ha demostrado ser una sustancia segura y tolerable en humanos (Richards et al., 2002) con capacidades bioprotectoras interesantes como estabilizador de proteínas y membranas celulares, disminuyendo el hielo intracelular durante la congelación y previniendo la agregación de proteínas (Bosch et al., 2016). Sin embargo, no está claro el mecanismo crioprotector de la trehalosa existiendo teorías de vitrificación, exclusión preferencial o reemplazo de agua. La teoría de la vitrificación se basa en generar un estado sólido amorfo mediante disminución de la temperatura, produciendo así un estado vítreo transicional sin llegar a cristalizar. Esto produce un aumento de la viscosidad lo que disminuye el movimiento de las moléculas al verse encapsuladas por la matriz vítrea y por tanto estable cuando se expone a cambios de estrés. La teoría preferencial se basa en una competición del agua entre la trehalosa y la proteína. No interactúan entre ellas si no que el agua va a tener preferencia a formar una capa alrededor de la trehalosa. La teoría de reemplazo del agua, donde se piensa que la trehalosa sustituye la capa de agua que hay alrededor de las biomoléculas o proteínas. La primera de las teorías parece ser la más aceptada. (Jain & Roy, 2009).

Las concentraciones de trehalosa utilizadas en este estudio de criopreservación fueron dos: una solución al 0.4M usada previamente en estudios de criopreservación de hidrogeles de fibrina (Serrato et al., 2009); y otra solución al 0.13M, correspondiente a un 5% (peso/volumen), usada con la intención de ampliar el método de preservación a futuros estudios de liofilización con trehalosa (Martín-Banderas et al., 2014). En este estudio, láminas conservadas en solución salina a 4°C fueron consideradas como grupo control ya que estudios de estabilidad desarrollados en nuestro grupo de investigación confirmaban que esta condición es favorable para la preservación de apósitos a corto plazo. Las láminas embebidas en las soluciones de trehalosa y criopreservadas en nitrógeno líquido durante una semana mostraron buenos resultados macroscópicos tras la descongelación en comparación con el control. Sin embargo, los análisis por microscopía óptica y electrónica mostraron mejores resultados con el uso de trehalosa 0.4M, resultando ser la condición más favorable del análisis.

En un estudio posterior de preservación de apósitos, las láminas a-NFAH embebidas en trehalosa 0.4M fueron congeladas y almacenadas a -20°C. De esta forma se pretendía estudiar la estabilidad de las láminas a-NFAH bajo una condición de preservación que fuese accesible a la mayoría de los servicios hospitalarios. No siempre resulta sencillo tener acceso a un tanque de nitrógeno líquido, sin embargo, disponer de un congelador es bastante frecuente. Además, esta condición facilitaría la logística del transporte desde la unidad de producción hasta la unidad hospitalaria solicitante. Los resultados del análisis histológico mostraron que los tres meses de almacenamiento de los Fr-aNFAH a -20°C no produjeron cambios considerables en la macroestructura del hidrogel. Aunque en la microscopía óptica las láminas presentaban algunos orificios (Figura R.12), estos no fueron consecuencia de la congelación ya que también se encontraron en esas mismas láminas antes de la congelación, por lo que podrían haberse ocasionado durante el proceso de producción o durante el procesamiento de las láminas para el análisis microscópico (Morelli, Porazzi, Ruspini, Restelli, & Banfi, 2013). Además, la microscopía electrónica de estas láminas tras la congelación (Figura R.13) mostró que la estructura de la malla de fibrina y agarosa se mantuvo similar a los controles en fresco.

Las próximas investigaciones de preservación de apósitos irán encaminadas hacia la obtención de un producto liofilizado preferiblemente al criopreservado. La liofilización

se basa en un fenómeno de sublimación, en el cual el disolvente congelado pasa directamente a vapor bajo presión reducida. Esta técnica se utiliza para secar compuestos orgánicos o inorgánicos evitando así los cambios biológicos y químicos que se producen en la fase líquida (Erber & Lee, 2015). El uso de la liofilización concedería las ventajas, entre otras, de disponer de un método de conservación largo, impedir la alteración de productos termolábiles, mantener una humedad reducida y permitir una reconstitución rápida que recupere la estructura y propiedades originales (Wolkers & Walker, 2015). Aunque la liofilización conllevaría la reconstitución de los apósitos NFAH deshidratados, el tiempo para esta acción sería menor al proceso de descongelación de los apósitos criopreservados y posiblemente la estabilidad sería mayor. En la actualidad, ya hay investigaciones en el desarrollo de apósitos NFAH liofilizados existiendo una patente por parte de la empresa HistoCell, S.L. para Europa, Australia y Japón (Número de publicación internacional WO2016062862).

#### **5.4 Eficacia hemostática de apósitos NFAH preservados**

Para el estudio de eficacia de los apósitos Fr-aNFAH se utilizó como grupo control apósitos a-NFAH en fresco. Este grupo a-NFAH control mostró resultados similares a los obtenidos previamente en el estudio comparativo de *Eficacia hemostática de apósitos NFAH "en fresco"/modelo severo*, sin diferencias significativas en el tiempo de hemostasia ( $p$  valor = 0.1045) ni presencia alguna de hematomas. Si es cierto, que en este caso se encontraron algunas adherencias postoperatorias gruesas que no se detectaron en el estudio anterior. Esta diferencia podría deberse al uso de plasmas procedentes de diferentes donantes para la fabricación de los a-NFAH (Y. Liu et al., 2015).

De la comparación del grupo control de animales tratados con a-NFAH en fresco y el grupo tratado con Fr-aNFAH, se deduce que la congelación no afectó significativamente el tiempo de hemostasia (a-NFAH en fresco:  $4.75 \pm 1.2$  segundos; Fr-aNFAH:  $4.2 \pm 1.2$  segundos). Sin embargo, se detectaron hematomas a las 24 horas en un 20% de los animales tratados con Fr-aNFAH, circunstancia que no se dio en los animales tratados con NFAH en fresco. No obstante, este porcentaje siguió siendo menor al presentado por Tachosil y Hemopatch en estudios previos con sacrificios a 24 horas. Además, los Fr-

aNFAH no presentaron adherencias gruesas, a diferencia de los a-NFAH en fresco. Estas diferencias en adherencias entre grupos Fr-aNFAH y a-NFAH podrían ser por la presencia residual de trehalosa en los apósitos Fr-aNFAH, aunque se ha demostrado que ésta no afecta la dinámica de coagulación (Erber & Lee, 2015).

El conjunto de resultados obtenidos pone de manifiesto que la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  es un método de preservación de apósitos capaz de mantener la estructura tridimensional de la malla de fibrina y agarosa sin afectar la eficacia hemostática, manteniendo un porcentaje de presencia de hematomas y adherencias peritoneales mejor que el hemostático comercial Tachosil.

## **5.5 Seguridad de apósitos NFAH a largo plazo**

Para el estudio de seguridad, se comparó el estado de los animales tratados con Fr-aNFAH y Tachosil a aproximadamente una semana y un mes tras el tratamiento. Tachosil se utilizó como grupo control por ser un agente hemostático comercial ampliamente utilizado en la práctica clínica y poseer una composición similar. Cabe destacar que en esta ocasión la fabricación de los Fr-aNFAH se hizo con una mezcla de plasmas de tres donantes diferentes, lo que hacía la muestra más homogénea y representativa.

En este estudio de seguridad, la superior eficacia hemostática de los apósitos NFAH fue revalidada. El tiempo medio de hemostasia entre los grupos Fr-aNFAH y Tachosil no solamente fue significativamente diferente, sino que además dicha diferencia coincidió con los resultados obtenidos en experimentos anteriores. Es decir, no hubo diferencias significativas entre grupos de animales tratados con el mismo hemostático ( $p$  valor = 0.90 para Fr-aNFAH y  $p$  valor = 0.19 para Tachosil; no mostrado en resultados).

No se observó presencia alguna de hematomas en ninguno de los dos grupos a diferencia de lo encontrado en los estudios anteriores. La razón de esta observación es que los animales fueron sacrificados al octavo y cuadragésimo día, por lo que probablemente si se hubiera producido un hematoma, éste habría desaparecido por el rápido metabolismo de la rata.

El grado de adherencias postoperatorias fue igual entre Fr-aNFAH y Tachosil, con un 100% de los animales presentando adherencias gruesas 8 días después del tratamiento; porcentaje que se redujo al 80% a los 40 días después del tratamiento. En los estudios anteriores habíamos determinado que un 50% de los animales tratados con Tachosil presentaba adherencias gruesas a las 24h post-tratamiento frente a un 0% de los tratados con Fr-NFAH. Probablemente, 24 horas postoperatorias no fuera tiempo suficiente para comprobar la completa formación de adherencias, aunque si podría considerarse predictivo. Sería deseable la evaluación de los animales durante un mayor tiempo para determinar si las adherencias se resuelven de la misma manera en ambos grupos. Además, es relevante mencionar las limitaciones de la graduación semicuantitativa utilizada. En este estudio, las adherencias se contemplaron en un rango de 0 a 2, mientras que otros estudios de adherencias en cirugía hepática siguieron una categorización de mayor rango (Nissen et al., 2017; Shimizu et al., 2014; Slezak et al., 2018; Suárez-Grau et al., 2016). En las observaciones hechas durante los sacrificios realizados en la prueba de seguridad, se vislumbró que el uso de un tipo de graduación más amplia habría permitido determinar posiblemente una diferencia entre grupos, favorable para el grupo Fr-aNFAH.

El seguimiento de temperatura y peso corporal durante la prueba de seguridad mostró valores dentro de la normalidad. Ninguno de los animales tuvo fiebre manteniendo siempre la temperatura corporal por debajo de los 38,5°C (Zúñiga & Muriana, 2016). Las temperaturas medias de los grupos durante la prueba de seguridad se mantuvieron entre un rango de 36.19-37.24 °C. Aunque existieron fluctuaciones entre diferentes días, esta diferencia fue similar entre grupos, por lo que probablemente se debiera a pequeños cambios en la temperatura del animalario, del horario de medición o del operador que tomase la temperatura (según la profundidad rectal con la que se introdujese la sonda del termómetro). De cualquier forma, la temperatura de los animales tratados con Fr-aNFAH se mantuvo levemente por debajo del grupo Tachosil.

Lo mismo ocurrió de manera inversa con el incremento del peso corporal. Aunque durante la primera semana se produjo un incremento menor de peso con incluso algunas pérdidas, seguramente efecto de la cirugía (Andersen et al., 2013), el aumento de peso en los dos grupos fue progresivo y dentro de la norma (Charles River, 2016;

Cossio-Bolaños, Gómez Campos, Vargas Vitoria, Tadeu Hochmuller Fogaça, & de Arruda, 2013; Janvier Labs, 2020). Sin embargo, este aumento fue algo mayor en el grupo Fr-aNFAH. Estos resultados de menor temperatura y mayor incremento de peso podrían ser indicativos de una mejor respuesta al tratamiento en los animales tratados con Fr-aNFAH frente a los tratados con Tachosil.

Los resultados obtenidos hasta ahora permiten afirmar que los apósitos de fibrina y agarosa presentan un perfil de seguridad en cirugía hepática similar al presentado por el sellante de fibrina comercial Tachosil, incluso con ventajas observadas en los resultados a 24 horas (Tabla D1). Sin embargo, resulta necesario seguir investigando la seguridad a más largo plazo para analizar la evolución de las adherencias postoperatorias y las posibles reacciones inmunológicas que pudiesen presentar.

## **5.6 Biocompatibilidad y Biodegradabilidad de NFAH**

Dos características necesarias de los hidrogeles son su biocompatibilidad y biodegradabilidad (El-Sherbiny 2013). Los apósitos NFAH están compuestos por dos biomateriales naturales, una proteína (fibrina) y un polisacárido (agarosa), que despiertan especial interés al poseer propiedades similares a las matrices extracelulares naturales, y por tanto, es esperable una mayor biocompatibilidad y biodegradabilidad.

La biocompatibilidad es la capacidad de un material a producir la mínima respuesta inmunológica, tóxica y a cuerpo extraño en un hospedador tras su aplicación. La biocompatibilidad de los apósitos NFAH ha sido demostrada previamente en modelos animales en piel (Víctor Carriel et al., 2012), nervio periférico (Víctor Carriel et al., 2013) y mucosa oral (Fernández-Valadés-Gámez et al., 2016). Aun así, sería necesario analizar en profundidad la biocompatibilidad de los polímeros de estos apósitos en cirugía hepática para su traslación a la clínica. Por ello, experimentos futuros irán encaminados a estudiar la respuesta inmunológica y posibles efectos tóxicos de los NFAH a más largo plazo (tres-seis meses) tras su aplicación sobre la superficie hepática sangrante.

Aunque no haya sido categorizada, la biodegradabilidad de los apósitos de fibrina y agarosa en animales tras cuarenta días fue menor que la del parche Tachosil. La compactación de la matriz tras la nanoestructuración y la presencia adicional de agarosa

PRODUCTO	EFICACIA	SEGURIDAD				FORMA DE APLICACIÓN	COSTES
NFAH	<b>Apósitos en fresco *</b> T hemostasia = 3,37 ± 0.62 seg	<b>A 24 HORAS</b>				El apósito se descongeló a temperatura ambiente y se aplicó con ayuda de una pinzas, dejándolo caer sobre la herida sin ejercer presión.	0,44 €/cm <sup>2</sup>
		Hematoma	20%	Hemorragia	A:40% L:30% M:20% S:10%		
		Adhesiones	A:20% D:80% G:0%	Inflamación	A:0% L:0% M:100% S:0%		
		CRP	749 µg/mL	Necrosis	A:10% L:50% M:40% S:0%		
		IL-1β	220 pg/mL				
		TNF-α	2,18 pg/mL				
		<b>A 8 DÍAS</b>		<b>A 40 DÍAS</b>			
	<b>Apósitos preservados**</b> T hemostasia = 4.1 ± 0.3 segundos	Hematoma	0%	Hematoma	0%		
		Adhesiones	A:0% L:0% G:100%	Adhesiones	A:20% L:0% G:80%		
		Tª media	36,5 ± 0,19 °C	Tª media	36,6 ± 0,16 °C		
		Δ Peso corporal	3,87%	Δ Peso corporal	39,30%		
Tachosil	<b>Apósitos en fresco***</b> T hemostasia = 9.68 ± 1.07 seg	<b>A 24 HORAS</b>				El parche se humedeció en solución salina por no más de un minuto. Se aplicó ejerciendo presión con ayuda de una gasa para evitar adherirse a los guantes.	6,03 €/cm <sup>2</sup>
		Hematoma	40%	Hemorragia	A:50% L:20% M:20% S:10%		
		Adhesiones	A:0% D:50% G:50%	Inflamación	A:0% L:10% M:50% S:40%		
		CRP	650 µg/mL	Necrosis	A:0% L:10% M:80% S:10%		
		IL-1β	199 pg/mL				
		TNF-α	2,73 pg/mL				
		<b>A 8 DÍAS</b>		<b>A 40 DÍAS</b>			
		Hematoma	0%	Hematoma	0%		
		Adhesiones	A:0% L:0% G:100%	Adhesiones	A:20% L:0% G:80%		
		Tª media	36,6 ± 0,21 °C	Tª media	36,7 ± 0,18 °C		
		Δ Peso corporal	0,76%	Δ Peso corporal	33,90%		
Hemopatch	<b>Apósitos en fresco</b> T hemostasia = 9.8 ± 1.02 segundos	<b>A 24 HORAS</b>				El parche se aplicó seco, ejerciendo presión con ayuda de una gasa e irrigándolo con suero fisiológico para no desplazar el parche al retirar la presión.	5,92 €/cm <sup>2</sup>
		Hematoma	70%	Hemorragia	A:20% L:27% M:20% S:33%		
		Adhesiones	A:0% D:30% G:70%	Inflamación	A:0% L:0% M:67% S:33%		
		CRP	797 µg/mL	Necrosis	A:7% L:20% M:73% S:0%		
		IL-1β	374 pg/mL				
		TNF-α	1,91 pg/mL				

**Tabla D1. Resumen comparativo de eficacia, seguridad, forma de aplicación y costes.** La tabla recoge resultados obtenidos en esta tesis para los hemostáticos NFAH, Tachosil y Hemopatch. La eficacia hemostática (tiempo medio de hemostasia ± SEM) es la media de todos los experimentos realizados en las mismas condiciones con \*a-NFAH (N=17), \*\* Fr-aNFAH (N=20) y \*\*\* Tachosil (N=20) durante esta tesis. Los datos de los factores de inflamación (CRP, IL-1β y TNF-α) y anatomopatología (hemorragia, inflamación y necrosis) a 24 horas de Fr-aNFAH son los obtenidos para este hemostático antes de la preservación. A: Ausente; D: Delgada; G: Gruesa; L: Leve; M: Moderada; S: Severa.



respecto al Tachosil posiblemente hagan que los apósitos NFAH requieran de un tiempo adicional para su completa absorción. Aunque la biodegradabilidad del hidrogel de fibrina y agarosa ha sido confirmada anteriormente en su aplicación como sustituto de piel (Victor Carriel et al., 2012), resulta necesario realizar un análisis a más largo plazo en cirugías intra-abdominales.

## **5.7 Propiedades Biomecánica de hidrogeles NFAH**

La fibrina es un polímero altamente extensible, lo que significa que bajo presión tiende más a estirarse que a romperse. Posee dos propiedades reológicas clave, la viscosidad (o plasticidad) y la elasticidad (o rigidez), que pueden condicionar procesos biológicos. Por ejemplo, las plaquetas son capaces de reconocer un incremento de la rigidez de las fibras de fibrina sobre las que reposan respondiendo con una mayor activación, adhesión y propagación plaquetaria (Qiu et al., 2014). Las propiedades viscoelásticas de los apósitos de fibrina y agarosa podrían por tanto modificarse para conferirle características deseadas de resistencia y aplicabilidad. El grado de nanoestructuración, la combinación con otros polímeros y el uso de factores de entrecruzamiento son algunas de estas posibles modificaciones.

El grado de nanoestructuración refuerza las propiedades biomecánicas de la malla de fibrina y agarosa por las uniones generadas (Ionescu et al., 2011) disminuyendo a su vez el tamaño de poro de la red. Esto podría disminuir el tiempo de hemostasia (Qiu et al., 2014) aunque a su vez podría afectar negativamente a procesos como la difusión proteica, la migración y la proliferación celular (De la Puente & Ludeña, 2014). Teniendo en cuenta estas premisas, se podrían realizar modificaciones biomecánicas con agentes químicos de entrecruzamiento para producir una mayor compactación de las fibras y un aumento de la elasticidad. Es el caso del principal factor estabilizador de la fibrina FXIII (Kurniawan, Grimbergen, Koopman, & Koenderink, 2014) y de otros agentes de entrecruzamiento de proteínas tales como la genipina (Dare et al., 2009).

La combinación de biomateriales resulta una herramienta muy útil cuando se buscan propiedades biomecánicas específicas. En los apósitos NFAH, la agarosa confiere una resistencia al andamio que evita su rotura durante su manipulación y aplicación

(Zarrintaj et al., 2018). Sin embargo, un cambio de concentración o sustitución de este polímero en los apósitos NFAH podría otorgarles características más atractivas. Por ejemplo, podría combinarse con colágeno, un biomaterial resistente y biodegradable comúnmente utilizado en ingeniería de tejidos y que posee propiedades hemostáticas que favorecen la agregación plaquetaria y la desgranulación (Ruggeri & Mendolicchio, 2007).

Por todo lo mencionado anteriormente, existe una amplia variedad de herramientas que posibilitan realizar mejoras en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y las propiedades biomecánicas de los apósitos NFAH para su aplicación como agente hemostático en cirugía hepática.

Debemos mencionar que, además de la fibrina, otros agentes utilizados en la formulación podrían contribuir al efecto hemostático del apósito NFAH. El ácido tranexámico es un fármaco de acción antifibrinolítica utilizado con éxito para reducir la pérdida de sangre en varios tipos de cirugía (Meng, Pan, Xiong, & Liu, 2018; Queiroz et al., 2018; Suh, Kyung, Han, Cheong, & Lee, 2018; Zilinsky et al., 2019). Sin embargo, el contenido final de ácido tranexámico en el NFAH (1.6% o 8.3 mg) es bastante bajo en comparación con las concentraciones utilizadas para su uso tópico (100–500 mg) o por vía intravenosa (1 g). Del mismo modo, el cloruro cálcico acelera la polimerización de fibrina y la formación de coágulos (Brass, Forman, Edwards, & Lindan, 1978), y aunque se usa para estabilizar la matriz, no podemos excluir que el efecto hemostático de los apósitos NFAH se vea reforzado por la presencia de calcio.

## **5.8 Modelo Animal**

En este estudio se eligió la rata como modelo experimental, principalmente debido a su fácil disponibilidad y manejo, logística y bajo coste. En el estudio de hemostasia se utilizaron ratas macho adultas para evitar variaciones en la hemostasia sujeta a cambios hormonales (Kuhl, 1996) y las diferencias en microcirculación (Yahanda, Paidas, & Clemens, 1990).

Nuestro modelo de resección hepática, incluidas las variables estudiadas, es muy similar a otros modelos de hepatectomía parcial publicados anteriormente en rata (Coutinho

et al., 2014; Dowling et al., 2015; Henderson et al., 2010; Schmiedt, Köhler, & Brainard, 2012). La mayor diferencia reside en el porcentaje de hígado resecado. En nuestro caso supone una masa estimada del 1-5% (datos no mostrados) del peso total del hígado de la rata en comparación con otros modelos de resección hepática donde se alcanza hasta el 90% (Madrahimov, Dirsch, Broelsch, & Dahmen, 2006). Aun así, teniendo en cuenta que el problema clínico a resolver es la hemostasia, consideramos idóneo el modelo utilizado. Resulta de mayor relevancia para nuestro estudio el área de laceración obtenida con una única incisión que el volumen de hígado extirpado, más utilizado para estudios de regeneración hepática.

En cualquier caso, el modelo quirúrgico desarrollado en esta tesis puede no ser predictivo del uso clínico en humanos principalmente porque la extrapolación de los resultados puede verse limitada por la diferencia anatómica y el rápido metabolismo del hígado de la rata (Jimenez-Castro et al., 2013). Por ello, en futuros experimentos se valorará el uso de otros modelos animales donde la anatomía del hígado sea más similar a la humana (conejo, cerdo, etc.). Sin embargo, el modelo de rata establecido en esta tesis permite una evaluación estandarizada de nuestro hidrogel y de otros agentes hemostáticos disponibles comercialmente.

Actualmente, se está desarrollando un ensayo de potencia *in vitro* para la fase de comercialización, que permita el control de la eficiencia hemostática de los lotes de apósitos producidos sin necesidad de utilizar animales para ello.

## **5.9 Impacto económico y Desarrollo tecnológico**

Se prevé que el mercado de los agentes hemostáticos y sellantes crecerá a una tasa anual de crecimiento compuesto (CAGR, en inglés) del 8,7% hasta el año 2026, estando valorado en 2018 en 5.350 millones de dólares (Grand View Research, 2019). Este crecimiento en este mercado se debe principalmente a factores sociales y económicos, como el aumento de la población geriátrica, lo que conlleva a su vez un aumento en la incidencia de enfermedades crónicas y una creciente demanda de procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, aunque ya existen parches hemostáticos de uso tópico en el mercado, entre los que destacan los sellantes de fibrina derivados de plasma humano

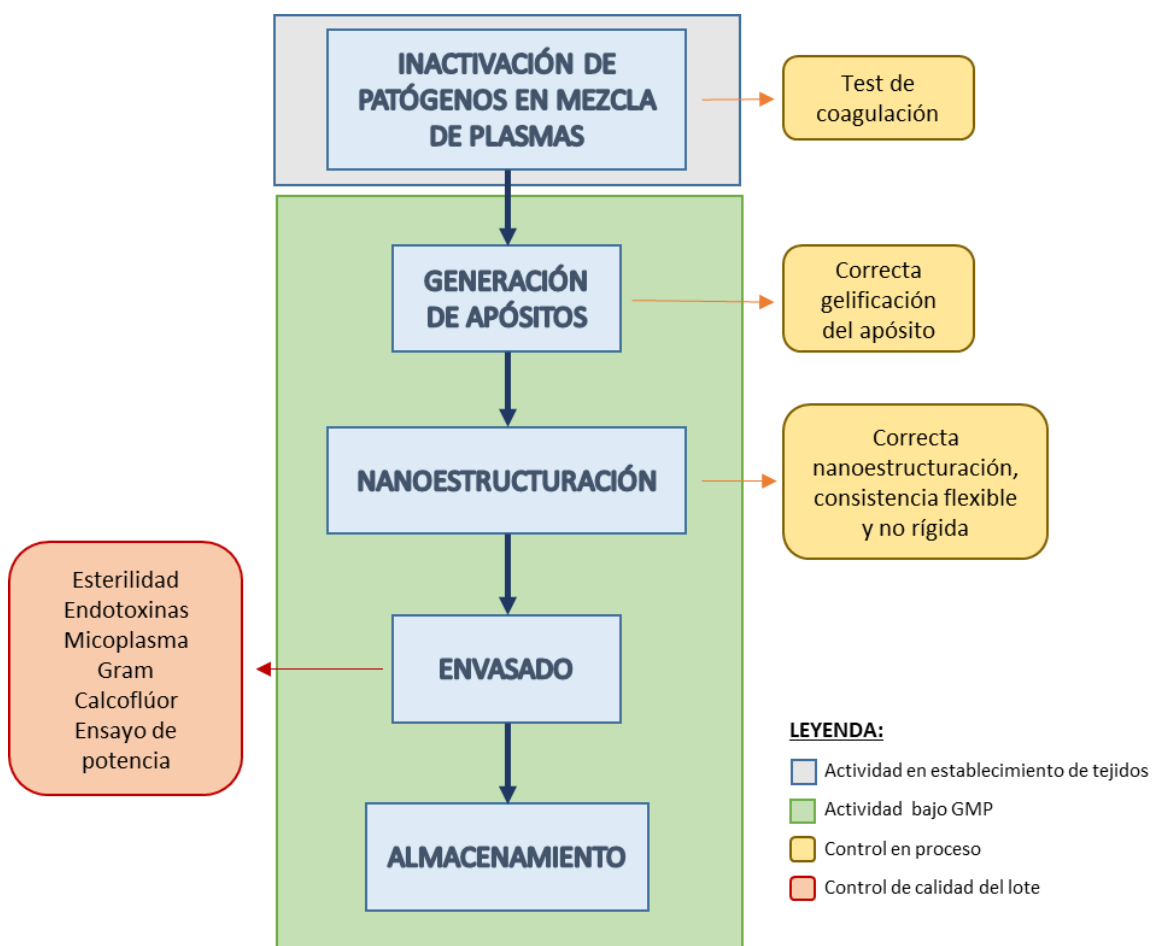
por su capacidad de imitar y promover el paso final de la cascada de coagulación (Boonstra, Molenaar, Porte, & De Boer, 2009; Mankad & Codispoti, 2001), la idoneidad hemostática general en términos de eficacia, aplicabilidad, ausencia de resangrado y/o formación de adherencias no deseadas deja un considerable espacio de mejora (W. Spotnitz, 2014). En este sentido, el apósito de fibrina y agarosa nanoestructurada resulta ser un excelente hemostático capaz de reducir los tiempos de hemostasia a la vez que mejora la respuesta inflamatoria y tisular.

Según datos obtenidos del Informe Anual del SNS 2017, en España se realizaron aproximadamente unas 600.000 cirugías programadas, y más de 5.000 trasplantes de órgano sólido en España (ONT,2017). En cualquiera de estos procedimientos puede ocurrir un sangrado susceptible de ser controlado con a-NFAH. De esta forma, este producto innovador podría suponer un beneficio terapéutico ya que la disminución en el tiempo de hemostasia conllevaría una reducción en el tiempo de la cirugía, evitándose así mayores pérdidas sanguíneas y la necesidad de recibir posteriores transfusiones. Además, a-NFAH facilitaría la labor de los cirujanos gracias a sus propiedades biomecánicas que facilitan su manejo y uso, al no necesitar reconstitución, manejo previo a la aplicación o presión sobre la herida como otros agentes comerciales.

Una de las grandes ventajas que nuestro grupo de investigación tiene para la transición hacia la fase clínica es que la fabricación de los apósitos NFAH como agentes hemostáticos puede realizarse de forma inmediata en nuestras instalaciones. Actualmente, contamos con una sala blanca acreditada por la AEMPS para la fabricación de apósitos NFAH bajo normas de correcta fabricación (GMP), los cuales se vienen utilizando para el tratamiento compasivo de grandes quemados en la Unidad de Cirugía Plástica y Grandes Quemados del HUVR. La figura D1 muestra el diagrama de flujo del proceso productivo de los apósitos NFAH como agentes hemostáticos que se llevaría a cabo en nuestra sala.

Según cálculos tentativos de costes realizados, los costes de producción de cada lámina de fibrina y agarosa (12x12cm) serían de 63,88 euros y de 0,44 euros/cm<sup>2</sup>. Este coste es muy bajo teniendo en cuenta que el producto más usado actualmente (Tachosil) tiene un coste aproximado de 275 euros y unas medidas de 9,5 x 4,8 cm, por lo que el cm<sup>2</sup> del producto tiene un coste aproximado de 6,03 euros. En el caso de Hemopatch el precio

por cm<sup>2</sup> del producto es también parecido, 5,92 euros. Según datos aportados por la industria, se consumen anualmente más de 5.000 unidades de hemostáticos por lo que usando nuestro producto podremos conseguir un ahorro del 92,7% con respecto al coste de Tachosil en un entorno hospitalario.



**Figura D1. Diagrama de flujo del proceso productivo de los apósitos de fibrina y agarosa**

En la última década los Centros de Transfusión Sanguínea y de tejidos han ido incrementando su actividad asistencial de manera progresiva y en consonancia con los avances científicos, integrando en la actualidad tecnologías y desarrollos punteros. Según datos del Sistema Nacional de Seguridad Transfusional en España, en 2017 se produjo un excedente de plasma no utilizado de 370.336 litros. Por este motivo, la posibilidad de reutilización de este excedente para la fabricación de apósitos de fibrina y agarosa supondría un considerable ahorro de costes para el SNS. Por el contrario, la

fabricación de apósitos se realiza con plasma sanguíneo de grupo AB negativo, el cual se encuentra en España en el 0,5% de la población, lo que podría representar un problema en la producción a gran escala.

Una de las principales preocupaciones en el uso de derivados de mezclas de plasma sanguíneo es la posibilidad de transmisión de enfermedades (Allain, 1998; Burnouf & Radosevich, 2000; Di Minno et al., 2016; Horowitz & Ben-Hur, 1995; Vrieling & Reesink, 1998). La reciente declaración de pandemia por parte de la OMS del llamado SARS-CoV-2 o COVID-19 ha ocasionado una disminución considerable en el número de donaciones y supone una incertidumbre en el uso de derivados sanguíneos (Chang, Yan, & Wang, 2020). La falta de datos conclusivos sobre el riesgo de las donaciones sugiere tomar ciertas medidas preventivas que eviten una potencial transmisión del virus (World Health Organization, 2020).

La Comisión Europea junto con el Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) ha publicado una guía con unas directrices no vinculantes para los países miembros, la “Guidance on collection, testing, processing, storage, distribution and monitored use” (European Commission, 2020). Aunque esta guía se ha realizado con el objetivo de establecer unos criterios mínimos de seguridad y calidad para la obtención de plasma proveniente de donantes convalecientes del COVID-19, resultaría de utilidad trasladar gran parte de sus indicaciones a las donaciones convencionales. Por ejemplo, la inactivación/reducción de patógenos como medida de seguridad adicional reduciría el riesgo teórico de transmisión debido a la sensibilidad del coronavirus a los sistemas actuales de inactivación. Además, si para la fabricación futura de apósitos NFAH se pretende utilizar una mezcla de plasma de un alto número de donantes, la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) en su capítulo 5.2.12 indica la obligación de inactivar o eliminar los virus.

Nuestro grupo dispone de un equipo de inactivación de patógenos en plasma por ultravioleta (Keil et al., 2020) que actualmente se está utilizando en un ensayo clínico multicéntrico para evaluar la eficacia del tratamiento con plasma hiperinmune obtenido de donantes convalecientes de la infección por COVID-19. Por lo que, teniendo en cuenta las directrices de la ECDC y la Ph. Eur., todos los plasmas serán inactivados para su posterior uso en la fabricación de apósitos de fibrina y agarosa.

La entrada en el mercado de un parche hemostático como el que se ha presentado en esta tesis, más eficaz, elástico, resistente, seguro, fácil de aplicar, y con un coste más competitivo para el SNS (Tabla D.1), conllevaría una considerable mejora e innovación terapéutica con respecto a lo que se lleva desarrollando en la práctica habitual. Además, actualmente estamos trabajando para asegurar su traslación clínica e implementación hospitalaria gracias a la colaboración de médicos, hospitales y entidades de maduración tecnológica del SSPA, y de una tecnología protegida bajo patente (P201830346) con plan de explotación propio. Adicionalmente, se prevé la transferencia a una empresa, aunque la fabricación para los ensayos de fase 1 se haría en nuestra sala.

El alcance terapéutico del uso de productos con fibrina y agarosa abarca un amplio abanico de aplicaciones en desarrollo por este y otros equipos investigadores: ensayo clínico de córnea (NCT01765244), uso asistencial de piel artificial como cobertura en pacientes gran quemados y otros usos en fase preclínicas (lesiones de nervio periférico, fisura palatina, fístulas biliares, etc.); lo que pone de manifiesto el nivel de desarrollo y la capacidad de diversificación de la tecnología. De esta forma, los apósitos NFAH podrían utilizarse en el futuro en múltiples disciplinas quirúrgicas más allá del tratamiento hemostático de hemorragias hepáticas. Igualmente, sería interesante estudiar si comparten propiedades sellantes con otros productos de fibrina tales como el Tachosil, indicado para prevenir pérdidas de líquido cefalorraquídeo. Nuestro grupo está actualmente realizando investigaciones sobre su uso como sellante en anastomosis colorrectal. Además, los apósitos NFAH no incrementan su volumen tras la aplicación a diferencia de muchos otros agentes hemostáticos. Es por ello que actualmente se trabaja en el diseño de un aplicador de los apósitos NFAH para cirugía laparoscópica.

Los hemostáticos tópicos son apreciados por cirujanos hepáticos y los más reconocidos parecen ser los sellantes de fibrina (Boonstra et al., 2009). Aunque existe cierto escepticismo sobre su eficacia por parte de algunos, éste podría residir en la falta de formación y/o experiencia que les lleva a aplicarlos incorrectamente, por ejemplo, usándolos para sustituir técnicas quirúrgicas como la sutura o, aun cuando corresponde, no aplicar dichos agentes con la presión y duración de tiempo requeridos. Es por ello que en ocasiones resulta complejo determinar la eficacia hemostática aún intentado establecer unos estándares clínicamente válidos (Brustia, Granger, & Scatton, 2016).

Además, existen dos grandes debilidades que caracterizan los estudios de agentes hemostáticos de uso tópico. Por un lado, el conflicto de intereses de la mayoría de los estudios al encontrarse financiados por las compañías farmacéuticas y, por otro lado, la heterogeneidad de los intervenciones y grupos control entre ensayos clínicos aleatorios de cirugía hepática (Brustia, Granger, & Scatton, 2016).

Como se mencionó, hasta la fecha no existe un agente hemostático óptimo, y el sangrado quirúrgico no controlado sigue siendo una necesidad clínica insatisfecha. Cualquier mejora en términos de reducción del tiempo de hemostasia y / o resangrado, junto con la facilidad de uso y aplicabilidad, mejora de respuesta inflamatoria y tisular, podría representar un gran impacto no sólo en los costes hospitalarios sino también en la calidad de vida de los pacientes.

En esta tesis se ha mostrado que un apósito compuesto por un hidrogel de fibrina y agarosa tipo VII nanoestructurado tiene excelentes propiedades hemostáticas, y posee ventajas como su biocompatibilidad, propiedades biomecánicas y bajo coste, y creemos que estos resultados allanarán el camino para que este nuevo producto sea parte del arsenal de agentes hemostáticos usados en múltiples procedimientos quirúrgicos en el futuro.

## **5.10 Prospectivas futuras**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la discusión de esta tesis, los trabajos futuros deben de ir orientados en:

1. Investigar la biocompatibilidad y biodegradabilidad de los NFAH a más largo plazo.
2. Analizar la estabilidad del apósito para establecer una caducidad.
3. Búsqueda de un formato de producto presumiblemente más estable a largo plazo. Para ello podría estudiarse si la liofilización de apósitos es capaz de mantener la eficacia hemostática sin renunciar a sus propiedades biomecánicas. De este modo se facilitaría aún más su logística y almacenamiento.



4. Analizar la eficacia y seguridad de los apósitos NFAH en otros modelos experimentales, usando un modelo animal clínicamente más relevante que permita superar algunas limitaciones encontradas, posibilitar una mayor extrapolación de resultados y permitir una comparación más fiable de nuestros resultados con estudios previos.
5. El desarrollo de un modelo in vitro de hemostasia. Esto permitiría dejar de utilizar animales en estudios futuros de eficacia hemostática y disponer de una herramienta de control de calidad tras la fabricación.
6. La fabricación de apósitos NFAH combinados con otros biomateriales que favorezcan la hemostasia, como puede ser el caso de polímeros como el colágeno o la fibronectina.



# **6. CONCLUSIONES**

1. El hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado (NFAH) puede ser utilizado como un parche hemostático eficaz y seguro para el tratamiento de hemorragias en cirugía hepática.
2. Los apósitos NFAH, celularizados (c-NFAH) o no (a-NFAH), tuvieron mayor eficacia hemostática respecto a los hemostáticos comerciales Hemopatch y Tachosil.
3. Los animales tratados con apósitos NFAH presentaron una respuesta tisular e inflamatoria favorable, en ocasiones mejor a la presentada por animales tratados con los agentes comerciales Hemopatch y Tachosil.
4. De forma global, el apósito a-NFAH resultó ser el mejor agente hemostático del estudio.
5. La congelación resultó ser un método adecuado de preservación que mantuvo la estructura tridimensional del apósito a-NFAH.
6. Los apósitos a-NFAH congelados (Fr-aNFAH) resultaron ser eficaces y seguros para su uso como agente hemostático en cirugía hepática.

# **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Abou Neel, E. A., Cheema, U., Knowles, J. C., Brown, R. A., & Nazhat, S. N. (2006). Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties. *Soft Matter*, 2(11), 986–992. <https://doi.org/10.1039/b609784g>
- Alaminos, M., Garzón, I., Sánchez-Quevedo, M. C., Moreu, G., González-Andrades, M., Fernández-Montoya, A., & Campos, A. (2007). Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(5), 350–359. <https://doi.org/10.1002/term.38>
- Alaminos, Miguel, Sánchez-Quevedo, M. D. C., Muñoz-Ávila, J. I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., & Campos, A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(8), 3311–3317. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1647>
- Allain, J.-P. (1998). Emerging Viruses in Blood Transfusion. *Vox Sanguinis*, 74(S2), 125–129. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1998.tb05409.x>
- Andersen, K. J., Knudsen, A. R., Kannerup, A. S., Sasanuma, H., Nyengaard, J. R., Hamilton-Dutoit, S., ... Mortensen, F. V. (2013). The natural history of liver regeneration in rats: Description of an animal model for liver regeneration studies. *International Journal of Surgery*, 11(9), 903–908. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2013.07.009>
- Annabi, N., Tamayol, A., Uquillas, J. A., Akbari, M., Bertassoni, L. E., Cha, C., ... Khademhosseini, A. (2014). 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 26(1), 85–124. <https://doi.org/10.1002/adma.201303233>
- Arribas-Arribas, B. . B. F. R. C.-C. M. M.-L. M. M. M. A. M. B.-G. G. C. M. S. G. (2018). Characterization of nanostructured fibrin-agarose hydrogels with fibroblasts for burn treatment. *Poster Presented at the ISCT Europe 2018 Regional Meeting Program*.
- Arung, W., Meurisse, M., & Detry, O. (2011). Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World Journal of Gastroenterology*, 17(41), 4545–4553. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i41.4545>
- Bergel, S. (1909). Ueber Wirkungen des Fibrins. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 35(15), 663–665. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1201395>
- Bitar, M., Salih, V., Brown, R. A., & Nazhat, S. N. (2007). Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(2), 237–244. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0685-1>
- Blajchman, M. A. (2003). Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 1(7), 1637–1641. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871300>
- Boonstra, E. A., Molenaar, I. Q., Porte, R. J., & De Boer, M. T. (2009). Topical haemostatic

agents in liver surgery: do we need them?h pb\_065 306..310.  
<https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2009.00065.x>

- Bosch, S., De Beaurepaire, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chrétien, D., ... Bach, J. M. (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36162>
- Brass, E. P., Forman, W. B., Edwards, R. V, & Lindan, O. (1978). Fibrin formation: effect of calcium ions. *Blood*, 52(4), 654–658. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/687825>
- Brennan, S. O., Davis, R. L., Mosesson, M. W., Hernandez, I., Lowen, R., & Alexander, S. J. (2007). Congenital hypodysfibrinogenaemia (Fibrinogen Des Moines) due to a gamma320Asp deletion at the Ca<sup>2+</sup> binding site. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(2), 467–469. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721633>
- Brown, L. F., Lanir, N., McDonagh, J., Tognazzi, K., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (1993). Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *American Journal of Pathology*, 142(1), 273–283.
- Brown, R. A., Wiseman, M., Chuo, C.-B., Cheema, U., & Nazhat, S. N. (2005). Ultrarapid Engineering of Biomimetic Materials and Tissues: Fabrication of Nano- and Microstructures by Plastic Compression. *Advanced Functional Materials*, 15(11), 1762–1770. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500042>
- Brustia, R., Granger, B., & Scatton, O. (2016). An update on topical haemostatic agents in liver surgery: systematic review and meta analysis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jhbp.389>
- Burnouf, T., & Radosevich, M. (2000, June 1). Reducing the risk of infection from plasma products: Specific preventative strategies. *Blood Reviews*, Vol. 14, pp. 94–110. <https://doi.org/10.1054/blre.2000.0129>
- Butler, F. K., & Blackburne, L. H. (2012). Battlefield trauma care then and now. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 73(6 Suppl 5), S395–S402. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3182754850>
- Buwalda, S. J., Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release*, 190, 254–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>
- Campos, F. (2017). *GENERATION OF BIOMIMETIC TISSUE-LIKE BIOMATERIALS WITH CONTROLLED BIOMECHANICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS*. Retrieved from [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wiggers\\_Diagram.svg%0Ahttp://hdl.handle.net/10366/115558](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wiggers_Diagram.svg%0Ahttp://hdl.handle.net/10366/115558)
- Campos, F., Garzón, I., Rodríguez, I., & Martín-Piedra, M. Á. (2016). Cell viability evaluation in tissue constructs. A preliminary study. *Actualidad Medica*, 101(797), 13–17. <https://doi.org/10.15568/am.2016.797.or02>
- Carrel, A., & Burrows, M. T. (1911). Cultivation of tissues in vitro and its technique.

*Journal of Experimental Medicine*, 13(3), 387–396.  
<https://doi.org/10.1084/jem.13.3.387>

- Carriel, Víctor, Garzón, I., Jiménez, J. M., Oliveira, A. C. X., Arias-Santiago, S., Campos, A., ... Alaminos, M. (2012). Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*, 196(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000330682>
- Carriel, Víctor, Garrido-Gómez, J., Hernández-Cortés, P., Garzón, I., García-García, S., Sáez-Moreno, J. A., ... Alaminos, M. (2013). Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*, 10(2). <https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/2/026022>
- Carriel, Víctor, Garzón, I., Alaminos, M., & Cornelissen, M. (2014). Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regeneration Research*, 9(18), 1657–1660. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.141798>
- Carriel, Víctor, Garzón, I., Campos, A., Cornelissen, M., & Alaminos, M. (2014). Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1002/term>
- Carriel, Víctor, Scionti, G., Campos, F., Roda, O., Castro, B., Cornelissen, M., ... Alaminos, M. (2015). In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1002/term.2039>
- Cernadas, M. R., de Miguel, L. S., García-Durán, M., González-Fernández, F., Millás, I., Montón, M., ... López-Farré, A. (1998). Expression of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases in the Vascular Wall of Young and Aging Rats. *Circulation Research*, 83(3), 279–286. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.3.279>
- Cesarman-Maus, G., & Hajjar, K. A. (2005, May). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*, Vol. 129, pp. 307–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>
- Chang, L., Yan, Y., & Wang, L. (2020, February 21). Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfusion Medicine Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2020.02.003>
- Charles River. (2016). Wistar Rat | Charles River. Retrieved April 21, 2020, from <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/wistar-rat>
- Chernysh, I. N., Nagaswami, C., Purohit, P. K., & Weisel, J. W. (2012). Fibrin clots are equilibrium polymers that can be remodeled without proteolytic digestion. *Scientific Reports*, 2(1), 879. <https://doi.org/10.1038/srep00879>
- Cines, D. B., Lebedeva, T., Nagaswami, C., Hayes, V., Masefski, W., Litvinov, R. I., ... Weisel, J. W. (2014). Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*, 123(10), 1596–1603. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-523860>



- Cohen, M. J. (2014). Acute traumatic coagulopathy: Clinical characterization and mechanistic investigation. *Thrombosis Research*, 133, S25–S27. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.013>
- Cossio-Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas Vitoria, R., Tadeu Hochmuller Fogaça, R., & de Arruda, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar REFERENCE CURVES FOR ASSESSING THE PHYSICAL GROWTH OF MALE WISTAR RATS Resumen. *Nutr Hosp*, 28(6), 2151–2156. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6659>
- Costa-Almeida, R., Soares, R., & Granja, P. L. (2018). Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 12, pp. 240–251. <https://doi.org/10.1002/term.2405>
- Coutinho, T. R. C. G., Malafaia, O., Torres, O. J. M., Filho, J. M. R., Kaminski, A. F., Cella, I. F., & Jurkonis, L. B. (2014). Comparison between electrocautery and fibrin selant after hepatectomy in rats. *Revista Do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*, 41(3), 198–202. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912014000300011>
- Cuñetti, L. (2014). Generalidades de los Medicamentos Biológicos. Retrieved March 21, 2020, from Boletín Farmacológico website: [http://www.boletinfarmacologia.hc.edu.uy/index.php?option=com\\_content&task=view&id=104&Itemid=66](http://www.boletinfarmacologia.hc.edu.uy/index.php?option=com_content&task=view&id=104&Itemid=66)
- Dare, E. V., Griffith, M., Poitras, P., Kaupp, J. A., Waldman, S. D., Carlsson, D. J., ... Hincke, M. T. (2009). Genipin Cross-Linked Fibrin Hydrogels for in vitro Human Articular Cartilage Tissue-Engineered Regeneration. *Cells Tissues Organs*, 190(6), 313–325. <https://doi.org/10.1159/000209230>
- Davie, E. W., & Ratnoff, O. D. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145(3638), 1310–1312. <https://doi.org/10.1126/science.145.3638.1310>
- De la Puente, P., & Ludeña, D. (2014). Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Experimental Cell Research*, 322(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.017>
- Demetri, G. D. (2000). Pharmacologic treatment options in patients with thrombocytopenia. *Seminars in Hematology*, 37(2 Suppl 4), 11–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831284>
- Demirel, A. H., Basar, O. T., Ongoren, A. U., Bayram, E., & Kisakurek, M. (2008). Effects of primary suture and fibrin sealant on hemostasis and liver regeneration in an experimental liver injury. *World Journal of Gastroenterology*, 14(1), 81–84. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.81>
- Dent, J. A., Berkowitz, S. D., Ware, J., Kasper, C. K., & Ruggeri, Z. M. (1990). Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6306–6310. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6306>
- Denu, R. A., Nemcek, S., Bloom, D. D., Goodrich, A. D., Kim, J., Mosher, D. F., & Hematti,

- P. (2016). Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematologica*, 136(2), 85–97. <https://doi.org/10.1159/000445096>
- Di Minno, G., Perno, C. F., Tiede, A., Navarro, D., Canaro, M., Güertler, L., & Ironside, J. W. (2016). Current concepts in the prevention of pathogen transmission via blood/plasma-derived products for bleeding disorders. *Blood Reviews*, 30(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.07.004>
- Dokmak, S., Ftériche, F. S., Borscheid, R., Cauchy, F., Farges, O., & Belghiti, J. (2013). 2012 Liver resections in the 21st century: We are far from zero mortality. *HPB*. <https://doi.org/10.1111/hpb.12069>
- Dowling, M. B., Smith, W., Balogh, P., Duggan, M. J., MacIntire, I. C., Harris, E., ... King, D. R. (2015). Hydrophobically-modified chitosan foam: Description and hemostatic efficacy. *Journal of Surgical Research*, 193(1), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.06.019>
- Dyr, J. E., Blombäck, B., Hessel, B., & Kornalík, F. (1989). Conversion of fibrinogen to fibrin induced by preferential release of fibrinopeptide B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1), 18–24. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80006-6)
- Dzobo, K., Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Shipanga, H., Rowe, A., Dandara, C., ... Motaung, K. S. C. M. (2018). Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>
- Eson, G., & Karanicolas, P. J. (2016). Hemostasis and Hepatic Surgery. *Surgical Clinics of North America*, Vol. 96, pp. 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2015.12.001>
- Egorikhina, M. N., Aleynik, D. Y., Rubtsova, Y. P., Levin, G. Y., Charykova, I. N., Semenycheva, L. L., ... Zakharychev, E. A. (2019). Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics. *Bioactive Materials*, 4(June), 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.003>
- Erber, M., & Lee, G. (2015). The influence of excipients commonly used in freeze drying on whole blood coagulation dynamics assessed by rotational thromboelastometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-1046>
- Espinosa, G., & Reverter, J. (2001). Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. Retrieved March 11, 2020, from Medicina Integral website: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-pdf-13018800>
- European Commission. (2020). *An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion Guidance on collection, testing, processing, storage, distribution and monitored use* (p. 7). p. 7.
- European Medicines Agency. (2014). Conduct of Inspections of Pharmaceutical Manufacturers or Importers. In *Compilation of community procedures in*

- inspections and exchange of information* (Vol. 44). Retrieved from [www.ema.europa.eu/contact%0Ahttp://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2009/10/WC500004706.pdf](http://www.ema.europa.eu/contact%0Ahttp://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500004706.pdf)
- Farhat, W., Hasan, A., Lucia, L., Becquart, F., Ayoub, A., & Kobeissy, F. (2018). Hydrogels for Advanced Stem Cell Therapies: A Biomimetic Materials Approach for Enhancing Natural Tissue Function. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, *12*(1cm), 333–351. <https://doi.org/10.1109/RBME.2018.2824335>
- FDA. (2008). Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell. *Guidance for FDA Reviewers and Sponsors*.
- Fernández-Valadés-Gámez, R., Garzón, I., Licerias-Licerias, E., España-López, A., Carriel, V., Martín-Piedra, M. Á., ... Fernández-Valadés, R. (2016). Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. *Biomedical Materials (Bristol)*, *11*(1). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/015015>
- Finch, R. J. B., Malik, H. Z., Hamady, Z. Z. R., Al-Mukhtar, A., Adair, R., Prasad, K. R., ... Toogood, G. J. (2007). Effect of type of resection on outcome of hepatic resection for colorectal metastases. *British Journal of Surgery*, *94*(10), 1242–1248. <https://doi.org/10.1002/bjs.5640>
- Flores-rivera, O. I., Ramírez-morales, D. K., Meza-márquez, J. M., & Nava-lópez, J. A. (2014). *Fisiología de la coagulación*. *37*, 382–386.
- García-Martínez, L., Campos, F., Godoy-Guzmán, C., del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Garzón, I., Alaminos, M., ... Carriel, V. (2017). Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochemistry and Cell Biology*, *147*(1), 83–95. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1485-9>
- Garzón, I., Martín-Piedra, M. A., Alfonso-Rodríguez, C., González-Andrades, M., Carriel, V., Martínez-Gómez, C., ... Alaminos, M. (2014). Generation of a biomimetic human artificial cornea model using wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *55*(7), 4073–4083. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14304>
- Garzón, I., Miyake, J., González-Andrades, M., Carmona, R., Carda, C., Sánchez-Quevedo, M. del C., ... Alaminos, M. (2013). Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *STEM CELLS Translational Medicine*, *2*(8), 625–632. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0157>
- Garzon, I., Serrato, D., Roda, O., Del Carmen Sanchez-Quevedo, M., Gonzales-Jaranay, M., Moreu, G., ... Campos, A. (2009). In vitro cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*, *32*(10), 711–719. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943232>
- Gómez-Mascaraque, L. G., Méndez, J. A., Fernández-Gutiérrez, M., Vázquez, B., & San Román, J. (2014). Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose-chitosan. *Acta Biomaterialia*,

10(2), 798–811. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.003>

- González-Andrades, M., Garzón, I., Gascón, M. I., Muñoz-Ávila, J. I., Sánchez-Quevedo, M. C., Campos, A., & Alaminos, M. (2009). Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(6), 442–449. <https://doi.org/10.1002/term.178>
- González-Andrades, Miguel, Mata, R., Del Carmen González-Gallardo, M., Medialdea, S., Arias-Santiago, S., Martínez-Atienza, J., ... Cuende, N. (2017). A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open*, 7(9). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016487>
- Gormley, C. A., Keenan, B. J., Buczek-Thomas, J. A., Pessoa, A. C. S. N., Xu, J., Monti, F., ... Wong, J. Y. (2019). Fibrin-Targeted Polymerized Shell Microbubbles as Potential Theranostic Agents for Surgical Adhesions. *Langmuir*, 35(31), 10061–10067. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03692>
- Grand View Research. (2019). Hemostasis & Tissue Sealing Agents Market Size Report, 2019-2026. Retrieved May 11, 2020, from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/hemostasis-tissue-sealing-agents-market>
- Gurusamy, K. S., Kumar, Y., Ramamoorthy, R., Sharma, D., & Davidson, B. R. (2009). Vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007530>
- Gurusamy, K. S., Li, J., Sharma, D., & Davidson, B. R. (2009). Pharmacological interventions to decrease blood loss and blood transfusion requirements for liver resection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008085>
- Hadjipanayi, E., Ananta, M., Binkowski, M., Streeter, I., Lu, Z., Cui, Z. F., ... Mudera, V. (2011). Mechanisms of structure generation during plastic compression of nanofibrillar collagen hydrogel scaffolds: Towards engineering of collagen. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(7), 505–519. <https://doi.org/10.1002/term.343>
- Harminder Bhogal, R., Pericleous, S., & Z. Khan, A. (2019). Robotic Liver Surgery. In *Liver Disease and Surgery [Working Title]*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87995>
- Harpel, P. C., Chang, T. S., & Verderber, E. (1985). Tissue plasminogen activator and urokinase mediate the binding of Glu-plasminogen to plasma fibrin I. Evidence for new binding sites in plasmin-degraded fibrin I. Retrieved March 21, 2020, from Journal of Biological Chemistry website: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3156857/>
- Harrison, P., Savidge, G. F., & Cramer, E. M. (1990). The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *British Journal of Haematology*, 74(2), 125–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1990.tb02554.x>

- Harrison, P., Wilbourn, B., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Lawrie, A. S., ... Cramer, E. M. (1989). Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *Journal of Clinical Investigation*, *84*(4), 1320–1324. <https://doi.org/10.1172/JCI114300>
- Henderson, P. W., Kadouch, D. J. M., Singh, S. P., Zawaneh, P. N., Weiser, J., Yazdi, S., ... Spector, J. A. (2010). A rapidly resorbable hemostatic biomaterial based on dihydroxyacetone. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *93*(2), 776–782. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32586>
- Higgins, G., & Anderson, M. (1931, January 1). Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Experimental Pathology of the Liver*, Vol. 12, pp. 186–202.
- Hoffman, M., & Monroe, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 85, pp. 958–965. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615947>
- Holcomb, J. B. (2010). Optimal Use of Blood Products in Severely Injured Trauma Patients. *Hematology*, *2010*(1), 465–469. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2010.1.465>
- Horowitz, B., & Ben-Hur, E. (1995). Strategies for viral inactivation. *Current Opinion in Hematology*, Vol. 2, pp. 484–492. <https://doi.org/10.1097/00062752-199502060-00014>
- Hou, Y., Carrim, N., Wang, Y., Gallant, R. C., Marshall, A., & Ni, H. (2015). Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *Journal of Biomedical Research*, *29*(6), 437–444. <https://doi.org/10.7555/JBR.29.20150121>
- Houser, J. R., Hudson, N. E., Ping, L., O'Brien, E. T., Superfine, R., Lord, S. T., & Falvo, M. R. (2010). Evidence that  $\alpha$ C region is origin of low modulus, high extensibility, and strain stiffening in fibrin fibers. *Biophysical Journal*, *99*(9), 3038–3047. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.060>
- Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R., & Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1652446>
- Ionescu, A. M., Alaminos, M., Cardona, J. de la C., García-López Durán, J. de D., González-Andrades, M., Ghinea, R., ... Pérez, M. del M. (2011). Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.06.013>
- Jaimes-Parra, B. D., Valle-Díaz de la Guardia, F., Arrabal-Polo, M. A., Herrera-Imbroda, B., Lara, M. F., Machuca-Santa-Cruz, F. J., ... Garzón, I. (2016). Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *International Journal of Urology*, *23*(1), 85–92. <https://doi.org/10.1111/iju.12963>
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009, January). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, Vol. 18, pp. 24–36. <https://doi.org/10.1002/pro.3>

- Janvier Labs. (2020). WISTAR Rat - Janvier Labs. Retrieved April 21, 2020, from [https://www.janvier-labs.com/en/fiche\\_produit/wistar\\_rat/](https://www.janvier-labs.com/en/fiche_produit/wistar_rat/)
- Jimenez-Castro, M. B., Elias-Miro, M., Casillas-Ramirez, A., & Peralt, C. (2013). Experimental Models in Liver Surgery. In *Hepatic Surgery*. <https://doi.org/10.5772/51829>
- Jun, J.-I., & Lau, L. F. (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*, 2(9), 627–631. <https://doi.org/10.18632/aging.100201>
- Kattula, S., Byrnes, J. R., & Wolberg, A. S. (2017). Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(3), e13–e21. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.308564>
- Keil, S. D., Ragan, I., Yonemura, S., Hartson, L., Dart, N. K., & Bowen, R. (2020). Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in plasma and platelet products using a riboflavin and ultraviolet light-based photochemical treatment. *Vox Sanguinis*, vox.12937. <https://doi.org/10.1111/vox.12937>
- Klein, K., De Bruin, M. L., Broekmans, A. W., & Stolk, P. (2015). Classification of Recombinant Biologics in the EU: Divergence Between National Pharmacovigilance Centers. *BioDrugs*, 29(6), 373–379. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0149-y>
- Krafts, K. P. (2010). Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis*, 6(4), 225–233. <https://doi.org/10.4161/org.6.4.12555>
- Krug, E. G., Sharma, G. K., & Lozano, R. (2000). The global burden of injuries. *American Journal of Public Health*, 90(4), 523–526. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754963>
- Kuhl, H. (1996). Effects of progestogens on haemostasis. *Maturitas*, 24(1–2), 1–19. [https://doi.org/10.1016/0378-5122\(96\)00994-2](https://doi.org/10.1016/0378-5122(96)00994-2)
- Kurniawan, N. A., Grimbergen, J., Koopman, J., & Koenderink, G. H. (2014). Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(10), 1687–1696. <https://doi.org/10.1111/jth.12705>
- Kuschel, T. J., Gruszka, A., Hermanns-Sachweh, B., Elyakoubi, J., Sachweh, J. S., Vázquez-Jiménez, J. F., & Schnoering, H. (2013). Prevention of Postoperative Pericardial Adhesions With TachoSil. *ATS*, 95, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.08.057>
- Langer, B. G., Weisel, J. W., Dinauer, P. A., Nagaswami, C., & Bell, W. R. (1988). Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(29), 15056–15063. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3170575>
- Laurens, N., Koolwijk, P., & de Maat, M. P. (2006). Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, Vol. 4, pp. 932–939. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01861.x>
- Lewis, Kevin M., Schiviz, A., Hedrich, H. C., Regenbogen, J., & Goppelt, A. (2014). Hemostatic efficacy of a novel, PEG-coated collagen pad in clinically relevant animal

models. *International Journal of Surgery*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2014.07.017>

- Lewis, Kevin Michael, Kuntze, C. E., & Gulle, H. (2015). Control of bleeding in surgical procedures: Critical appraisal of HEMOPATCH (Sealing Hemostat). *Medical Devices: Evidence and Research*. <https://doi.org/10.2147/MDER.S90591>
- Liceras-Liceras, E., Garzón, I., España-López, A., Oliveira, A. C. X., García-Gómez, M., Martín-Piedra, M. Á., ... Fernández-Valadés, R. (2017). Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an in vivo study in laboratory animals. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *11*(6), 1907–1914. <https://doi.org/10.1002/term.2088>
- Liu, W., Carlisle, C. R., Sparks, E. A., & Guthold, M. (2010). The mechanical properties of single fibrin fibers. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *8*(5), 1030–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x>
- Liu, Y., Buil, A., Collins, B. C., Gillet, L. C., Blum, L. C., Cheng, L., ... Aebersold, R. (2015). Quantitative variability of 342 plasma proteins in a human twin population. *Molecular Systems Biology*, *11*(2), 786. <https://doi.org/10.15252/msb.20145728>
- Lorenz, K., Sicker, M., Schmelzer, E., Rupf, T., Salvetter, J., Schulz-Siegmund, M., & Bader, A. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology*, *17*(11), 925–932. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00724.x>
- Lu, G., Broze, G. J., & Krishnaswamy, S. (2004). Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: Differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(17), 17241–17249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312827200>
- Lysaght, Michael J.; Hazlehurst, A. L. (2004). The end of the beginning for tissue engineering. *Tissue Engineering*, *10*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62110-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62110-8)
- Lysy, P. A., Smets, F., Sibille, C., Najimi, M., & Sokal, E. M. (2007). Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology*, *46*(5), 1574–1585. <https://doi.org/10.1002/hep.21839>
- Macfarlane, R. G. (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier [23]. *Nature*, Vol. 202, pp. 498–499. <https://doi.org/10.1038/202498a0>
- Madrahimov, N., Dirsch, O., Broelsch, C., & Dahmen, U. (2006). Marginal hepatectomy in the rat: From anatomy to surgery. *Annals of Surgery*, *244*(1), 89–98. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000218093.12408.0f>
- Mankad, P. S., & Codispoti, M. (2001). The role of fibrin sealants in hemostasis. *American Journal of Surgery*, *182*(2 Suppl), 21S–28S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566473>
- Martín-Banderas, L., Muñoz-Rubio, I., Álvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Arias, J. L., Hologado, M. Á., & Fernández-Arévalo, M. (2014). Engineering of  $\Delta 9$  -

- tetrahydrocannabinol delivery systems based on surface modified-PLGA nanoplateforms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.002>
- Martin, S. S., Alaminos, M., Zorn, T. M. T., Sánchez-Quevedo, M. C., Garzón, I., Rodríguez, I. A., & Campos, A. (2013). The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(1), 10–19. <https://doi.org/10.1002/term.490>
- Martinez, J., Keane, P. M., Gilman, P. B., & Palascak, J. E. (1983). The abnormal carbohydrate composition of the dysfibrinogenemia associated with liver disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 408(1 Molecular Bio), 388–396. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb23259.x>
- Martins, P. N. A., Theruvath, T. P., & Neuhaus, P. (2008). Rodent models of partial hepatectomies. *Liver International*, 28(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01628.x>
- McMichael, M. (2012, May). New Models of Hemostasis. *Topics in Companion Animal Medicine*, Vol. 27, pp. 40–45. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2012.07.005>
- Meng, Q., Pan, N., Xiong, J., & Liu, N. (2018). Tranexamic acid is beneficial for reducing perioperative blood loss in transurethral resection of the prostate. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7025>
- Meraney, A. M., & Gill, I. S. (2002). Financial analysis of open versus laparoscopic radical nephrectomy and nephroureterectomy. <https://doi.org/10.1097/00005392-200204000-00040>
- Moggia, E., Rouse, B., Simillis, C., Li, T., Vaughan, J., Davidson, B. R., & Gurusamy, K. S. (2016). Methods to decrease blood loss during liver resection: A network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Vol. 2016. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010683.pub3>
- Monroe, D. M., & Hoffman, M. (2006). What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(1), 41–48. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83>
- Morelli, P., Porazzi, E., Ruspini, M., Restelli, U., & Banfi, G. (2013). Analysis of errors in histology by root cause analysis: A pilot study. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 54(2), 90–96. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2013.54.2.380>
- Ni, H., & Freedman, J. (2003, June 1). Platelets in hemostasis and thrombosis: Role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science*, Vol. 28, pp. 257–264. [https://doi.org/10.1016/S1473-0502\(03\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S1473-0502(03)00044-2)
- Nieto-Aguilar, R., Serrato, D., Garzón, I., Campos, A., & Alaminos, M. (2011). Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold. *Journal of Biomaterials Applications*, 25(7), 743–768. <https://doi.org/10.1177/0885328209360425>
- Nissen, L., Hunter, J., Schröder, H., Rütz, K., & Bollen, P. (2017). Adhesions, inflammatory



- response and foreign body giant cells infiltration of the topical hemostats TachoSil<sup>®</sup>, Hemopatch<sup>™</sup> and Veriset<sup>™</sup> – An Animal Study. *Journal of Surgery and Surgical Research*, 3(2), 038–041. <https://doi.org/10.17352/2455-2968.000043>
- Nohuz, E., Darcha, C., Moreno, W., Tamburro, S., Yanez, M., Mulliez, A., ... Canis, M. (2009). Efficiency of TachoSil<sup>®</sup> to prevent postsurgical adhesion development on laparoscopic rat model. *Gynecological Surgery*, 6(4), 323–329. <https://doi.org/10.1007/s10397-009-0496-0>
- Odrlić, T. M., Rybarczyk, B. J., Francis, C. W., Lawrence, S. O., Hamaguchi, M., & Simpson-Haidaris, P. J. (1996). Calcium modulates plasmin cleavage of the fibrinogen D fragment  $\gamma$  chain N-terminus: mapping of monoclonal antibody J88B to a plasmin sensitive domain of the  $\gamma$  chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1298(1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00090-8)
- Oyen, M. L. (2014). Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews*, 59(1), 44–59. <https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000022>
- Podolnikova, N. P., Yakovlev, S., Yakubenko, V. P., Wang, X., Gorkun, O. V., & Ugarova, T. P. (2014). The interaction of integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the  $\alpha$ IIb  $\beta$ -propeller domain. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 2371–2383. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518126>
- Qiu, Y., Brown, A. C., Myers, D. R., Sakurai, Y., Mannino, R. G., Tran, R., ... Lam, W. A. (2014). Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), 14430–14435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322917111>
- Queiroz, S. I. M. L., Silvestre, V. D., Soares, R. M., Campos, G. B. P., Germano, A. R., & da Silva, J. S. P. (2018). Tranexamic acid as a local hemostasis method after dental extraction in patients on warfarin: a randomized controlled clinical study. *Clinical Oral Investigations*, 22(6), 2281–2289. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2327-4>
- Rånby, M. (1982). Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 704(3), 461–469. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90068-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90068-1)
- Regulation (EC) 1394/2007. (n.d.). Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. In *Official Journal of the European Union*.
- Reissfelder, C., Rahbari, N. N., Koch, M., Kofler, B., Sutedja, N., Elbers, H., ... Weitz, J. (2011). Postoperative course and clinical significance of biochemical blood tests following hepatic resection. *British Journal of Surgery*, 98(6), 836–844. <https://doi.org/10.1002/bjs.7459>
- Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-

- Berendsen, D. H., ... Kurimoto, M. (2002, July 1). Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 40, pp. 871–898. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00011-X)
- Riddel, J. P., Aouizerat, B. E., Miaskowski, C., & Lillicrap, D. P. (2007, May). Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, Vol. 24, pp. 123–131. <https://doi.org/10.1177/1043454206298693>
- Rodriguez I. et al. (2012). Rheological characterization of human fibrin and fibrin–agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1002/term>
- Rogers, A. B., & Dintzis, R. Z. (2018). Hepatobiliary System. In *Comparative Anatomy and Histology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802900-8.00013-0>
- Roorda, W. E., BoddÉ, H. E., de Boer, A. G., & Junginger, H. E. (1986). Synthetic hydrogels as drug delivery systems. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 8(3), 165–189. <https://doi.org/10.1007/BF01959775>
- Ruggeri, Z. M., & Mendolicchio, G. L. (2007). Adhesion mechanisms in platelet function. *Circulation Research*, 100(12), 1673–1685. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab>
- Ruiz, S., & Sulleiro, E. (2011). Medicamentos biotecnológicos; from dream to reality. *Farmacéuticos de Atención Primaria*, 9(3), 85–88.
- Sanchez-Quevedo, M. C., Alaminos, M., Capitan, L. M., Moreu, G., Garzon, I., Crespo, P. V., & Campos, A. (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histology and Histopathology*, 631–640. <https://doi.org/10.14670/HH-22.631>
- Schense, J. C., & Hubbell, J. A. (1999). Cross-Linking Exogenous Bifunctional Peptides into Fibrin Gels with Factor XIIIa. *Bioconjugate Chemistry*, 10(1), 75–81. <https://doi.org/10.1021/bc9800769>
- Schleef, R. R., & Birdwell, C. R. (1982). The effect of fibrin on endothelial cell migration in vitro. *Tissue and Cell*, 14(4), 629–636. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(82\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0040-8166(82)90053-2)
- Schmiedt, C. W., Köhler, R., & Brainard, B. M. (2012). Use of topical bovine thrombin in an anti-coagulated rat model of hepatic injury. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1498–1503. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.04.012>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., & Instrumentation, C. (2017). *NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis*. 9(7), 671–675.
- Schneider, C. K., Celis, P., Salmikangas, P., Figuerola-Santos, M. A., D'Apote, L., Oliver-Diaz, O., ... Niederwieser, D. (2010). Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 9, pp. 195–201. <https://doi.org/10.1038/nrd3052>
- Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., Osorio, R., Durán, J. D. G., Alaminos, M., ... López-

- López, M. T. (2014). Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34929>
- Serrato, D., Nieto-Aguilar, R., Garzón, I., Roda, O., Campos, A., & Alaminos, M. (2009). Comparison of the effect of cryopreservation protocols on the histology of bioengineered tissues. *Histology and Histopathology*, *24*(12), 1531–1540. <https://doi.org/10.14670/HH-24.1531>
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Bhatt, V. D., & Dhot, P. S. (2019). Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of Medicine and Life*, *12*(3), 225–229. <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0032>
- Shimizu, A., Suhara, T., Ito, T., Omichi, K., Naruse, K., Hasegawa, K., & Kokudo, N. (2014). A new hepatectomy-induced postoperative adhesion model in rats, and evaluation of the efficacy of anti-adhesion materials. *Surgery Today*, *44*(2), 314–323. <https://doi.org/10.1007/s00595-013-0530-8>
- Simmons, J. W., Pittet, J.-F., & Pierce, B. (2014). Trauma-Induced Coagulopathy. *Current Anesthesiology Reports*, *4*(3), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s40140-014-0063-8>
- Slezak, P., Monforte, X., Ferguson, J., Sutalo, S., Redl, H., Gulle, H., & Spazierer, D. (2018). Properties of collagen-based hemostatic patch compared to oxidized cellulose-based patch. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *29*(6), 71. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6078-9>
- Spisni, E., Bartolini, G., Orlandi, M., Belletti, B., Santi, S., & Tomasi, V. (1995). *Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) synthase is a constitutively expressed enzyme in human endothelial cells*. *219*(2), 507–513.
- Spotnitz, W. (2014). Fibrin sealant patches: powerful and easy-to-use hemostats. *Open Access Surgery*, *7*, 71. <https://doi.org/10.2147/OAS.S41516>
- Spotnitz, W. D. (2008). Tissue Adhesives: Science, Products, and Clinical Use. In *Musculoskeletal Tissue Regeneration* (pp. 531–546). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-239-7\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-239-7_25)
- Spotnitz, W. D., & Burks, S. (2008). Hemostats, sealants, and adhesives: Components of the surgical toolbox. *Transfusion*, *48*(7), 1502–1516. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01703.x>
- Stassen, J., Arnout, J., & Deckmyn, H. (2012). The Hemostatic System. *Current Medicinal Chemistry*, *11*(17), 2245–2260. <https://doi.org/10.2174/0929867043364603>
- Suárez-Grau, J. M., Bernardos García, C., Cepeda Franco, C., Mendez García, C., García Ruiz, S., Docobo Durantez, F., ... Padillo Ruiz, J. (2016). Fibrinogen-thrombin collagen patch reinforcement of high-risk colonic anastomoses in rats. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v8.i9.627>
- Suenson, E., Lützen, O., & Thorsen, S. (1984). Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *European Journal of Biochemistry*, *140*(3), 513–522. <https://doi.org/10.1111/j.1432->

1033.1984.tb08132.x

- Suh, D. W., Kyung, B. S., Han, S.-B., Cheong, K., & Lee, W. H. (2018). Efficacy of Tranexamic Acid for Hemostasis in Patients Undergoing High Tibial Osteotomy. *J Knee Surg*, *31*(01), 50–55. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1600091>
- Takeda, Y. (1966). Studies of the metabolism and distribution of fibrinogen in healthy men with autologous 125-I-labeled fibrinogen. *The Journal of Clinical Investigation*, *45*(1), 103–111. <https://doi.org/10.1172/JCI105314>
- Tamosiunas, G. (2020). Problemas vinculados al uso de medicamentos biológicos. Retrieved from Boletín Farmacológico website: [http://www.boletinfarmacologia.hc.edu.uy/index.php?option=com\\_content&task=view&id=112&Itemid=79](http://www.boletinfarmacologia.hc.edu.uy/index.php?option=com_content&task=view&id=112&Itemid=79)
- Tsurupa, G., Pechik, I., Litvinov, R. I., Hantgan, R. R., Tjandra, N., Weisel, J. W., & Medved, L. (2012). On the Mechanism of  $\alpha$ C Polymer Formation in Fibrin. *Biochemistry*, *51*(12), 2526–2538. <https://doi.org/10.1021/bi2017848>
- Vargas-Ruiz, Á. G. (2016). El fibrinógeno: Su fisiología e interacciones en el sistema de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*, *39*(4), S321–S323.
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*, *93*(1), 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
- Vrieling, H., & Reesink, H. W. (1998). Transfusion-transmissible infections. *Current Opinion in Hematology*, Vol. 5, pp. 396–405. <https://doi.org/10.1097/00062752-199811000-00008>
- Weisel, J. W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*, *112*(2-3 SPEC. ISS.), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.07.029>
- Weisel, J. W. (2007). Structure of fibrin: Impact on clot stability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *5*(SUPPL. 1), 116–124. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02504.x>
- Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2018). *Fibrin Formation, Structure and Properties Chapter 13 Fibrin Formation, Structure and Properties* (Vol. 82). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0>
- Wichterle, O., & Lím, D. (1960). Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*, *185*(4706), 117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>
- Williams, D. (2004). Benefit and risk in tissue engineering. *Materials Today*, *7*(5), 24–29. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00232-9](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00232-9)
- Wolkers, W. F., & Walker, J. M. (2015). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols IN Series Editor*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5>
- World Health Organization. (2020). Maintaining a safe and adequate blood supply during the pandemic outbreak of coronavirus disease ( COVID-19 ). In *Interim guidance*.

- Yahanda, A. M., Paidas, C. N., & Clemens, M. G. (1990). Susceptibility of hepatic microcirculation to reperfusion injury: A comparison of adult and suckling rats. In *Journal of Pediatric Surgery* (Vol. 25). [https://doi.org/10.1016/0022-3468\(90\)90404-W](https://doi.org/10.1016/0022-3468(90)90404-W)
- Yang, H., Rehemian, A., Chen, P., Zhu, G., Hynes, R. O., Freedman, J., ... Ni, H. (2006). Fibrinogen and von willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(10), 2230–2237. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02116.x>
- Zarrintaj, P., Manouchehri, S., Ahmadi, Z., Saeb, M. R., Urbanska, A. M., Kaplan, D. L., & Mozafari, M. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 187(October 2017), 66–84. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.060>
- Zilinsky, I., Barazani, T. B., Visentin, D., Ahuja, K., Martinowitz, U., & Haik, J. (2019). Subcutaneous Injection of Tranexamic Acid to Reduce Bleeding During Dermatologic Surgery. *Dermatologic Surgery*. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001786>
- Zucker&hyphen;Franklin, D. (1996). Megakaryocyte and Platelet Structure in Thrombocytopoiesis: The Effect of Cytokines. *Stem Cells*, 14(S1), 1–17. <https://doi.org/10.1002/stem.5530140702>
- Zúñiga, J. M., & Muriana, J. M. O. (2016). *Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal [Recurso electrónico]*. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=697765>