

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

UAB

HOSPITAL VALL D'HEBRON

BARCELONA, JUNIO DEL 2004

**“ NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA
BIOESTABILIDAD Y BIOCOPATIBILIDAD DE
BIOMATERIALES UTILIZADOS EN LA
REPARACIÓN DE DEFECTOS DE PARED
ABDOMINAL. ESTUDIOS EXPERIMENTALES “**

**Tesis presentada por José María Ferrando Gisbert, para
acceder al grado de Doctor en Medicina y Cirugía**

**Dirigida por los Doctores Maria Antonia Arbós Via, Josep
Vidal Sans y Manuel Armengol Carrasco**

Barcelona, Junio del 2004

Í N D I C E

| | Pgna. |
|--|--------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. FUNDAMENTOS | 5 |
| 2.1 PATOLOGÍA DE LA PARED ABDOMINAL: HERNIA | 6 |
| 2.1.1 Concepto | 6 |
| 2.1.2 Etiología | 6 |
| 2.1.3 Algunos aspectos epidemiológicos: sociales y económicos | 7 |
| 2.1.4 Evolución histórica: enfoque y abordajes terapéuticos | 8 |
| 2.1.5 Estado actual en la investigación de los biomateriales blandos. Prótesis de segunda generación | 10 |
| 2.2 RESPUESTA METABÓLICA-INFLAMATORIA SISTÉMICA Y LOCAL FRENTE AL “ CUERPO EXTRAÑO “ | 12 |
| 2.2.1 Regulación endógena | 12 |
| 2.2.2 Regulación exógena | 16 |
| 2.3 ARGININA Y METABOLISMO: PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE CICATRIZACIÓN | 19 |
| 2.3.1 Bioquímica | 20 |
| 2.3.2 Fisiología | 20 |
| 2.4 MODELOS EXPERIMENTALES “ IN VIVO “ EN LA CIRUGÍA DE LA PARED ABDOMINAL | 27 |
| 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y UNIDAD TEMÁTICA | 29 |
| 3.1 HIPÓTESIS | 31 |
| 3.1.1 Aspectos anatómico-quirúrgicos y capacidad de integración de las prótesis | 31 |
| 3.1.2 Modulación exógena de los procesos de integración/reparación de los biomateriales y la pared abdominal respectivamente | 31 |
| 3.1.3 Importancia de las propiedades mecánico-estructurales de las prótesis en la incorporación a los tejidos | 32 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2 | OBJETIVOS | 33 |
| 3.2.1 | Objetivo principal | 33 |
| 3.2.2 | Objetivos específicos | 33 |
| 3.3 | PUBLICACIONES | 34 |
| 4. | RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS | 35 |
| 4.1 | RESULTADOS HISTOLÓGICOS | 37 |
| 4.1.1 | Respecto a la influencia de la estructura del lugar de colocación de las prótesis | 37 |
| 4.1.2 | Respecto a la influencia de la modulación exógena con arginina | 38 |
| 4.1.3 | Respecto a la importancia de las propiedades mecánico-estructurales de los biomateriales en la incorporación a los tejidos | 39 |
| 4.2 | RESULTADOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES | 39 |
| 4.3 | RESULTADOS MECÁNICOS | 41 |
| 4.3.1 | Respecto a la influencia de la estructura del lugar de colocación de las prótesis | 41 |
| 4.3.2 | Respecto a la influencia de la modulación exógena con arginina | 42 |
| 4.3.3 | Respecto a la importancia de las propiedades mecánico-estructurales de los biomateriales en la incorporación a los tejidos | 42 |
| 5. | DISCUSIÓN | 43 |
| 6. | CONCLUSIONES | 56 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| | ABREVIACIONES | 72 |

2. FUNDAMENTOS

2.1 PATOLOGÍA DE LA PARED ABDOMINAL: HERNIA

2.1.1 Concepto

Se denomina hernia de la pared abdominal a la evaginación del peritoneo parietal a través de zonas debilitadas de la misma. Se diferencia de la evisceración en que en ésta la protusión de las vísceras por el defecto de las paredes del abdomen no va precedida de la serosa parietal correspondiente [25].

Las zonas débiles de las cuales emergen las vísceras pueden ser orificios preestablecidos anatómicamente (ej.: orificio inguinal o crural) o bien orificios constituidos circunstancialmente, tras una intervención quirúrgica, denominándose en este caso hernia incisional, eventración, hernia ventral o laparocèle.

2.1.2 Etiología

La herniología moderna empezó con la edad de oro de la Anatomía (1750-1850), desde entonces hasta nuestros días se han ido conjugando diversas teorías sobre la etiopatogenia del proceso herniario de la pared abdominal.

En 1906 aparece la teoría sacular de Russel ... “ *la presencia de un proceso funicular del peritoneo es un antecedente necesario en el desarrollo de la hernia, aunque encontremos intactas el resto de estructuras que constituyen la pared abdominal* “. En los siguientes años, Sir Arthur Keith [26], observando que la mayoría de los procesos herniarios se presentaban entre los 50 y 60 años de vida, después de una vida activa, propuso nuevos aspectos relacionados con esta patología, como los propiamente individuales y anatómicos. También se describieron factores metabólicos o genéticos, encontrándose defectos en los depósitos de hidroxiprolina y colágeno en determinadas estructuras de la pared como las vainas de los músculos rectos y las fascias transversales [27]. En esta misma línea y más recientemente se han realizado trabajos correlacionando actividad de degradación del colágeno y disfunciones enzimáticas con los dos tipos de hernias más frecuentes del territorio inguinal [28]. En las hernias incisionales se ha encontrado una distribución anómala en la síntesis de

colágeno que podría reducir la resistencia mecánica de los tejidos [29] y alteraciones en la interacción fibroblastos ? fibras de colágeno [30].

Además de todo ello existen factores concomitantes como:

- *enfermedades sistémicas* (broncopatías crónicas, obesidad, diabetes, hepatopatías, insuficiencia venosa crónica, estreñimiento crónico, malnutrición e inmunodeficiencias) [31].
- *hábito tabáquico* [32] [33].
- *factores dinámicos* (actividad, relajación/contracción de los músculos abdominales y sus fascias) [34].
- *factores iatrogénicos* (intervenciones quirúrgicas previas) [35].

En general, unos y/u otros pueden contribuir al desencadenamiento de un desequilibrio mecánico entre la presión visceral y la resistencia de las estructuras que constituyen las cubiertas de la pared del abdomen. Este desequilibrio originará la patología.

2.1.3 Algunos aspectos epidemiológicos: sociales y económicos

El procedimiento quirúrgico hernia de pared abdominal sin complicación comórbida es una de las intervenciones más frecuentes de la cirugía general y supone una importante utilización de recursos. Probablemente nos encontramos con una de las patologías que en los últimos 30 o 40 años más causas de absentismo laboral ha desencadenado en nuestro entorno. En su fisiopatología la actividad y el envejecimiento son dos de los mecanismos potenciadores de su desarrollo. Los dos grupos de población más afectados son: el laboral (sobre todo aquellos sujetos que realizan actividades físicas importantes) y el representado por la tercera edad. No hace más de 20 años, en nuestro país la estancia media hospitalaria de los pacientes operados de patología herniaria simple era de 7-10 días (mayor para las hernias incisionales). Desde 1980, con el empleo cada vez más sistematizado de materiales protésicos, así como en los últimos años, con la llegada de la (CMA), no sólo se ha reducido dicha estancia por debajo de 4 días (para todo tipo de hernias abdominales) sino que la tasa de recidiva ha caído por debajo del 5 %.

En los países como España, con un predominio de la Asistencia Sanitaria Pública, se está produciendo un progresivo interés por la optimización de los recursos

sanitarios. En este sentido y en relación con la Cirugía de la Hernia, nos encontramos con un mayor control de los costes, basado en la adecuación de la incapacidad laboral transitoria (ILT) y en la disminución de la estancia hospitalaria.

En Estados Unidos donde el número de herniorrafias anuales en los últimos años es de 700.000, el 60 % se realizan en régimen de CMA incluyendo en muchos casos la patología herniaria mayor [36]. En estos momentos en nuestros hospitales comarcales dicha actividad se extiende al 25-30 %, sin incluir las hernias ventrales [37]. En el futuro podría alcanzar porcentajes entre el 60 y el 80 % en régimen ambulatorio y asumir sino toda, gran parte de la cirugía compleja de la pared, así como sus recidivas. Todo ello se traduciría en una re-incorporación al trabajo más precoz, un menor número de problemas sobreañadidos (sobre todo en gente anciana) y un mayor control de los costes sanitarios en este campo.

2.1.4 Evolución histórica: enfoque y abordajes terapéuticos

Con el positivismo, tiene lugar el desarrollo y avance de la anestesia, antisepsia y sepsia. Paralelamente a ello se profundiza más en las áreas quirúrgicas y surge la verdadera historia de la hernia. Ello correría a cargo de cirujanos como E. Bassini, C.B. McVay y W.S. Halsted para el territorio inguino-femoral y Guy de Chauliac y La Chausse para el resto de defectos del abdomen donde se incluirían las hernias incisionales o ventrales. El signo de identidad de este periodo sería la idea de progreso y la primacía de las Ciencias Naturales todo ello basado en los hechos. Durante esta época el hombre no solo se conforma en observar sino que busca manipular. Aunque ya en el renacimiento se consigue avanzar en los conocimientos anatómicos, no es hasta estos momentos que se intenta reparar con una idea restauradora [38]. A partir de aquí y hasta nuestros días múltiples y diversos han sido los abordajes en este tipo de cirugía, desde la utilización simple de suturas de aproximación (rafias), el desarrollo de técnicas de auto-plastia (ej.: de fascia, músculo y piel), surgidas como respuesta a la reparación con tensión de las rafias y por último la revolución planteada por el uso de los biomateriales iniciada por O. Witzel en 1900 e instaurada por F.C. Usher en 1970 [10] [39]. Esto último facilitó la reconstrucción de los defectos evitando distorsionar la anatomía normal con unas suturas libres de tensión [1]. Las primeras prótesis utilizadas fueron las metálicas (alambre de plata, acero inoxidable y tantalio), caracterizadas por

su permanencia y resistencia pero con una capacidad de generar una alta reacción inflamatoria, lo que las hacía poco biocompatibles [40]. A partir de 1948 nace la etapa polimérica con la introducción de plásticos de la familia de las poliamidas *Fig. 1*. Una de las grandes necesidades que se plantean ya en esta época es el encontrar un material no metálico, permanente el cual pudiera ser utilizado tanto como de refuerzo y/o como de sustitución y que no se alterara en presencia de infección; perlon, nailon, supramid, silastic, ivalon, poliéster, polipropileno (pp), politetrafluoroetileno (PTFE) y rhodergon serían los más utilizados [41] [42] [43]. En los últimos 20 años tanto el polipropileno como el poliéster y el politetrafluoroetileno se han convertido en los materiales más comúnmente extendidos en la cirugía de pared abdominal [44]. Todos ellos con buena capacidad de poder ejercer su función con buena respuesta por parte del tejido huésped sin perder resistencia pero con diferencias entre ellos según sus propiedades estructurales.

Con el fin de conseguir una mejor integración en términos de incorporación y estabilidad mecánica, últimamente se han modificado algunas de las propiedades estructurales de estos materiales, desarrollando aspectos de su biocompatibilidad, biodegradabilidad [45].

La introducción de las prótesis así como el avance de nuevas técnicas quirúrgicas como la laparoscopia [46], facilitando la reparación sea cual sea la superficie dañada, ha dado un sentido simplificador a este tipo de cirugía de la pared abdominal. Sin embargo aún estamos lejos de conseguir una restauración óptima como lo demuestran tasas de recidiva del 20% [3] y alteraciones de la funcionalidad del abdomen [47]. Existe un importante vacío entre el conocimiento de las bases que correlacionan la estructura con el comportamiento funcional, bioquímico y mecánico de la pared. Otros aspectos de reparación que se han tenido en cuenta y que hoy se están re-evaluando como: -los derivados del propio paciente (calidad de la zona de anclaje, patología asociada, nutricionales) [48][49][50]; -los anatómicos y quirúrgicos (correlación existente entre distribución anatómica, funcional y ultraestructural así como los propios de las técnicas quirúrgicas) [51]: - y los relacionados con la gestión de unidades de cirugía sin ingreso (UCSI)/ cirugía de corta estancia y con la ILT y con el coste [52], son básicos para aproximarnos a la ya citada reparación ideal u óptima.

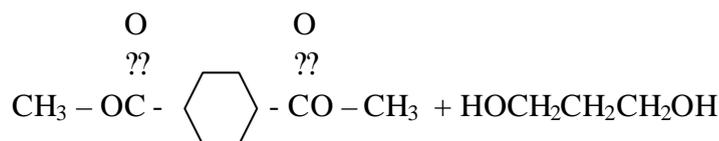


Fig. 1. Representación bioquímica de los polímeros.

Estructura de cadena molecular con Base de carbono y unidas mediante enlaces covalentes o puentes de hidrógeno

2.1.5 Estado actual en la investigación de los biomateriales blandos. Prótesis de segunda generación

El material óptimo queda definido como aquel que posee una elevada biocompatibilidad (capacidad de poder realizar su función con una buena respuesta del receptor) y un buen comportamiento mecánico con una baja tendencia a formar adherencias a nivel del peritoneo visceral [53]. El tamaño de su entramado poroso es de suma importancia en la completa integración al huésped y en el desarrollo de defectos secundarios derivados de la misma integración [54]. En orden a esto, la última clasificación propuesta para los polímeros blandos utilizados en cirugía de pared abdominal es, *Tabla 1*:

| Tipos | Características |
|----------|--|
| Tipo I | <i>Macroporosos</i> (> 75? m). Atrium? ; Marlex? ; Prolene? doble filamento; Surgipro? monofilamento; Trilex? . Buena incorporación de macrófagos, fibroblastos, vasos y fibras de colágeno |
| Tipo II | <i>Microporosos</i> (10–20? m). Gore-Tex? ; membrana quirúrgica; Dual-Mesh? |
| Tipo III | <i>Macroporosos- multifilamento y microporosos</i> Teflón? ; Dacron? ; Surgipro? multifilamento; Mycro-Mesh? |
| Tipo IV | <i>Submicroporosos</i> Silastic? ; Cellgard? ; Preclude Membrana Pericárdica? ; Preclude Dura Substitute? . Normalmente se utilizan en combinación con los tipo I |
| Tipo V | <i>Composites (macro/micro)</i> Parietex composite? (sofradim) ; Bard? -Composix? |

Tabla 1. Clasificación biomateriales basada en el tamaño de sus poros. [45]

La mayoría de los estudios de investigación en biomateriales blandos están de acuerdo en que la prótesis que más se acerca a la definición de material óptimo es el polipropileno. Sin embargo su potencial de inducción de respuesta inflamatoria es tan alto que se han visto efectos locales negativos tales como: adherencias, movilidad abdominal limitada, etc. [47].

El diseño de polímeros combinando prótesis laminares con reticulares (irreabsorbibles o no), han sido las últimas aportaciones en este terreno [55][56][57][58]. También se han empleado barreras biológicas mediante procedimientos de pretratamiento de las prótesis, que tienen como finalidad crear una interfase entre éstas y las zonas de contacto. Las más conocidas actualmente son: la celulosa, el ácido hialurónico, la fibrina y la fosfatidil-colina [59]. Para adaptarlos a las mejores condiciones anatómicas y funcionales de la pared abdominal estos materiales han sufrido modificaciones de sus propiedades estructurales: porosidad, grosor y volumen.

Con la llegada de los materiales compuestos en esta última década y teniendo en cuenta que dos de los principales problemas del uso de los mismos han sido la formación de adherencias y la creación de un conjunto prótesis-tejido neoformado rígido y molesto para el paciente, los trabajos experimentales han ido encaminados a valorar los aspectos de adaptabilidad del nuevo sistema creado en la pared del abdomen, tales como deformación, rigidez y viscoelasticidad [60][61]. La mayoría de estos modelos experimentales implantan las mallas sobre las superficies musculares y peritoneales, siendo caracterizadas posteriormente las propiedades mecánicas mediante estudios de tensiometría (sobre todo de resistencia a la tracción) y mediante técnicas de estereografía tridimensional [47][62][63].

Finalmente la futura era de los biomateriales, ya abierta en la década de los 90, se enmarca dentro del campo de la ingeniería de tejidos que trata de aplicar los principios de la biología y la ingeniería al desarrollo de sustitutos viables capaces de restaurar, mantener y mejorar la función de los tejidos humanos. Difiere de las terapias convencionales en que el tejido creado se integraría completamente y aportaría un potencial permanente de cura específica. El objetivo no es solo crear materiales inertes o biodegradables sino con capacidad de responder al medio celular y extracelular existente mediante el reconocimiento biológico de elementos como proteínas, proteoglicanos, moléculas de adhesión, etc.. Las diferentes vías para conseguir estos logros están siendo: - diseño y cultivo de tejidos humanos fuera del organismo para su posterior reimplantación; - implantación de dispositivos que induzcan la regeneración funcional de tejidos humanos (moléculas de señalización, polímeros de configuración tridimensional, etc.); - desarrollo de otros dispositivos que contengan tejidos humanos destinados a reemplazar la función de órganos enfermos (aislamiento celular, creación de superficies de matriz extracelular, etc.). A través de estos mecanismos los materiales

podrían compartir sus “ mensajes “ con el medio biológico circundante, proporcionando señales morfogenéticas para promover la regeneración tisular [64] [65] [66].

2.2 RESPUESTA METABÓLICA-INFLAMATORIA SISTÉMICA Y LOCAL FRENTE AL “ CUERPO EXTRAÑO “

Todo acto quirúrgico supone por sí mismo una agresión que origina una respuesta sistémico-local, siendo ésta proporcional a la magnitud de la intervención quirúrgica. En esencia se trata de una respuesta homeostática para mantener el equilibrio del medio interno, evitando que se produzcan grandes variaciones físico-químicas. En ella intervienen reacciones neurológicas que favorecen la liberación de sustancias con acciones vasculares, metabólicas y endocrinas. Todas ellas intervendrán en los mecanismos moleculares y celulares que inician y mantienen el proceso reparador. Conseguir una restauración adecuada del tejido dañado es el principal objetivo de la cascada de acontecimientos que se desencadenan localmente e influidos por las acciones sistémicas. En primer lugar la inflamación como mecanismo neutralizador y posteriormente la reparación como mecanismo reconstructor, constituirán las bases de lo que está ocurriendo localmente en los tejidos.

2.2.1 Regulación endógena

Se trata de un mecanismo filogenético primitivo porque tras la agresión se puede suponer que los animales superiores no tendrán un aporte exógeno adecuado, precisando de mecanismos homeostáticos que permitan su supervivencia a expensas de su propia estructura orgánica y sin rebasar los límites tolerables del medio interno [67].

Considerada esta respuesta metabólica de un modo unitario, se trata de un verdadero proceso que consta de varias fases [68]:

- *primera o fase de lesión.* Comprende los 3 o 4 primeros días tras la cirugía. Predomina una vasoconstricción periférica desde el punto de vista vascular mantenida por la liberación de catecolaminas y corticosteroides (ACTH), seguida de una vasodilatación más acusada en el lecho venoso. En la orina se observa un aumento en la liberación de potasio y una reducción de la de sodio. Se desencadena un balance nitrogenado negativo. Los cambios hormonales más

importantes son: - *aumento de catecolaminas*, sobre todo de noradrenalina (con efectos vasomotores y de emergencia metabólica); - *liberación de ACTH*, y *hormona de crecimiento (HGH)* (con activación de la glucogenolisis e inhibición de la secreción y acción periférica de la insulina, así como estimulación de la neoglucogénesis hepática). Son también atribuibles al cortisol los *cambios producidos en las concentraciones plasmáticas de aminoácidos*, sobre todo de los esenciales y aromáticos como consecuencia del estímulo de la proteolisis.

El sistema inmunitario también se ve alterado. Las principales modificaciones encontradas son: - *descenso de los linfocitos T colaboradores*, a consecuencia de una menor proliferación blastogénica linfocitaria y de linfoquinas; - *aumento de los linfocitos T supresores circulantes*; - *descenso del índice opsónico del plasma y de la α_2 -glicoproteína de superficie*, lo cual indica una menor actividad macrofágica.

- *segunda o de punto crítico y de retirada de ACTH*. 4º y 8º día tras la cirugía. En esta fase descende la eliminación urinaria de nitrógeno con tendencia a la nivelación de su balance, así como de potasio y de los metabolitos hormonales. En sangre hay una tendencia a una normalización de los niveles hormonales.
- *tercera o de reconstrucción del cuerpo*. En ésta el balance nitrogenado se hace positivo.
- *cuarta o de ganancia de grasas*. En ella se restauran los depósitos grasos y proteicos. Dura aproximadamente un mes.

A nivel local, como resultado de la vasodilatación venosa, se produce la formación de un exudado celular y proteico propios. Las fases desarrolladas a este nivel son:

- *inflamatoria*, caracterizada por una respuesta celular secuencial y ordenada.
- de *neovascularización*, basada en sustituir los vasos perdidos en la producción de la herida y en mejorar las condiciones metabólicas del campo cicatricial. Esto se lleva a cabo mediante procesos de gemación, duplicación o a partir de moldes de células endoteliales procedentes de los vasos rotos [69]. Más recientemente se ha visto la relación de algunos mediadores, factores de crecimiento celular, con la neovascularización precoz [70].

- *fase de fibroplasia*, en ésta la población celular predominante es la de fibroblastos que proceden de las células mesenquimales locales, sobre todo de las relacionadas con la adventicia vascular. Tienen como misión fundamental sintetizar y segregar los componentes básicos del tejido conectivo como son las fibras de colágeno y los polisacáridos de la matriz extracelular. En estados patológicos y/o de remodelación de las heridas presentan heterogeneidad de forma y función; en cultivo desarrollan una gran variedad de estados proliferativos, perfiles de síntesis de proteínas de matriz y marcadores fenotípicos. Son células móviles que adquieren un carácter especializado por la influencia de un estrés mecánico ejercido sobre la herida a lo largo de las diferentes fases de la cicatrización, teniendo un importante papel en el establecimiento de la tensión y contracción de la misma [71].
- *fase de colagenización*, que tiene lugar a partir del 5º-7º día de haberse producido la herida y con un pico máximo en el transcurso de la tercera semana. En estos momentos la cicatriz alcanza el mayor volumen al tiempo que se consigue la unión firme de los bordes de la herida. Se caracteriza básicamente por la síntesis de colágeno [72].
- *fase de remodelado*, (alcanza su pico máximo entre los meses 6º y 12^{avo}) caracterizada porque la masa cicatricial pierde en volumen y gana en resistencia a la tracción como expresión de una cada vez más íntima interacción entre los cambios citológicos desarrollados (especialización del fibroblasto en miofibroblasto maduro, mediante la expresión de proteínas musculares) y el estrés mecánico al que se ven sometidos los tejidos dañados. Disminuye la población celular y se re-adaptan los componentes extracelulares (fibras y proteínas) consiguiendo un repartimiento de fuerzas entre ambos más equilibrado. Al final del proceso de remodelación los miofibroblastos se verán protegidos por una matriz extracelular (MEC) que es la que soportará en el futuro la tensión y resistencia del nuevo tejido formado. Los miofibroblastos pueden entonces desaparecer por apoptosis o contraerse de nuevo. A pesar de que la generación de la fuerza viene mediada fundamentalmente por el miofibroblasto, es posible que una segunda célula pueda remodelar y depositar MEC nueva. Hoy por hoy todavía se desconocen los mecanismos por los que una matriz de colágeno puede ser remodelada y acortada. Existen diversos

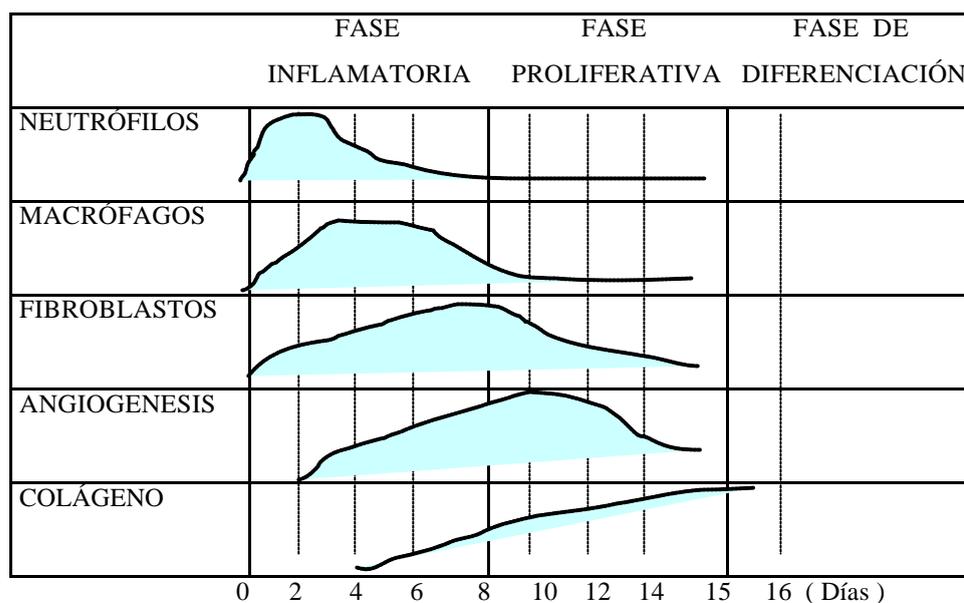
trabajos que demuestran que los enzimas proteolíticos se expresan en los tejidos de granulación y fibróticos, pero no se conoce cómo se coordina su actividad para la remodelación. Del mismo modo tampoco se conoce cual es el efecto de la expresión de diferentes tipos de colágenos que se observan en los tejidos de granulación sobre la remodelación del propio colágeno [73].

- *fase de epitelización*, la cual es una excepción en ciertos tejidos, no así a nivel de los epitelios de revestimiento. No todos los epitelios se regeneran igual. La magnitud de la regeneración estará en relación inversa con el grado de diferenciación del epitelio en cuestión.

En general todos estos procesos locales se pueden reagrupar en tres grandes fases sucesivas, aunque se superponen in vivo, *Esquema 1* :

- **Fase preparatoria**, de carácter inflamatorio, con hipermeabilidad de sustancias activas; asociada a procesos trombóticos locales y acúmulo de células blancas y macrófagos.
- **Fase proliferativa**, centrada en la aparición de fibroblastos y de las primeras fibras colágenas.
- **Fase de diferenciación**, en la que se completa el crecimiento vascular y ocurre el remodelado del colágeno.

La presencia de un cuerpo extraño en el organismo y más concretamente la de los biomateriales utilizados en la reparación de los defectos de la pared del abdomen, no modifica la secuencia de acontecimientos descritos [54]. El proceso inflamatorio alrededor de los materiales puede persistir por años. La adaptación de la interfase prótesis-tejido receptor dependerá básicamente de las propiedades físicas y estructurales del material sintético. La mayoría de los polímeros utilizados muestran con el tiempo un decrecimiento de la reacción inflamatoria mejorando su integración en el tejido receptor, sobre todo si son materiales monofilamento [74].



Esquema 1. Fases de la cicatrización y respuesta morfológico-celular en el tiempo. [25]

2.2.2 Regulación exógena

En la última década han ido apareciendo un número importante de factores de crecimiento tisular procedentes de las diferentes estirpes celulares que participan en la reparación de los tejidos, *tabla 2*. Todos ellos juegan un importante papel en la división, migración y diferenciación celular, así como en la expresión proteica y producción enzimática. Tienen una potencial habilidad por la curación de las heridas estimulando la angiogénesis y la proliferación celular, afectando la producción y degradación de la matriz extracelular. Múltiples son los estudios experimentales que basan sus métodos en la manipulación de los mismos con la finalidad de conseguir una reparación tisular lo más adecuada posible, sobre todo en aquellas circunstancias donde la fase inflamatoria se cronifica debido a la permanente exposición con el cuerpo extraño implantado (biomaterial) [75]. Las acciones principales como promover la angiogénesis, la quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos y la remodelación de la matriz extracelular pueden verse modificadas. Un ejemplo de ello es la acción del factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), una de las citoquinas angiogénicas más potentes que existen; ésta estimula la replicación de fibroblastos y de células endoteliales en cultivo. La utilización de anticuerpos neutralizantes de bFGF disminuyó la actividad proliferativa de los fluidos obtenidos tras el implante de esponjas de polivinilo en animales de experimentación, así como la quimiotaxis celular y la neovascularización en estudios

realizados por diferentes grupos de investigación [76]. GF. Whalen y col. han demostrado que moléculas angiogénicas como la heparina administradas por vía endovenosa en ratas normales, muestran actividad biológica solo en aquellos lugares en los que los vasos han perdido su integridad como son las zonas de pequeños traumas [77].

Diferentes isoformas del factor de crecimiento plaquetario (PDGF) ejercen variables efectos sobre los dos tipos de colágenos más implicados en la reparación de los tejidos, pro α 1 (I) y pro α 1 (III) colágeno mRNA. Dímeros como el PDGF-AB favorecen sus depósitos. Se han tratado polímeros implantados en ratas con dichos sustratos obteniendo una inducción significativa de la reparación [78].

En 1980 RF. Furchgott y JR. Zawadzki descubrieron el factor de relajación endotelial (EDRF) y no fue hasta 1986 cuando se vio su equivalencia con el óxido nítrico (ON). Esto fue propuesto por el grupo de S. Moncada quien realizó una comparación farmacológica aproximada [79]. A partir de entonces se consideró a esta molécula como de máximo interés en la regulación vasomotora, observando una amplia acción multisistémica. Sobre la reacción inflamatoria postquirúrgica actúa favoreciendo la migración de macrófagos, inhibe la agregación plaquetaria, estimula la angiogénesis y la vasodilatación y es antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Esto último sugiere que el ON también es importante como modulador de la proliferación celular en la reparación de los tejidos. Tanto in vivo como ex vivo se han encontrado sustratos que pueden modificar la acción del ON localmente, tales como el γ -interferón, el lipopolisacárido (LPS) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Estos producen tanto ON como peróxido de hidrógeno, dos mediadores importantes en la reacción inespecífica contra el huésped [80].

Desde 1978 E. Seifter y col empiezan a utilizar dietas suplementadas con arginina tanto en animales de experimentación como en humanos, demostrando que el metabolismo de la misma a nivel de la herida y/o zona de implantación de prótesis y en unas fases muy precoces, jugaba un papel crucial para la recuperación de la inflamación y de la infección tisular [81].

Posteriormente A. Barbul correlaciona la carencia de algunos nutrientes y la exposición a una malnutrición calórico-proteica (MCP) durante cortos periodos de tiempo en animales de experimentación, con una deficiente síntesis de ON y por lo tanto con una cicatrización defectuosa [82]. Mientras que los niveles plasmáticos de los parámetros nutricionales y la concentración de aminoácidos en los animales de

experimentación sometidos a cambios nutricionales (grupos control y grupos con aportes deficitarios) fueron muy parecidos, los depósitos a nivel de los tejidos reparados y sus fluidos sí sufrieron cambios significativos, resultando en una disminución importante de la hidroxiprolina (precursor de colágeno). Ello confirmaba la existencia de diferentes mecanismos a nivel local o tisular que sí se veían alterados por los aportes exógenos [83]. Este mismo autor observó también localmente alteraciones en el fenotipo de los fibroblastos de los animales mal nutridos [84].

| FACTOR DE CRECIMIENTO | ORIGEN | EFFECTOS |
|----------------------------|--|--|
| EGF | Plaquetas | Proliferación queratinocitos |
| TGF- β | Macrófagos ; queratinocitos | Proliferación queratinocitos |
| HB-EGF | Macrófagos | Proliferación queratinocitos y fibroblastos |
| FGFs 1,2 y 4 | Macrófagos y células endoteliales | Proliferación fibroblastos y angiogénesis |
| FGF 7 (KGF) | Fibroblastos dérmicos | Proliferación queratinocitos |
| PDGF | Plaquetas; macrófagos y queratinocitos | Quimiotaxis y proliferación de macrófagos y fibroblastos; producción de matriz extracelular |
| IGF-1 | Plasma; plaquetas | Proliferación de células endoteliales y fibroblastos |
| VEGF | Queratinocitos y macrófagos | Angiogénesis |
| TGF- β 1 y β 2 | Plaquetas y macrófagos | Migración queratinocitos; quimiotaxis para fibroblastos y macrófagos y síntesis matriz extracelular y remodelación |
| TGF- β 3 | Macrófagos | Quimiotaxis |
| CTGF | Fibroblastos | Proliferación de fibroblastos |
| IL-1 β y α | Neutrófilos | Precoces activadores de factores de crecimiento |
| EDRF | células endoteliales | Vasodilatación |
| TNF- α | Neutrófilos | Precoz activador de factores de crecimiento |

Tabla 2. Principales factores de crecimiento (fc) en las heridas. EGF= fc epidérmico; TGF- β = fc transformador- β ; HB-EGF= fc epidérmico vinculante a la heparina; FGFs 1,2 y 4= fc fibroblásticos 1,2 y 4; FGF 7 (KGF)= fc queratinocítico; PDGF= fc derivado de las plaquetas; IGF-1= fc insulín-like; VEGF= fc del endotelio vascular; TGF- β 1 y β 2= fc transformador- β 1 y β 2; TGF- β 3= fc transformador - β 3; CTGF= fc del tejido conectivo; IL-1 β y α = interleukinas 1 β y α ; EDRF= factor de relajación endotelial; TNF- α = factor de necrosis tumoral α .

Es bastante probable también que una de las principales señales bajo las que están sometidos la mayoría de los tejidos conectivos y sus células tengan una base física y/o mecánica que los mantienen en una casi constante actividad, como ocurre con los

tejidos óseos, donde existe una íntima interdependencia entre la matriz remodelante y el estrés mecánico [85]. Con excepciones individuales, así como con la edad avanzada y en determinadas patologías del tejido conectivo, nuestros tejidos blandos no se encorvan ni se deforman e incluso en situaciones de relajación como puede ser el sueño, mantienen una tensión basal [86]. Este sistema mecano-transductor puede favorecer las adhesiones intercelulares y a la propia MEC, facilitar la transformación fenotípica de determinados grupos celulares y por último regular la expresión de un grupo de enzimas endopeptidasas, las cuales juegan un papel importante en la morfogénesis final del nuevo tejido constituido (metaloproteinasas, MMPs) [87].

2.3 ARGININA Y METABOLISMO: PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE CICATRIZACIÓN

Los avances en nutrición se han centrado en las acciones farmacológicas individuales de los aminoácidos y sus reacciones órgano-específicas. De esta manera la fenilalanina estimula el cerebro y la colecistoquinina intestinal; la tirosina de la dieta es un precursor de las catecolaminas y el triptófano es un precursor y estimulador a la vez de la síntesis de la serotonina. Dentro de este contexto, muchos trabajos han sido hechos revisando la función de la arginina como un agente terapéutico.

La arginina juega un papel importante en el proceso de cicatrización de las heridas. E. Seifter y col. demostraron que la adición de suplementos de la misma en la dieta de animales operados aumentaba los depósitos de colágeno en superficies subcutáneas donde se habían implantado esponjas de alcohol polivinilo y éstas a su vez resultaban ser más resistentes a las fuerzas de tracción [81]. Si bien, los mecanismos que mediatizaban estas respuestas no estaban lo suficientemente aclarados, sí se conocieron algunos cambios metabólicos locales que sufría dicho aminoácido para contribuir en la reparación de los tejidos dañados. No solo el servir como sustrato para la síntesis del ON, sino también la generación de ornitina explicaría la participación en el citado proceso. Tanto la presencia de ON favoreciendo la quimiotaxis celular, la inhibición plaquetaria y la vasodilatación como la de ornitina, acelerando los mecanismos para la síntesis de colágeno, han marcado el principal interés de la arginina como aminoácido trófico.

2.3.1 Bioquímica

Hace más de 40 años que la arginina se clasifica como un aminoácido semi-esencial. Esta clasificación fue propuesta por WC. Rose quien definió el concepto de esencialidad de los aminoácidos desde el punto de vista de la “ *capacidad de favorecer un crecimiento óptimo de los tejidos y de mantener un balance nitrogenado positivo* “. Este autor descubrió experimentalmente que las ratas adultas no requerían arginina de la dieta según los citados criterios mientras que las ratas jóvenes en crecimiento sí mostraban mayor desarrollo cuando la recibían. Estos hallazgos fueron interpretados como una consecuencia de la existencia de una biosíntesis endógena de este aminoácido adecuada en los animales maduros pero insuficiente en los inmaduros [88]. Posteriormente se vio que en situaciones de estrés quirúrgico y en personas adultas con enfermedades crónicas, el aporte exógeno también aceleraba la reparación de las heridas [89].

La arginina es un aminoácido hidrofílico alcalino que se sintetiza en la mayor parte de los casos en el hígado y en menor cantidad en el riñón. La forma más común de presentación es como L-arginina o clorhidrato de arginina, solución cristalina hipertónica al 10% (950 mOsm/L). Se trata de una sal monohidroclorada, dibásica (pH de 5 y 6.5). Es soluble en agua y alcohol. Tiene un contenido de clorhídrico de 0.475 mEq/ml. [90] *Fig. 2.*

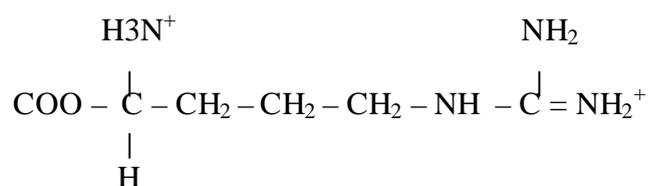


Fig.2. Fórmula bioquímica de la arginina

2.3.2 Fisiología

Farmacodinámica

Desde el punto de vista farmacodinámico tiene una actividad sistémica. Sus niveles de acción son múltiples:

- I. *Actividad endocrina.* La administración endovenosa de 30 g durante 30 minutos en personas adultas sanas (0.5 g/kg de peso en niños) y 7.5 g/l/día en ratas

estimula la glándula hipofisaria con la consiguiente elevación de los niveles de HGH en plasma [91]. Los mecanismos que podrían explicar dicha acción son todavía desconocidos.

Se ha comprobado igualmente su acción insulinogénica. La arginina actúa sobre las células β pancreáticas. Por otro lado la infusión endovenosa de este aminoácido es seguida de una elevación plasmática de glucosa [92] *Tabla 3.*

| | | |
|------------------|------------------------------|---|
| PITUITARIA | | |
| - | Hormona de Crecimiento (HGH) | ? |
| - | Prolactina | ? |
| PANCREAS | | |
| - | Insulina (?) | ? |
| - | Glucagón (?) | ? |
| - | Somatostatina | ? |
| - | Polipéptido pancreático | ? |
| GLÁNDULA ADRENAL | | |
| - | Catecolaminas | ? |

Tabla 3. Efectos hormonales de la Arginina.
Acciones secretagogas

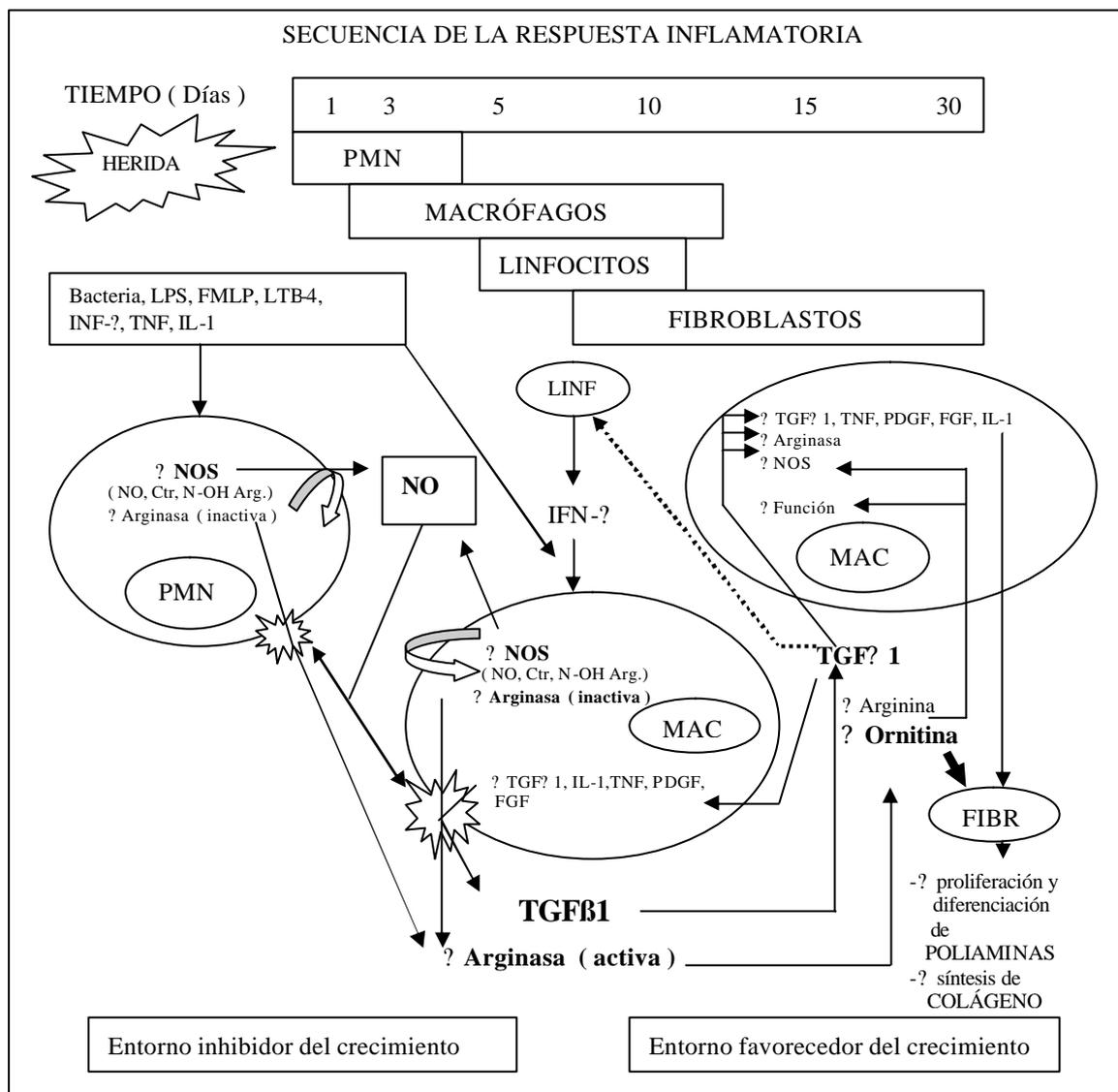
- II. *Arginina y cicatrización.* En 1976 E. Seifter, A. Barbul, G. Rettura y SM. Levenson demostraron la cantidad de este aminoácido necesaria para acelerar los procesos de reparación de los tejidos dañados en animales de experimentación sometidos a estrés quirúrgico y traumático. Estudiaron el efecto de la administración de 1% de suplemento de arginina en la dieta oral. La dosis endovenosa resultó ser de 0.81g de arginina/100ml de nutrición parenteral con 8.5% de concentración de aminoácido. En un principio estos autores postularon la idea de que los efectos reparativos sobre los tejidos vendrían mediatizados por la acción secretagoga que tiene sobre la HGH [93]. Más tarde en 1990 JE. Albina y col analizaron dos vías metabólicas para este aminoácido expresadas en los tejidos lesionados, las cuales estaban relacionadas con el tiempo y con el tipo de celularidad en esas fases de la reparación. La arginina podía ser metabolizada por las células inflamatorias muy precozmente, dando lugar a: - *citulina* y *ON* por la acción de la 1-arginina deaminasa (OAD) u óxido nítrico sintetasa (ONS) liberada de los polimorfonucleares (PMN) (dentro de las primeras 48 horas, h) y en - *ornitina* y *urea* por acción de la arginasa procedente de los macrófagos (a

partir de las 48/72 h). Los altos niveles de ON en las primeras horas (por la acción de la ONS) favorecerían la microbiostasis, vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria. Posteriormente, cuando empieza a darse la citólisis de los PMN, los depósitos de ornitina (por la acción de la arginasa) producirían un entorno favorable para la replicación de fibroblastos y para la síntesis de colágeno. Estos autores compararon los niveles de concentración de estos sustratos entre los tejidos agredidos y el plasma observando que eran inversamente proporcionales [94].

Recientemente los estudios realizados sobre el metabolismo de la arginina y su implicación en la reparación tisular analizan con mayor detalle la relación existente entre las dos vías de degradación más importantes de ésta: ONS y arginasa, indicando que la expresión de una puede modular la síntesis de la otra, teniendo como resultado un nuevo sustrato tisular más organizado donde intervienen una gran cantidad de factores intermediarios de la inflamación, constituyendo un complejo metabólico-celular autorregulador [95] *Esquema 2*.

Cambios en la disponibilidad de la arginina como sustrato probablemente juegan un importante papel en la actividad recíproca de los dos enzimas citados. En modelos experimentales con animales se ha evaluado la remodelación vascular tras angioplastias al perfundir perivascularmente con este aminoácido, observándose una reducción de la hiperplasia de la íntima y de las células musculares subendoteliales (favoreciendo indirectamente la permeabilidad vascular) a expensa de una acción bloqueadora que el ON tiene sobre la mitosis en fase G₂ del ciclo de división celular [96], explicando en parte el efecto inhibitor del crecimiento que éste tiene sobre los tejidos en fase de reparación (entorno inhibitor del crecimiento). Esto se ha podido trasladar a cualquier tipo de herida y sobre todo en aquellas en las que permanece una actividad de reparación casi constante como ocurre ante la presencia de un cuerpo extraño (biomaterial), donde es importante la actividad de este entorno inhibitor del crecimiento para no generar reparaciones patológicas. Por otro lado la presencia de ornitina por un estímulo de la actividad arginasa procedente de la arginina proporciona al nuevo tejido en formación una reserva real para la síntesis de novo de prolina, principal precursor del colágeno. Existen múltiples trabajos experimentales que potenciando la actividad arginasa consiguen cambios en las

concentraciones de poliaminas, proteínas básicas para generar un entorno favorecedor del crecimiento y una mayor maduración de los tejidos [97] [98].



Esquema 2. Esquema para la regulación del metabolismo de la arg durante la cicatrización de las heridas. PMN= polimorfonucleares neutrófilos; LINF= linfocitos; MAC= acrófagos; FIBR= fibroblastos; NO= óxido nítrico; NOS= óxido nítrico sintetasa; LPS= lipopolisacárido; FMLP= formylmetionina-leucina-fenilalanina; LTB-4= leucotrieno B₄; INF-?= interferón gamma; TNF= factor de necrosis tumoral; IL-1= interleucina-1; CTR= citrulina; TGF ? 1= factor transformador del crecimiento ? 1; PDGF= factor de crecimiento derivado de las plaquetas; FGF= factor de crecimiento de fibroblastos; N⁶-hidroxil-L-Arginina [95].

Últimamente también se ha visto que intermediarios bioquímicos, biofísicos y biomecánicos específicos como citoquinas frente a Th2 [99], factores de crecimiento [100], hipoxia [101], fuerzas de tracción [102] están considerados como factores que aumentan la disponibilidad de la arginina vía arginasa durante el proceso de reparación de los tejidos. Existen dos isoformas

distintas de arginasa (arginasa I y II), las cuales están codificadas por diferentes genes, diferenciándose en sus propiedades moleculares e inmunológicas, en su distribución en los tejidos y en su regulación de expresión. La clonación de estas dos isoformas también ha ayudado a reconocer la imbricación existente entre ellas y a entender mejor sus funciones (isoformas de arginasa como reguladoras en la síntesis endotelial de ON y en la actividad ornitina) [103]. Ambos enzimas ejercen una acción competitiva local con la ONS, reduciendo la disponibilidad de la arginina para la síntesis del ON. El resultado final sería el aumento en la producción de ornitina. La función de la ornitina en la aceleración del proceso de cicatrización puede estar relacionado con la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y con el aumento de la actividad de las prostaglandinas (PGs) [104].

Se conoce una familia de enzimas, endopeptidasas dependientes del zinc, MMPs (metaloproteinasas), capaces de degradar algunos de los componentes de la MEC. Pueden derivar de un gran número de tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. En general no son expresadas en la piel, pero son inducidas temporalmente en respuesta a señales externas como citoquinas, factores de crecimiento, interacción de células de MEC y contactos alterados de célula-célula [105]. Existen evidencias de que las MMPs juegan un papel importante en la remodelación de la MEC, incluyendo morfogénesis-reparación de tejidos y angiogénesis [106]. También se han podido relacionar con diversas situaciones patológicas del tejido conjuntivo como la patología herniaria del abdomen, dada la susceptibilidad de algunos fibroblastos en su degradación mediante estas colagenasas. Se ha relacionado la expresión de algunos de estos enzimas (MMP-2 y MMP-1) con desórdenes en los depósitos de colágenos en pacientes con hernias inguinales e incisionales, encontrando una disminución de la fracción (Col = colágeno) Col I / Col III a expensas de un aumento del Col III (más inestable e inmaduro) [28] [107]. Las MMPs están siendo uno de los aspectos de interés bioquímico-moleculares en los procesos de cicatrización por ser factores potenciales de intervención (sobre todo en las últimas fases de la cicatrización). Parece ser que la arginina puede estar ejerciendo un papel importante en la expresión de algunas MMPs. No se conoce exactamente cual sería su mecanismo de acción [108] [109].

III. *Actividad timotrópica*. Los mecanismos exactos de la actividad timotrópica de la arginina son desconocidos. Las hipofisectomías suprimen dicho efecto [92]. En este sentido muchos trabajos postulan que los beneficios de este aminoácido sobre el sistema inmunitario vienen regulados por la HGH, son dosis-dependientes y rápidos en el tiempo. Una vez se consigue el efecto, mayores dosis suplementarias del mismo no inducen respuesta. Las principales acciones son:

- aumentar el peso de la glándula tímica
- aumentar la celularidad de la glándula tímica
- estimular la blastogénesis tímica con Concana valina A¹ (Con A) y Fitohemaglutinina¹ (PHA)
- estimular la blastogénesis en sangre periférica con Con A y PHA
- aumentar la reacción de la hipersensibilidad retardada

IV. *Actividad antitumoral*. Aunque desde hace más de 50 años se conocen estudios usando arginina en la inducción de distintos modelos tumorales, al parecer modificando diferentes agentes químicos, estos no están lo suficientemente documentados desde el punto de vista metodológico para llegar a unas conclusiones claras y fiables. Es cierto que existen dos mecanismos a través de los cuales se ha visto la influencia de este aminoácido en la modulación tumoral: - reconociendo los propios antígenos tumorales y - ejerciendo una acción antitumoral. Ambos mecanismos están relacionados con su actividad timotrópica [87].

Farmacocinética

La concentración plasmática basal de arginina está alrededor de 2 $\mu\text{mol/ml}$. La administración endovenosa de 30 gr durante 30 minutos en personas adultas alcanza un pico máximo de aproximadamente 8 $\mu\text{mol/ml}$ y durante una hora se consigue un remanente de 4 $\mu\text{mol/ml}$. La administración oral consigue los picos máximos en plasma alrededor de las 2h, siendo muy buena la absorción a través del tracto digestivo [93].

La arginina se distribuye satisfactoriamente por todo el organismo. Es incorporada y metabolizada sobre todo en el hígado por hidrólisis a través de la arginasa formando parte del ciclo de la urea. Filtrada por los glomérulos y en parte reabsorbida por los túbulos renales, es eliminada por el riñón.¹

¹Agentes Mitógenos

Se establecieron los niveles tóxicos (DL50%)² en superiores a 30 gr/l en personas adultas y mayores de 7.5 gr/l para los animales pequeños de laboratorio, administrados por vía endovenosa [110].

Los efectos adversos y tóxicos son escasos, tanto para la administración endovenosa como oral. Los más importantes son [93]:

- náuseas y vómitos, letargo, irritación venosa
- disminución plaquetaria y anemia
- elevación de la urea y creatinina en plasma así como de los productos de degradación
- nitrogenados (B.U.N.)
- hiperglicemia, hipofosfatemia e hipercalcemia
- esteatosis hepática

Implicaciones terapéuticas

- *Suplemento nutricional.* La arginina ha sido utilizada como suplemento nutricional en aquellas situaciones en que ha habido un aporte proteico deficiente; en pacientes con dibasicaminoaciduria y argininosuccinico aciduria; o en administraciones prolongadas de nutrición parenteral (NPT) en donde se ha visto hiperamonemia, para reducir los niveles en plasma de este mineral [111].
- *Corrección de desórdenes del equilibrio ácido-base.* Dado su alto contenido en clorhídrico, han sido recomendadas perfusiones endovenosas de arginina para el manejo de alcalosis metabólicas extremas [112].
- *Corrección del balance nitrogenado.* En situaciones de estrés como la cirugía, traumatismos, desnutrición, etc [113].
- *Otros.* En el tratamiento de encefalopatías severas, sobre todo debido a situaciones de hiperamonemia [114].

²DL50%=dosis letal 50

2.4 MODELOS EXPERIMENTALES “ IN VIVO “ EN LA CIRUGÍA DE PARED ABDOMINAL

Aunque el uso de biomateriales en la cirugía de pared abdominal data de los años 1890 - 1895, no es hasta 1960 - 1970 cuando comienzan a realizarse los verdaderos estudios experimentales en términos de respuesta celular y extracelular frente al cuerpo extraño.

M. Adloff, R. Bourgeon y FC. Usher, comunicaron los primeros resultados experimentales sobre el comportamiento tisular de los polímeros en función del tiempo y del lugar de implantación, observando que la reacción vascular y fibrótica se intensificaba a partir de la segunda semana tras el implante y que la colocación intraperitoneal de las prótesis generaba una formación importante de adherencias. Los animales de experimentación utilizados fueron conejos y perros [115] [116] [39].

Más tarde con la incorporación del e-PTFE al mercado se realizarían estudios comparativos con otros polímeros ya en uso como el pp. Hasta el momento éstos se centraban en el análisis de la respuesta inflamatoria desde las primeras semanas tras el implante hasta el tercer o cuarto mes. Se utilizaban conejos Nueva Zelanda y ratas Sprague Dawley. Los diseños quirúrgicos experimentales consistían en implantar las prótesis creando o no defectos de pared o bien resecaando vainas aponeuróticas y sustituyéndolas por dichas prótesis [117] [118] [119]. Estos trabajos sugirieron que eran muy importantes las características estructurales de las prótesis para el correcto desarrollo del proceso de cicatrización. A partir de entonces se pondría más interés en interrelacionar los aspectos histológicos con los mecánicos de resistencia, centrándose los estudios en el análisis de las interfases prótesis-tejido de anclaje, prótesis-tejido celular subcutáneo y prótesis- peritoneo visceral [120] [121]. Los estudios histológicos con tinciones básicas (hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson), fueron complementados con estudios de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales específicos para determinadas estirpes celulares y estudios de microscopía electrónica. Durante muchos años los aspectos mecánicos resultantes de la interfase prótesis-tejido de anclaje fueron interpretados valorando solo la resistencia a la tracción o fuerza tensil ejercida sobre ellos al utilizar máquinas de ensayo especiales. Con la llegada de los materiales compuestos en esta última década y teniendo en cuenta que dos de los principales problemas del uso de los mismos han sido la formación de adherencias y la creación de un conjunto prótesis-tejido neoformado rígido y molesto para el paciente, los trabajos experimentales han ido encaminados a valorar los aspectos de adaptabilidad del nuevo sistema creado en la pared del abdomen, tales como

deformación, rigidez y viscoelasticidad [60] [61]. Todo ello subrayando la importancia que tienen tanto la estructura porosa como la densidad y volumen de los materiales en su comportamiento clínico, histológico y mecánico.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y UNIDAD TEMÁTICA

Hemos planteado esta Tesis Doctoral como una aproximación al estudio de la **integración de biopolímeros en la pared abdominal**, determinando que esta es susceptible de ser modificada a diferentes niveles. Presentamos una recopilación de trabajos que resumen posibles distintas formas de mejorar la calidad de incorporarse los materiales más comúnmente utilizados en la patología herniaria abdominal, teniendo en cuenta tres campos de actuación o dianas:

- *la técnica quirúrgica*, analizando el mejor lugar de implantación y calidad de las interfases y fascias circundantes.
- *la manipulación exógena farmacológica con clorhidrato de Arginina*, como precursor para la síntesis de colágeno y depósito de componentes de matriz extracelular
- *las propiedades mecánico-estructurales de:* - algunas prótesis de segunda generación (composites), poniendo especial énfasis en su estabilidad mecánica a largo plazo. Materiales que normalmente son utilizados en situaciones de grandes defectos y que deben ser implantados en contacto directo con las superficies viscerales; - el monofilamento de polipropileno, concretamente caracterizando su relajación de tensiones y sus mecanismos de fractura (en un modelo ex vivo)

Se ha diseñado un mismo modelo experimental con animales pequeños de laboratorio, ratas Sprague-Dawley en etapa de crecimiento estable (4 meses de edad), con específicas diferencias de técnica quirúrgica y aporte exógeno farmacológico, según las hipótesis planteadas. Algunos estudios se han realizado ex vivo, concretamente los que se refieren a la comparación de los rasgos mecánicos de las prótesis más comúnmente utilizadas y la malla Bard®-Composix™ y los que se refieren a la caracterización de los mecanismos de fractura y relajación de tensiones del monofilamento de polipropileno.

Los trabajos han sido realizados y publicados por nuestro equipo formado por el Grupo de Estudios de la Matriz Extracelular del Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (C.I.B.B.M), Unitat Recerca Biomèdica (trabajoV) y por el Departamento de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Han participado también el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de

Barcelona, Universidad Politécnica de Cataluña (UPC) y el Centro de Investigaciones en Ingeniería Biomédica de la Universidad Politécnica de Cataluña.

3.1 HIPÓTESIS

3.1.1 Aspectos anatómo-quirúrgicos y capacidad de integración de las prótesis

Hipótesis: *Para un mismo material, el grado de integración y las prestaciones mecánicas conseguidas variarán en función del lugar de su implante en diferentes estratos de la pared abdominal.*

El lugar óptimo de colocación de las mallas es aún un tema de controversia. Los autores revisados basan sus recomendaciones en criterios de práctica quirúrgica y apenas existen estudios experimentales.

Ante los movimientos de la pared abdominal, se producen tensiones mecánicas que deben ser absorbidas por las diferentes estructuras anatómicas. El grado de transición gradual de la carga entre la prótesis y los tejidos circundantes, podría condicionar la futura estabilidad del abdomen artificial.

3.1.2 Modulación exógena de los procesos de integración / reparación de los biomateriales y la pared abdominal respectivamente

Hipótesis: *La administración de Clorhidrato de Arginina podría optimizar la integración no tan solo incrementando la infiltración celular y la angiogénesis, sino consiguiendo una remodelación más fisiológica de la MEC y sus principales componentes (depósitos de colágeno), a nivel de la interfaz prótesis-tejido receptor, promoviendo una fijación más adecuada: -fuerte (capaz de resistir fuerzas externas) y -eficaz (adaptable morfológica y funcionalmente a los requerimientos de la pared abdominal en movimiento).*

El proceso de cicatrización podría ser susceptible de ser estimulado exógenamente mediante el aporte de intermediarios precursores para la síntesis de colágeno y el depósito de componentes de la MEC, mejorando la integración de materiales heterólogos a tejidos orgánicos. Muchos trabajos reconocen que el metabolismo de la arginina en el lugar de la herida no solo es importante como sustrato para la síntesis de ON, sino que además actúa como precursor de la ornitina y por lo tanto para la síntesis de prolina, precursor este último del colágeno. La administración

de arginina en unas fases precoces tras el implante de prótesis (tanto en modelos animales como en modelos humanos), donde predomina la infiltración celular de PMN y macrófagos (primeras horas tras la cirugía hasta la primera semana), genera un entorno favorecedor para la microbiostasis, vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y depósito de precursores del colágeno, potenciada sobre todo por la acción local del ON inicialmente (primeras 24/48h) y por la acción de la ornitina posteriormente (tras las 48h). La conducta de estos implantes dentro de las primeras horas/días bajo la influencia de este aminoácido, probablemente sea un reflejo de los resultados de la integración a largo plazo y tras una administración continuada de este aminoácido. No existen trabajos que aporten suficientes datos sobre esta respuesta modificada de integración bajo la influencia, prolongada en el tiempo, de la arginina.

3.1.3 Importancia de las propiedades mecánico-estructurales en la incorporación a los tejidos

Hipótesis: *La investigación en biomateriales debe conducir al diseño de prótesis nuevas que utilicen materiales nuevos y/o exploten las ventajas individuales de otros ya existentes y debe contribuir a mejorar el rendimiento a largo plazo de intervenciones quirúrgicas en las que se precise de su implante. La combinación en una nueva prótesis de dos capas de polipropileno (pp) y una de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), podría ser una buena aproximación a la reparación de grandes defectos de pared. Ventajas del nuevo constructo: dos capas de pp con poro aumentado facilita la reacción e infiltración de fibroblastos. El e-PTFE con poro disminuido, facilita una barrera al contenido visceral. La reducción en cantidad de material (densidad de 0.14-0.15 g/cm³), facilita adaptación a la anatomía y a la estructura funcional de la pared del abdomen.*

La integración de mallas depende primero de sus propiedades textiles y físicas y segundo de su química o del producto manufacturado.

Hipótesis: *La conducta del monofilamento de polipropileno es viscoelástica y por lo tanto presenta fenómenos de fluencia y relajación de tensiones que pueden estar influidos por factores como la temperatura del medio.*

En la práctica quirúrgica diaria sería interesante conocer previamente la curva de relajación de tensiones de estos materiales para implantarlos con cierto grado de holgura sobre todo en situaciones de cirugía agresiva como la de urgencias donde

muchas veces la sepsis, el trauma quirúrgico, etc. pueden alterar la respuesta biomecánica de los mismos.

3.2 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo principal

El **objetivo principal** de esta Tesis ha sido **valorar si la capacidad de integración de un biomaterial en la pared abdominal es susceptible de ser mejorada.**

Se ha desarrollado a partir de tres objetivos concretos que han dado lugar a los cinco trabajos objeto de esta Tesis Doctoral.

3.1.2 Objetivos específicos

I. El **primer objetivo** ha sido estudiar la influencia del lugar de implantación sobre la interacción del conjunto **prótesis-tejido neoformado**. Dos diferentes estratos de la pared abdominal se escogieron: - *estrato superficial o pre-aponeurótico, situado entre el tejido celular subcutáneo y la aponeurosis anterior de los músculos recto y oblicuo mayor (subcutáneo), E-S* y - *estrato profundo o pre-peritoneal, situado entre la aponeurosis posterior del estrato muscular y el peritoneo parietal (submuscular), E-P.*

II. El **segundo objetivo** ha sido analizar los efectos beneficiosos que sobre la integración de materiales puede tener un **suplemento adicional de arginina** (administrado a nuestros animales de estudio) en términos de una *respuesta tisular (celular y extracelular) y su traducción en una mejora en la adaptabilidad y comportamiento mecánico a nivel de la interfaz prótesis-tejido receptor.* Se analizó todo ello también en los diferentes estratos de la pared abdominal seleccionados (E-S y E-P).

III. El **tercer objetivo** se centra en la **evaluación de una nueva malla compuesta** (pp y e-PTFE modificadas), buscando si aporta diferencias en la adaptabilidad a largo plazo. Estudios in vivo y ex vivo.

IV. El **cuarto objetivo** determina la fatiga que experimenta un biomaterial al aplicársele una fuerza extrínseca en función del tiempo y la temperatura, analizando la importancia que esto puede tener en la práctica quirúrgica. Estudio ex vivo.

3.3 PUBLICACIONES

Trabajo nº I, f.i.: 1.777 [15]

Early imaging of integration response to polypropylene mesh in abdominal wall by environmental scanning electron microscopy: comparison of two placement techniques and correlation with tensiometric studies. José M. Ferrando; José Vidal; Manuel Armengol; Pedro Huguet; Javier Gil; José M. Manero; José A. Planell; Alfonso Segarra; Simón Schwartz; María A. Arbós. *World Journal of Surgery*, 2001; 25:840-847

Trabajo nº II, f.i.: 0.996 [24]

Stress relaxation tests in polypropylene monofilament meshes used in the repair of abdominal walls. FJ. Gil; JM. Manero; JA. Planell; J. Vidal; JM. Ferrando; M. Armengol; MT. Quiles; S. Schwartz; MA. Arbós. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2003; 14:811-815

Trabajo nº III, f.i.: 1.824 [21]

Early effects of exogenous arginine after the implantation of prosthetic material into the rat abdominal wall. MA. Arbós; JM. Ferrando; J. Vidal; MT. Quiles; P. Huguet; J. Castells; A. Segarra; M. Armengol; S. Schwartz. *Life Sciences*, 2000; 67:2493-2512

Trabajo nº IV, f.i.: 1.777 [23]

Experimental evaluation of a new layered prosthesis exhibiting a low tensile modulus of elasticity: long-term integration response within the rat abdominal wall. *World Journal of Surgery*, 2002; 26: 409-415

Trabajo nº V (en fase de publicación)

Enhanced polypropylene mesh integration in the rat abdominal wall with arginine administration. MA. Arbós; JM. Ferrando; MT. Quiles; J. Vidal; J. Gil; JM. Manero; J. Peña; P. Huguet; S. Schwartz; J. Reventós; M. Armengol

4. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Todos los trabajos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética e Investigaciones del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Todos los animales resultaron aptos para los tres tipos de estudio. Tras el periodo de adaptación previo a los ensayos experimentales el peso corporal no sufrió cambios significativos. A los 30 días tras los implantes (trabajo V) los animales se mantuvieron en un rango ponderal y bioquímico equilibrado *Tablas 4 y 5*. La recuperación postoperatoria, tanto tras la colocación de una vía central, como tras el implante de las prótesis fue rápida (en todos los tipos de estudio realizados).

| GRUPO | % PESO | KCAL / 24 H | UREA | CREATININA |
|---------|----------------|----------------|---------------|-------------|
| Control | -0.036 ± 1.358 | 146.43 ± 35.51 | 36.49 ± 13.31 | 0.62 ± 0.05 |
| Estudio | 0.746 ± 2.567 | 136.46 ± 31.54 | 48.80 ± 16.24 | 0.64 ± 0.09 |

Tabla 4. Representación principales medidas ponderales. Influencia arginina considerando el tiempo de estudio de 30 días tras los implantes; % Peso = cambio porcentual de peso; Kcal /24h = entrada calorías; Urea = mg/dl; Creatinina = mg/dl. Trabajos V.

| GRUPO | GLUCE. | Na+ | K+ | CL- | UREA ex. | CREAT. ex. | PROTEINAS TOTALES |
|---------|-----------|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|
| Control | 277 ± 5.6 | 153.96 ± 7.01 | 5.34 ± 0.61 | 117.61 ± 3.93 | 1.115 ± 0.279 | 0.03 ± 0.002 | 5.94 ± 0.067 |
| Estudio | 296 ± 3.0 | 152,83 ± 6,38 | 5.21 ± 0.54 | 117.77 ± 4.00 | 1.727 ± 0.496 | 0.032 ± 0.003 | 5.84 ± 0.767 |

Tabla 5. Representación parámetros bioquímicos. Influencia arginina considerando el tiempo de estudio de 30 días tras los implantes; Gluce (glucemia) = mg/dl; Na+, K+ y Cl- = mEq/l; Urea excreción = gr/Kg/24h; Creat.(creatinina) excreción = gr/Kg/24h ; Proteinas totales = gr/dl. Trabajo V.

En cuanto a los cambios locales sobre el sitio de colocación de las prótesis, en ningún caso se desarrollaron seromas e infecciones; se observaron adherencias, solo en tres casos, en el estudio para la caracterización de una malla compuesta Bard? - Composix? , éstas fueron laxas y localizadas marginalmente sobre las superficies de asentamiento de los puntos de fijación de las prótesis al tejido receptor. En general, las mallas no se encogieron, emigraron o saltaron en los tres diseños experimentales; tan solo algunas de ellas sufrieron pequeños desplazamientos, sobre todo aquellas colocadas en los estratos E-P, teniendo en cuenta que se analizaron tiempos de estudio muy precoces tras la cirugía (6 horas tras el implante, en el caso del trabajo III). Con el tiempo el conjunto prótesis-tejido de anclaje mostró una tendencia a la reducción de su

grosor. Para el trabajo V (efectos de la perfusión mantenida con arginina), ésta fue mayor en el grupo estudio (influencia arginina) que en el grupo control (aunque no significativamente representativa): día 30^{avo} post-implante, grupo estudio: 1.84 ± 0.23 mm y grupo control: 2.42 ± 0.20 mm; $P = 0.007$. Para el trabajo IV (caracterización malla compuesta) el grosor disminuyó significativamente con el tiempo: 2 meses, 8.70 ± 0.30 mm; 4 meses, 4.00 ± 0.90 mm; 6 meses, 3.00 ± 0.80 ; $P < 0.00$.

Respecto a los estudios ex vivo comparando Bard composix, monofilamento de polipropileno (Bard polipropileno) y Gore-Tex-Soft-Tissue-Patch observamos una mejor respuesta mecánica de todas las prótesis cuando estas eran sometidas a tracciones en sentido horizontal. Con tracciones realizadas en sentido vertical las mallas se alongaban más y se fracturaban antes. El comportamiento mecánico del material compuesto desarrolló mayor estabilidad que los otros dos. Los estudios microscópicos demostraron que las dos superficies de pp del composite dirigieron los mecanismos de fractura. Los resultados obtenidos del estudio de la relajación de tensiones (estudio ex vivo) demostraron que se producía la misma ley asintótica de relajación, obteniéndose unos niveles de saturación de la tensión muy precozmente con el tiempo tras el ensayo mecánico a partir de los cuales el material desarrollaría una deformación constante.

4.1 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

4.1.1 Respecto a la influencia de la estructura del lugar de colocación de las Prótesis [15]

La colocación E-S facilitó el desarrollo de una alta reacción inflamatoria con una rápida y progresiva invasión celular (histiocitos, linfocitos y macrófagos) sobre todo en las regiones de transición prótesis-tejido receptor o de anclaje. Un tejido de cicatrización más compacto, resistente y en íntimo contacto con el biomaterial se vio favorecido por el depósito de fibras de colágeno más organizadas y dispuestas centrípetamente en relación a la estructura porosa de las mallas (visión ESEM). La colocación E-P generó un tejido laxo, edematoso, fino y con baja celularidad, con escaso contacto con los filamentos del biomaterial (visión ESEM). La colocación E-S favoreció una mayor reacción vascular, especialmente en las superficies de anclaje. Durante los tres tiempos de estudio elegidos (7, 15 y 30 días) la respuesta inflamatoria celular y extracelular describió un perfil remodelante disminuyendo la celularidad al final del estudio y aumentando los depósitos de colágeno. Bajo visión ESEM la mayoría de las estructuras que aparecen correspondieron al depósito celular y dado el tiempo de estudio analizado

tras los implantes, podrían corresponder a macrófagos y células gigantes (siendo estas escasas).

4.1.2 Respecto a la influencia de la modulación exógena con arginina [21][22]

En presencia de los biomateriales y tanto en las fases precoces, 48 horas y 30 días tras los implantes, la respuesta celular y extracelular siguió una secuencia similar a la desarrollada en los mecanismos de reparación normales de los tejidos dañados: PMN, histiocitos, vasos, macrófagos, fibroblastos y depósito de MEC básicamente. Los análisis histológicos revelaron un aumento de la reacción inflamatoria en el grupo estudio, sobre todo a nivel de las zonas de anclaje y en las superficies E-S. Macrófagos y fibroblastos fueron los grupos celulares más numerosos marcando siempre valores más altos en las superficies E-S. Los métodos de cuantificación demostraron que con el tiempo la respuesta celular fue decreciendo. Al final de los experimentos, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ni tampoco vimos una reacción celular de cuerpo extraño patológica. Fue interesante haber encontrado en el 30^{avo} día valores significativamente bajos de PMN en el grupo estudio así como una elevación progresiva del número de fibroblastos. También obtuvimos una infiltración significativamente importante de linfocitos CD4 en el grupo estudio y en las superficies E-S respecto al grupo control y las superficies E-P.

La expresión de α -SMA (a actina de músculo liso) fue más marcada alrededor de las porosidades de las mallas y en contacto con los vasos. Las tinciones fueron más intensas en el grupo estudio, principalmente desde el 15^{avo} día.

Fueron manifiestos cambios en la organización y en los depósitos de MEC en ambos grupos; firme, ordenada y con íntimo contacto prótesis-tejido adyacente para el grupo estudio y más desorganizada y con menor contacto de superficies para el grupo control (visión ESEM). Tanto con técnicas de tinción básicas como con técnicas de inmunohistoquímica, se determinó mayor acumulo de colágeno en las superficies de anclaje, en las interfases E-S y en el grupo estudio. La arginina mejoró el alineamiento de los haces de colágeno alrededor de las prótesis y en las propias zonas de anclaje. Los depósitos de colágeno aumentaron con el tiempo (desde las primeras horas tras los implantes hasta el 30^{avo} día). Se analizaron dos tipos de colágenos, I y III.

La expresión de los mismos sufrió también un cambio con el tiempo. Encontramos mayor depósito de colágeno III muy precozmente tras los implantes y mayor depósito

de colágeno I en los tiempos más avanzados. Los grados de intensidad de las tinciones fueron valorados visualmente y clasificados semicuantitativamente de acuerdo a la siguiente escala: ++ = alta antigenicidad y/o fuerte tinción, + = baja antigenicidad y /o débil tinción. Estos cambios fueron corroborados también por ESEM.

La densidad vascular de los implantes fue examinada en las muestras teñidas con tricrómico de Masson identificando vasos del estroma. Durante los primeros tiempos de estudio se observó mayor densidad en los estratos E-S en ambos grupos. Valorando el efecto arginina la densidad vascular fue mayor en el grupo estudio para los dos estratos. Posteriormente en las fases más avanzadas el predominio vascular fue para los estratos E-S. La expresión de α -SMA alrededor de los vasos sugería un mayor grado de madurez de los mismos.

4.1.3 Respecto a la importancia de las propiedades mecánico-estructurales de los biomateriales en la incorporación a los tejidos [23]

La reacción inflamatoria local disminuyó con el tiempo de forma estadísticamente significativa. La estructura del material compuesto constituyó el principal factor de reorganización de la respuesta inflamatoria, siendo significativamente más intensa en las interfases pp que en las interfases e-PTFE. Esto quedó bien representado bajo visión ESEM. Las interfases e-PTFE tendían a la encapsulación.

La neovascularización fue mantenida en todos los tiempos de estudio, siendo más importante en las interfase pp (la baja porosidad de estas nuevas mallas no impidió la vascularización sobre e-PTFE).

En este estudio predominó el colágeno tipo I (característico de las fases crónicas de la cicatrización) sobre todo en las interfases pp.

4.2 RESULTADOS BIOQUÍMICOS Y MOLÉCULARES

En las condiciones utilizadas, la arginina administrada fue capaz de llegar a la interfaz prótesis-tejido receptor a pesar de su distribución en otros órganos y tejidos de la economía. Éstos acumularon cantidades substanciales de dicho aminoácido y sus principales metabolitos (ornitina y citrulina) tras la perfusión. Los niveles de ornitina se mantuvieron más altos que los de citrulina sobre todo en el grupo estudio. A nivel plasmático los niveles de arginina y ornitina fueron significativamente superiores en el grupo estudio durante todos los tiempos. Los valores de estos aminoácidos en los

fluidos e interfases estudiados también siguieron correlaciones significativas; alcanzaron unos niveles altamente significativos siempre a favor del grupo estudio. Con el tiempo estos niveles se mantuvieron. En los primeros tiempos se compararon los dos estratos E-S y E-P obteniéndose mayores concentraciones en el estrato E-P, probablemente debido a que en ellos la formación de “espacios muertos” favorecería exudados facilitando la recogida de los mismos y llevando a cabo menos diluciones para la obtención de aminoácidos. En los tiempos más avanzados de estudio solo se analizaron los estratos E-S ya que a la luz de nuestros resultados [15] éstos constituyen las superficies de mejor respuesta de integración mecánica, además encontramos dificultades técnicas en la manipulación de las muestras en estos tiempos avanzados. Hubo una tendencia a encontrar niveles más altos de ON en los animales tratados con arginina, sobre todo en los tiempos de estudio de 12 y 24 horas tras los implantes (no estadísticamente significativa).

Los *análisis de las proteasas* en las interfases prótesis-tejidos y fluidos mediante estudios de zimografía revelaron la presencia de bandas claras (actividad enzimática) en las posiciones 93, 85, 72, 68 y 65-KD de las MMP-9 y MMP-2, en ambos grupos. Se analizaron las actividades de MMP-9 (93 y 85-KD) y MMP-2 (68 y 65-KD). Los estudios densitométricos demostraron perfiles significativamente diferentes como consecuencia del tratamiento con arginina. En las interfases prótesis-tejido de anclaje tratadas con arginina las bandas aumentaron en intensidad alrededor del 30^{avo} día tras el implante. En los animales no tratados la actividad gelatinolítica alcanzó el pico al 7^o día y decreció progresivamente. A nivel de las muestras con fluidos también se describieron actividades enzimáticas pero con cinéticas ligeramente diferentes, un decrecimiento progresivo de la actividad MMP-9 y MMP-2 fue encontrado en ambos grupos, siendo también diferentes según el lugar de colocación (mayor actividad en los estratos E-P).

El *factor TGF- β_1* (*factor de transformación fibroblástica*) no se vió influido por el tratamiento con arginina. Desde el 2^o día tras el implante hasta el 30^{avo} se observó un aumento moderado de este factor, tanto en los estratos ES como EP. Una aparente demora en la expresión del mismo fue detectada en las superficies E-P.

Western blotting con anti-VEGF (*factor de crecimiento del endotelio vascular*) demostró la presencia de la isoforma VEGF₁₆₅ en los homogeneizados de las interfases prótesis-tejidos. Se trata de un dímero proteico que afecta a las células endoteliales y a sus funciones vasculares incluyendo su desarrollo y permeabilidad. Fueron observadas

débiles bandas que podrían corresponder a VEGF₁₆₅. Su expresión fue evidente el segundo día tras los implantes y continuó aumentando hasta el 15^{avo}, describiendo una reducción hacia el 30^{avo}. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudio y control. Esta cinética de expresión fue ligeramente más lenta en los estratos E-P.

La expresión α -SMA como marcador más fiable para la diferenciación de los miofibroblastos, demostró un perfil diferente entre ambos grupos, sobre todo en los estratos E-S. En el grupo control los primeros niveles fueron detectados tras el 7^o día de los implantes y éstos fueron débiles tras el 15^{avo}, reduciéndose marcadamente hacia el 30^{avo}. En el grupo estudio los niveles fueron marcadamente mayores con el tiempo. A nivel del estrato E-P no se encontraron diferencias significativas.

4.3 RESULTADOS MECÁNICOS

4.3.1 Respecto a la influencia de la estructura del lugar de colocación de las prótesis [15]

Todas las fracturas ocurrieron en las mismas áreas: - a nivel de la zona propiamente de anclaje (zona de transición) y - en la superficie formada por el tejido receptor. No observamos fracturas del biomaterial. El lugar de colocación de las prótesis fue el principal factor que afectó a la resistencia frente a la tracción o fuerza tensil. La colocación E-S favoreció la resistencia a la tracción. Cuando el factor tiempo fue considerado, aunque la resistencia del sistema aumentó, sobre todo en el estrato E-S, no se describieron cambios significativos entre los dos estratos estudiados. En cuanto a la deformación o elongación, fue el factor tiempo el principal influyente incrementando de forma significativa desde el día 7 al día 30 postimplante, sobre todo en el estrato E-P. No se observaron cambios en la rigidez para ninguna de las variables consideradas (lugar de colocación y tiempos de estudio).

4.3.2 Respecto a la influencia de la modulación exógena con arginina [21][22]

Los ensayos mecánicos se realizaron al 30^{avo} día de los implantes. También todas las fracturas ocurrieron en las mismas áreas: a nivel de la zona propiamente de anclaje y en la superficie formada por el tejido receptor. La pared artificial conseguida al final del estudio fue más compacta y menos grosera en el grupo estudio que en el grupo control.

Después del tratamiento con arginina, los valores de resistencia a la tracción fueron significativamente mayores en el grupo estudio. Sólo se valoraron los estratos E-S (más resistentes que los E-P). A largo plazo destacó una disminución en los valores de la rigidez para el grupo estudio, no encontrando cambios significativos para el módulo de elasticidad (aunque la tendencia también fue a la baja), sugiriendo que la carga y la fatiga asociadas con las tensiones mecánicas del abdomen se reparten mejor entre la prótesis y el tejido receptor en el grupo estudio originando un fenotipo nuevo (prótesis-tejido receptor) fuerte y flexible.

4.3.3 Respecto a la importancia de las propiedades mecánico-estructurales de los biomateriales en la incorporación a los tejidos [23]

Todas las fracturas ocurrieron en las mismas áreas que en los trabajos anteriores. Los estudios mecánicos no demostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo de estudio excepto para los valores del módulo de elasticidad que disminuyeron substancialmente. La resistencia a la tracción, la elongación o deformación y la energía de absorción tendieron a aumentar. La rigidez decreció.

5. DISCUSIÓN

La reparación de los defectos de la pared abdominal utilizando tejidos autólogos y prótesis sintéticas (el uso de éstas ha sido esencial) ha originado un cambio importante en la morbilidad de esta patología, disminuyendo satisfactoriamente la incidencia de su recurrencia; no obstante encontramos todavía hoy problemas relacionados con este tipo de cirugía [47]. La necesidad de realizar un buen despegamiento para conseguir un buen solapamiento con las vainas musculo-aponeuróticas aumenta la cantidad de hematomas. La colocación de prótesis de gran tamaño (en los grandes defectos) promueve el desarrollo de seromas [122]. De igual manera la placa cicatricial creada puede reducir la movilidad de la pared con las correspondientes molestias para los pacientes [45]. Durante bastantes años se ha discutido sobre el mejor lugar de colocación de las prótesis para evitar estos problemas referidos, basando sus recomendaciones en función de la experiencia y práctica de cada escuela [123] [124] [125] [126]. Existen escasos estudios experimentales sobre la respuesta tisular frente al implante en función del lugar de colocación del mismo y la mayoría coinciden en que ésta viene expresada según las características histológicas, funcionales y anatómicas de las estructuras que componen la pared abdominal, sugiriendo que el mejor lugar de colocación debería ser en aposición a los estratos musculares para obtener una precoz vascularización y una más rápida y completa integración [127]. Sin embargo esto también podría explicar la aparición de los problemas locales mencionados (seromas, hematomas y/o rigidez del sistema). Muy probablemente la respuesta a cuerpo extraño no está del todo controlada por los diferentes sistemas que intervienen en los procesos de cicatrización, dando lugar a un tejido neoformado poco fisiológico y funcionante, sobre todo cuando los materiales utilizados son grandes y ocupan importantes superficies del tejido receptor. La reacción inflamatoria originada por el biomaterial y por la misma intervención quirúrgica se mantiene en el tiempo y para muchos autores persiste por años (concentración de macrófagos por encima del 45 %) [128]. Para otros el comportamiento es el mismo que en una herida cualquiera encontrando una disminución importante de la población macrofágica a expensas de un aumento en los depósitos de fibroblastos y fibras de colágeno, adquiriendo un perfil remodelante con el tiempo [54]. En nuestros trabajos también nosotros hemos encontrado este último perfil evolutivo predominando con el paso del tiempo el componente fibroso sobre el celular y de forma más pronunciada si tenemos en cuenta el lugar del implante, traducándose en una respuesta hística y mecánica más madura [15] [22]. Está suficientemente demostrado que el tipo de

prótesis y en particular, la cantidad de material empleado así como su estructura porosa influyen decisivamente en la reacción a cuerpo extraño [45] faltando más estudios sobre la influencia del lugar donde se tiene que implantar la prótesis [120]. B. Klosterhalfen y col. 1997 encuentran, en sus trabajos experimentales, un aumento significativo en la rigidez del conjunto prótesis-tejido neoformado de la pared abdominal. Este efecto decrece al usar materiales menos voluminosos y gruesos con una menor densidad, siendo actualmente la tendencia. En concordancia a algunas aportaciones recientes en la literatura [129], aproximadamente más de la mitad de los pacientes con grandes eventraciones y portadores de amplias prótesis manifiestan importantes quejas. Muchas de las parestesias se localizan en los márgenes de las prótesis que suelen ser más rígidos. La utilización de prótesis de bajo peso, con una porosidad mayor o bien el empleo de materiales absorbibles pueden reducir los efectos negativos locales resultantes del implante [47] . En nuestros trabajos el uso del monofilamento de polipropileno (material irreabsorbible y no sometido a cambios de peso y densidad) no comportó cambios significativos de la rigidez cuando solo se valoraba el lugar de colocación y los tiempos de estudio [15], esta tendía a disminuir con el paso del tiempo, traduciendo mecánicamente el efecto de remodelación que sufre el sistema prótesis-tejido neoformado ya descrito por otros autores [54]; además al introducir el factor tratamiento con arginina destacó una disminución significativa en dicho parámetro indicando un posible mejor acoplamiento, con el tiempo, del tejido neoformado [22]. Probablemente estos resultados están en la línea de seguir mejorando los andamiajes creados para estimular la reparación y la regeneración de los tejidos dañados influyendo en la cinética de sus reacciones desde la manipulación exógena de los mismos y no solo desde el conocimiento y modificación de las propiedades estructurales de las prótesis. Nuestros resultados demostraron que la administración de arginina promovía un substrato de MEC cuantitativa y cualitativamente nuevo con rasgos estructurales y bioquímicos (algunos de ellos diferentes en función del lugar del implante) que alteraban en su conjunto las propiedades mecánicas del nuevo constructo. Esta interpretación fue soportada por la observación de que en las interfases prótesis-tejido de anclaje había una mayor cantidad de fibras de colágeno depositadas que podrían estar en constante readaptación, dada la expresión de perfiles enzimáticos diferentes encontrados también por la acción de la arginina.

Puesto que la pared abdominal está expuesta a fluctuaciones externas, dinámicas y significativas (gravitacional e inercial) e internas (presión intraabdominal,

factores respiratorios y hemodinámicos), todas ellas sujetas a mecanismos de tracción y compresión, el nuevo tejido remodelado debe ser fuerte para configurar un soporte estructural resistente y elástico para evitar una deformación rígida. En esta línea nosotros también hemos demostrado que las propiedades elásticas de los nuevos materiales compuestos así como del monofilamento de polipropileno, vienen expresadas por un bajo módulo de elasticidad sin perder capacidad de resistencia a las cargas (tanto in vitro como in vivo) [23] y por una relajación de tensiones precoz y constante [24], pudiendo ser estas más relevantes para la prestación de servicio en la pared abdominal. Por otro lado la utilización de algunos materiales absorbibles solos o en combinación con los no-absorbibles no está lo suficientemente documentada, en términos de seguimiento y aparición de recidivas, sobre todo a partir del tercer mes tras los implantes [130] , [131] y básicamente centran sus objetivos (conseguir una respuesta inflamatoria menos agresiva) en lo que a la formación de posibles adherencias se refiere, sobre todo si las prótesis se implantan en contacto directo con las vísceras o lo más cerca posible a ellas [132] .

A raíz de nuestros resultados podemos decir:

Primero, el desarrollo de un tejido de neoformación más compacto, organizado y maduro se obtuvo al implantar las prótesis en los estratos E-S como mostraron las valoraciones de microscopia óptica y ESEM, traduciéndose mecánicamente esta respuesta con un aumento de la resistencia frente a las tracciones o cargas. En los estratos E-P resultó una mayor deformación del sistema prótesis-tejido de anclaje que a la larga podría desencadenar problemas de adaptación de los nuevos constructos, no siendo significativos los cambios frente a las resistencias. Estos hallazgos podrían ser interesantes en la medida que ha sido y aún lo es un tema de discusión el mejor lugar de colocación de las prótesis sobre todo en las situaciones de grandes defectos mediales de la pared abdominal. Últimamente han aparecido trabajos de topografía vascular de la pared abdominal donde parece ser existe una íntima interrelación entre los vasos musculocutáneos y los perforantes de los estratos musculares constituyendo la red vascular más importante que nutre la cara anterior de la misma; ello podría estar en concordancia con los hallazgos histológicos encontrados por nosotros (en términos de vascularización) por lo que se debería defender la hipótesis de que alteraciones de la integración en estratos E-S derivadas de la falta de aporte vascular no es concluyente [133]. La respuesta celular y extracelular fue más pronunciada en la interfase prótesis tejido de anclaje (zonas de anclaje) comparándola con las áreas más centrales de las

mallas, hecho que podría ser importante ya que la ausencia de una reacción inflamatoria en estas regiones de anclaje causaría la recurrencia de las hernias, hallazgos que otros autores ya han defendido [134] [57].

Al administrar suplementos de arginina no solo se mantuvieron adecuadamente los niveles de resistencia, sino que se conseguía un efecto de remodelación más marcado y característico con el tiempo. Observamos un mayor decrecimiento tanto del grosor como de la rigidez del conjunto prótesis tejido neoformado comparándolo con el grupo control y aunque la disminución del módulo de elasticidad no fue significativa sí que tuvo una tendencia a la baja, sobre todo en el grupo estudio, expresando todo ello que la adaptabilidad al lecho de anclaje vendría dada por una homeostasis tensional (prótesis-tejido receptor) mediante el desarrollo de una deformidad plástica que bajo los efectos de la arginina podría ser un factor positivo en la integración. Es decir, con esta acción farmacológica nos estábamos aproximando a los mismos objetivos de adecuación de la integración que han propuestos otros autores (valoración de las propiedades estructurales y físicas de las mallas) [135] [62] pero desde diferentes caminos o vías (manipulación exógena) [22]. Para el estudio de la influencia de arginina solo analizamos los cambios en los estratos E-S basándonos en nuestros resultados previos (elegimos el estrato que mejores resultados histológicos y mecánicos ofrecía).

Segundo, la expresión temporal de las dos vías metabólicas de la arginina sobre las heridas fue investigada examinando la concentración de los aminoácidos derivados y del óxido nítrico, tanto en plasma, fluidos, interfases prótesis-tejidos y algunos órganos. Estos análisis revelaron dos periodos durante los cuales la concentración de arginina y sus derivados describía un perfil diferente según los medios estudiados. Basándonos en trabajos previos [136] [94], la expresión enzimática de NOS y arginasa desde los grupos celulares que intervienen en las reacciones inflamatorias de los tejidos seguía una secuencia en el tiempo que se inicia ya en las primeras horas tras la reacción tisular y que es inversamente proporcional a las concentraciones del sustrato arginina en plasma. Nosotros no solo medimos las concentraciones de este aminoácido en plasma y en las superficies prótesis-tejido anclaje y fluidos, sino que valoramos también la cinética de la misma a nivel de los principales órganos donde este aminoácido se metaboliza y/o elimina, viendo que a pesar de encontrar concentraciones altas en estas estructuras, la arginina llegaba fácilmente a los tejidos en fase de inflamación-reparación [21] [22]. Tanto en los tiempos precoces tras los implantes como en los más

avanzados obtuvimos niveles altos de arginina y ornitina en los tejidos estudiados (sobre todo en los animales del grupo estudio), mientras que las concentraciones de citrulina fueron significativamente bajas. Estos resultados sugerían que la utilización del sustrato arginina vía arginasa fue mayor que la de la vía NOS [137], hecho del que se podría derivar muchos de los efectos beneficiosos observados [138]. La sobreproducción de ornitina (grupo estudio) probablemente estaría relacionada con algunos de los eventos inducidos en nuestros modelos experimentales, especialmente aquellos implicados en la angiogénesis y en la remodelación de la MEC [139] [21] [140]. Existen múltiples trabajos que aproximan las acciones de la ornitina con la producción de capilares, acciones antiinflamatorias, maduración de las células en crecimiento y del tejido conectivo [98] [141] [142]. Se conocen dos isoformas distintas de arginasa (I-II) que están codificadas por diferentes genes y difieren en propiedades moleculares, inmunológicas, distribución en los tejidos y en la regulación de su expresión [143]. La colocación intracelular de estas enzimas probablemente tiene importantes implicaciones en el metabolismo de la arginina ejerciendo una inhibición competitiva con la NOS de tal manera que la inhibición de la actividad arginasa resulta en un aumento en la producción del ON vía NOS [144] traduciéndose esto a nivel tisular en un probable aumento del tono muscular de los vasos y de su permeabilidad [96]. En nuestros trabajos utilizando como sustrato dosis suplementadas de arginina encontramos una actividad arginasa importante y mantenida en el tiempo lo que podría explicar la disminución de las concentraciones del ON, no observando efectos negativos sobre la respuesta inflamatoria vascular, la cual se vio incrementada (a pesar de los niveles bajos de ON) [22]. Ello podría ser debido a la existencia de otros factores intermediarios biofísicos o biomecánicos específicos producidos durante la formación de las heridas encaminados hacia el estímulo de la actividad arginasa [101] [102]. Se detectaron niveles altos de citrulina en los estratos E-P como expresión de NOS durante los primeros tiempos de estudio (primeras horas tras los implantes) decreciendo rápidamente en fases posteriores [21] [22], lo que se podría interpretar como respuesta a la cinética secuencial del metabolismo de la arginina y a que en los estratos E-P factores como estrés mecánico, hipoxia, etc. no intervienen tanto [15].

Tercero, un requerimiento importante para conseguir una reparación óptima de los tejidos dañados es la colonización del biomaterial por elementos celulares y fibrosos con un adecuado soporte vascular alrededor aportando un ambiente propicio para el implante [145]. La respuesta celular obtenida en los diferentes modelos diseñados

demonstró una tendencia a la formación de una reacción celular crónica caracterizada por una disminución de las poblaciones celulares con el tiempo (predominando aquellos grupos celulares más maduros, fibroblastos). Esto fue más acusado teniendo en cuenta el lugar de implante y la administración de arginina. Como dato interesante encontramos un aumento significativo de la población celular CD4 en el grupo estudio (trabajos III-V) (sobre todo a partir de la primera semana tras los implantes) [22]. Parece ser que la NOS y las dos isoformas de arginasa están inducidas respectivamente por T helper I (interleuquina 1, TNF- α y γ -interferón) y por T helper II (interleuquinas 4,10 y 13, TGF- β_1 y prostaglandinas E₂) [146]. La presencia significativa de CD4 (T helper II) podría también explicar el predominio de la vía arginasa en nuestros trabajos. Después de un trauma quirúrgico la presencia de estas poblaciones celulares expresan la activación del sistema inmune, importante para una obtención adecuada y madura de un tejido reparador nuevo [147].

Respecto a la reacción extracelular ésta también consiguió un perfil evolutivo y organizativo diferente en función de los tiempos de estudio y del tratamiento con arginina. Ya en los primeros momentos tras los implantes se detectó una reacción precoz con predominio de los depósitos de col III (más importante en el grupo estudio y en los estratos E-S). Posteriormente fue predominando el col I (más maduro y compacto) con las mismas tendencias en función del tratamiento y el lugar de implante [21] [22]. La respuesta angiogénica precoz obtenida, sobre todo en el grupo estudio y en los estratos E-S, aunque no fue una expectativa inmediata de todo el completo proceso de neovascularización, probablemente ayudó a iniciar la cascada de reparación en unos momentos (los más precoces tras los implantes) en que los factores de crecimiento, que deben ser sintetizados localmente, aún no estaban disponibles [148].

Cuarto, la MEC es la clave como regulador de la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular durante la reparación de los tejidos. Tanto la cantidad como la organización de una MEC normal están determinadas por un balance dinámico entre: síntesis, deposición y degradación de la misma [149]. Los efectos del propio daño tisular y/o el implante de un biomaterial producen factores químicos y biológicos implicados en dicho balance. En nuestros trabajos hemos querido estudiar algunos de ellos y correlacionar algunas de sus funciones “ in situ “ bajo la influencia de la arginina : -a) *α -SMA* que expresaría actividad fibroblástica en términos de transformación fenotípica a miofibroblasto [150]. Como citan otros trabajos [64] las concentraciones de estas poblaciones celulares más maduras se dan ya tras la primera semana de la

intervención quirúrgica, cuando la matriz extracelular provisional es reemplazada por el tejido conectivo neoformado conocido como tejido de granulación. En nuestras determinaciones y coincidiendo con los hallazgos histológicos, encontramos niveles altos de α -SMA (métodos Western blotting) a la semana tras los implantes tanto en el grupo estudio como en el control (trabajo V), sobre todo en el grupo estudio [22]. La inmunohistoquímica detectó mayor concentración del marcador α -SMA alrededor de los vasos sugiriendo mayor madurez de éstos ya que esta actina constituye la isoforma típica de las células musculares del endotelio vascular [151]. Dado que el cierre de la herida toma parte cuando aparece de “ novo “ la expresión de α -SMA incorporada a las fibras de estrés del miofibroblasto en fase de maduración, se ha sugerido que esta proteína juega un papel importante en el acortamiento del tejido de granulación en fase de evolución [73]. En nuestros resultados (trabajo V), comparando el grosor total prótesis tejido- neoformado entre los dos grupos de estudio observamos un menor grosor de las muestras sometidas a la influencia de la arginina donde los niveles de α -SMA eran mayores. A la luz de estos datos, es probable que la arginina favorezca la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos contribuyendo a la contracción del tejido;

-b) *VEGF* y *TGF- β_1* ambos factores no se vieron influidos por el efecto arginina aunque describieron una cinética de expresión semejante a los resultados de aquellos trabajos que han intentado caracterizar la respuesta hística tras la agresión quirúrgica [64]. Se sabe que el *TGF- β_1* induce la expresión de α -SMA tanto “ in vivo “ como “ ex vivo “ [152] probablemente mediante la presencia de estímulos mecánicos [87]; el hecho de que en nuestros resultados no aparezcan diferencias entre ambos grupos (trabajo V) para la expresión de *TGF- β_1* y sí para la expresión de α -SMA puede significar la existencia de nuevos factores, actualmente aún desconocidos, que bajo la influencia de la arginina favorezcan la contractilidad de la cicatriz mediante la α -SMA.

-c) Las *MMPs* constituyen una familia de estructuras enzimáticas que tienen la habilidad de degradar precozmente los componentes de la MEC. Desde hace años la importancia de la debilidad de los tejidos blandos para el desarrollo de la patología herniaria ha sido un tema de estudio y discusión permanente. La resistencia de los tejidos al estrés (carga o tracción) parece depender en gran medida de la proporción entre Col I / Col III. Esta relación podría estar regulada también en parte por la actividad *MMPs* y por otras unidades proteicas como las fibronectinas. No se han visto alteraciones en la expresión de *MMP-1* y *MMP-13* en patología herniaria primaria [128]

[153] mientras que en pacientes con hernias incisionales y recidivas de las mismas puede haber una disminución en la expresión de MMP-1 [107]; ambas enzimas tienen una habilidad única para degradar las fibras de colágeno, su regulación y función durante la reparación de los tejidos parecen diferentes: MMP-1 es importante en los procesos de re-epitelización mientras que MMP-13 probablemente juega un papel en la remodelación de la MEC sobre todo en los procesos de reparaciones crónicas [154]. También recientes investigaciones correlacionan expresiones de MMP-2 con la incidencia de hernias del territorio inguinal [28]; MMP-9 y MMP-2 se expresan en las fases precoces y más tardías de los procesos de reparación respectivamente actuando sobre todo: MMP-9 en los procesos de inflamación y re-vascularización y MMP-2 en los mecanismos de remodelación propiamente [155] [156].

En nuestros modelos experimentales (trabajo V) estudiamos la cinética de expresión de MMP-9 y MMP-2 y no la de MMP-1 y MMP-13 ya que parecen estar más relacionadas con la remodelación de los procesos reparadores [157]. Para la actividad MMP-2 fueron vistas las formas intermedias y completamente activadas (82 y 65-KD) como resultado de una remodelación cicatricial que en nuestros trabajos ya se inicia en los periodos tempranos tras los implantes (48 horas tras los implantes) y que perdura con el tiempo (30^{avo} día tras los implantes), siguiendo el mismo perfil que en otros estudios [155] [156]. Por el contrario la MMP-9 fue vista casi en su totalidad de forma latente (93-KD) siendo su forma activada (85-KD) apenas visible. Bajo los efectos de la arginina, tanto en MMP-9 como en MMP-2 las bandas aumentaron en intensidad alrededor del 30^{avo} día, mientras que los animales del grupo control la actividad gelatinolítica se alcanzó alrededor del 7^o día para después decrecer progresivamente, expresando probablemente un mayor efecto de la actividad morfogénica cicatricial: remodelado y acortamiento del componente fibrilar bajo los efectos de la arginina. Los altos niveles de depósito de colágeno observados en las interfases tratadas con este aminoácido, probablemente generaron señales de activación de estas gelatinasas mejorando sus propiedades mecánicas. Por otro lado estas enzimas presentan actividad en los mecanismos de regulación de la angiogénesis [158] [159] (es requerido un adelgazamiento y maduración de las fibras del colágeno para que las células endoteliales emigren a través del estroma iniciando la neovascularización). En este sentido tanto las MMP-2 como las MMP-9 podrían haber estado implicadas en la formación de los vasos vistos en nuestras muestras. Muchos factores actúan adicionalmente o sinérgicamente para provocar e iniciar la neovascularización “in vivo

“. La proteólisis de la membrana basal capilar y la proliferación de las células endoteliales, son dos pasos claves asociados con el crecimiento capilar [160]. También influyen factores físicos o mecánicos ya citados. La proliferación endotelial probablemente está mediatizada por el VEGF y la degradación de la membrana basal por las MMPs [161] [162] quienes parecen responder a los efectos físicos como los movimientos de los tejidos, estiramientos etc. Aún no se conocen los factores que pueden influir en el estímulo de VEGF. Nosotros expresamos que el diferente tipo de colágeno alcanzado y observado en la MEC por el efecto del tratamiento con arginina (en las interfases correspondientes), ha permitido una rica y más regular red capilar.

Dado que la tensión es transmitida y resistida por las fibras proteicas [163] , todos estos datos obtenidos abogan hacia una regulación selectiva del colágeno que influye directamente en el control de la fuerza tensil y es corroborado por la idea de que la α -SMA juega un “ rol “ importante en el desarrollo de la capacidad de la contracción del tejido de granulación. Nuestros datos han demostrado una interfase compacta y ligeramente reactiva en el grupo de animales que recibieron arginina a pesar del aumento en los depósitos de colágeno, tal vez debido a una disminución del edema y a la regulación de las MMPs. Existen otras moléculas que influyen en la organización de los entramados de las fibras del colágeno como proteoglicanos (PGs) y glicosaminglicanos (GAGs) [164] que podrían ser también controladas por la arginina dirigiendo su síntesis. Desgraciadamente el análisis de las mismas es todavía limitado por la falta de disponibilidad de pruebas. A pesar de que es un hecho que existen múltiples factores reguladores en la integración de tejidos, hemos podido demostrar que la acción farmacológica de la arginina puede influir en las capacidades elásticas de los materiales más comúnmente utilizados en la reparación de los defectos de pared abdominal.

Quinto, todos los biomateriales utilizados desencadenan una respuesta tisular al ser implantados en los diferentes lechos receptores; esta respuesta viene marcada fundamentalmente por las características morfológico-estructurales de los mismos [64]. Se establece una capacidad de interacción mutua que lleva a la creación de un constructo morfológica y funcionalmente válido traduciendo una buena integración. La tendencia actual es utilizar materiales cada vez más biocompatibles que sean capaces de poder realizar su función con una buena respuesta del receptor (conseguir una combinación adecuada de propiedades físicas iguales a las del tejido reemplazado con la mínima capacidad tóxica) [165]. Los objetivos actuales en el diseño y uso de las

prótesis empleadas en la reparación de los defectos de pared abdominal van encaminados a: - optimizar el comportamiento mecánico del conjunto prótesis-tejido de anclaje (manteniendo las resistencias y aumentando la adaptabilidad) y - disminuir la reacción inflamatoria para controlar los efectos secundarios derivados de los implantes (seromas, infecciones, movilidad limitada y adherencias) [62]. Una de las aproximaciones que en los últimos años se ha hecho para conseguir dichos objetivos es la utilización de materiales compuestos nuevos conocidos como prótesis de segunda generación [128] [56]. La mayoría de los trabajos clínicos y experimentales utilizan las dos prótesis más comúnmente extendidas en el mercado: polipropileno y ePTFE, materiales irreabsorbibles o permanentes que permiten una mayor adaptabilidad y resistencia comparándolos con los materiales absorbibles o no permanentes que por su especial forma de incorporarse al tejido huésped, todavía hoy no ofrecen una garantía completa de adaptabilidad y aceptable respuesta mecánica [166] [167]. Desde esta línea en nuestros estudios diseñamos un modelo experimental para evaluar la compatibilidad de una nueva malla compuesta por dos materiales irreabsorbibles modificados: polipropileno y e-PTFE [23]. El polipropileno es una de las mejores prótesis en el uso de las hernioplastias así como el PTFE es el más recomendado cuando el defecto de pared es tan grande que implica un contacto directo del material con el contenido abdominal [168] [145]. En líneas generales nuestros hallazgos proporcionan prometedoras evidencias de que la asociación de PP y e-PTFE es un buen ejemplo para la reparación de la hernia abdominal, exhibiendo una buena biocompatibilidad e integración, aumentando la resistencia de la zona reparada y moderando la formación de adherencias intraabdominales. Los datos obtenidos están en concordancia con los expuestos por otros autores usando prótesis combinadas y/o compuestas [55] [56] [169] [170].

La caracterización mecánica “ ex vivo “ demostró que la principal ventaja de la malla BC era su bajo módulo de elasticidad, valor que está en relación directa con la rigidez del sistema y que podría ser explotada para mejorar la transmisión de la carga o fuerza entre los materiales sintéticos (semi-blandos) y los quebradizos tejidos blandos biológicos [171]. Los estudios mecánicos “ ex vivo “ constituyen los fundamentos para entender la aplicabilidad de un específico material y pueden ser usados para predecir el umbral de fallo del implante y la respuesta remodelante de la superficie nueva [172].

Dentro del marco experimental seleccionado nuestra principal contribución ha sido destacar algunos aspectos relativamente nuevos en el comportamiento mecánico de

estos materiales blandos “ in vivo “ y durante un tiempo de estudio prolongado. La disposición de una doble superficie de pp, más porosa (1.2 mm) y de menor densidad (0.14 g/cm^3) que el pp común, facilitó una reacción tisular importante para mantener niveles de resistencia aceptables con el tiempo y sin cambios morfológicos que distorsionaran la adaptabilidad en los lechos receptores correspondientes. La superficie e-PTFE más microporosa ($1\mu\text{m}$) y compacta que el e-PTFE habitual originó una neoformación de colágeno significativamente menor que en las superficies pp, con una disposición más ordenada de sus fibras organizando un neoperitoneo en contacto directo con el contenido abdominal bien reconocido y tolerado. Estos resultados histológicos pudieron ser estrechamente relacionados con los mecánicos indicando una gran regularidad de la reacción hística. La pared abdominal artificial creada se comportó como un sistema “ tiempo dependiente “ en términos de viscoelasticidad donde el principal aspecto mecánico que destacó fue la disminución del módulo de elasticidad. De tal manera que la carga de impacto originada en nuestros ensayos mecánicos y la carga de fatiga resultante parecían distribuirse entre las prótesis y el tejido receptor de forma balanceada. Con el tiempo, la resistencia, la deformación y el trabajo frente a la fractura aumentaron aunque no de forma significativa. Este comportamiento viscoelástico de los biomateriales determina una importante característica de los tejidos biológicos y sus componentes como el colágeno y modifica el estrés mantenido por las superficies reparadas, especialmente cuando las cadenas de polímeros constituyen el mayor componente de la estructura en su conjunto [172].

Importantes avances han sido hechos recientemente en el desarrollo de los biomateriales y aunque en la actualidad está más extendido el uso de los permanentes o irreabsorbibles, las investigaciones se dirigen al estudio de los no permanentes o absorbibles ya que constituyen un andamiaje más óptimo para su manipulación y transformación. Sin embargo aún no se ha conseguido que sus procesos de degradación y absorción sean controlados completamente por el tejido huésped. No solo dependerá de los cambios morfológicos y/o estructurales de los mismos como ya hemos citado y también comprobado en parte de nuestros estudios, sino que su integración estará modificada en función de la interacción específica con los medios biológicos donde se implanten [65]. Para ello es necesaria la creación de unas prótesis biológicamente activas que generen respuestas celulares específicas a nivel molecular. Desde este punto de vista la función de estos materiales implantados (polímeros absorbibles recubiertos de moléculas específicas como: moléculas de adhesión y factores de crecimiento) irá

orientada en dos sentidos: a) como andamiajes mecánicos para la regeneración de los tejidos dañados y b) como agentes farmacológicos que alteren el curso de la regeneración mediante la transmisión de signos biológicos a las células y tejidos de alrededor [173] [174].

A la luz de nuestros hallazgos pensamos que podríamos estar en la línea de las investigaciones actuales y futuras sobre la creación de materiales bioactivos ya que una de nuestras principales hipótesis ha introducido la acción e influencia de un agente farmacológico que podría mejorar la bioestabilidad y biocompatibilidad de los mismos en función de: plano de inserción y tiempo de exposición al agente farmacológico tras los implantes, teniendo como resultados: a) un aumento de la cantidad de fibras de colágeno depositadas tanto dentro como alrededor de la prótesis; b) una disminución importante del proceso inflamatorio propiamente dicho; c) una neovascularización permanente y madura; d) presencia de factores moleculares intermediarios; e) aumento asociado en la actividad de ciertas MMPs sugiriendo un aumento en el intercambio proteico en el seno de la MEC y f) un comportamiento mecánico viscoelástico propio de los principales componentes del tejido conectivo de nuestra economía como son las fibras de colágeno y característico de las nuevas prótesis que últimamente se están diseñando.

6. CONCLUSIONES

Del estudio realizado en esta tesis doctoral podemos concluir que:

Sobre la **influencia de la estructura anatómica del lugar de implantación**

- 1.- La colocación de mallas de polipropileno en la aponeurosis anterior del músculo oblicuo externo o mayor (estrato superficial) facilita la integración del biomaterial en términos de una mayor colonización celular, activación de fibroblastos con mayor depósito de fibras de colágeno y mayor número de vasos capilares de nueva formación.
- 2.- La colocación de mallas de polipropileno en la superficie peritoneal (estrato profundo), provoca la aparición de un tejido de reparación poco denso y organizado en paralelo a las mismas.
- 3.- Los análisis biomecánicos demuestran una mayor resistencia a la tracción y una menor susceptibilidad a la deformación en muestras procedentes del estrato superficial con respecto a las obtenidas en el estrato profundo, sin observarse diferencias en la rigidez.
- 4.- La correlación de los resultados obtenidos al nivel de los análisis morfológicos y mecánicos representa un buen soporte experimental para recomendar la colocación de las prótesis al nivel pre-aponeurótico, siempre que sea posible, para la reparación de la pared abdominal.

Sobre la **influencia de un aporte exógeno de clorhidrato de arginina**

- 5.- La administración de L-arginina por vía sistémica ha demostrado ser efectiva sin producir efectos tóxicos aparentes.
- 6.- Los animales tratados con arginina muestran niveles más altos de arginina y de ornitina que los del grupo control, sin diferencias significativas en los niveles de

citrulina indicando que el metabolismo de la arginina transcurre mayoritariamente a través del enzima arginasa. Este efecto puede ser la base de los muchos efectos beneficiosos encontrados.

- 7.- La administración de arginina provoca una mayor acumulación de miofibroblastos y células inmunitarias (CD4+), así como de depósitos de colágeno, actividad metaloproteásica y neovascularización respecto al grupo control, especialmente cuando las prótesis son colocadas en el estrato superficial.
- 8.- La administración de arginina incrementa la resistencia a la tracción y disminuye la rigidez del conjunto prótesis-tejido receptor respecto al grupo control.
- 9.- La correlación de los resultados obtenidos a nivel morfológico, molecular y funcional, sugiere que la administración de arginina asociada a la implantación del biomaterial podría ser contemplada como una estrategia terapéutica selectiva para mejorar a largo plazo los resultados actuales obtenidos en la reparación de defectos de la pared abdominal

Sobre la influencia de las propiedades mecánico-estructurales de los biomateriales en la incorporación a los tejidos

- 10.- La conducta del monofilamento de polipropileno presenta fenómenos de relajación frente a fuerzas extrínsecas que ya se inician muy precozmente tras los ensayos mecánicos. Conocer cómo se relajan las fuerzas de la malla con el transcurso del tiempo puede mejorar los resultados de colocación de la misma sobre las superficies dañadas.
- 11.- La caracterización mecánica ex vivo de la prótesis composite utilizada demuestra una construcción mejorada cuya principal ventaja es un bajo módulo de elasticidad. Esta propiedad puede ayudar a incrementar la transferencia de carga mecánica desde los biomateriales a los tejidos circundantes, relativamente frágiles y contribuir a la reducción de efectos secundarios.

- 12.- Los estudios in vivo a largo plazo demuestran una integración y unas propiedades biomecánicas satisfactorias que confieren una gran adaptabilidad a la pared abdominal.

Conclusión Final

La integración de biopolímeros en la pared abdominal es susceptible de ser modificada positivamente al nivel morfológico y molecular mediante intervenciones exógenas capaces de inducir un fenotipo funcional caracterizado por mejores prestaciones biomecánicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK. The cause, prevention and treatment of recurrent groin hernia. *Surg Clin North Am* 1993; 73(3): 529-544
- 2.- Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP, de Lange DC, Braaksma MM, Ijzermans JN, Boelhouwer RU, de Vries BC, Salu MK, Wereldsma JC, Bruijninx CM, Jeekel J. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *N Engl J Med* 2000; 343(6): 392-398
- 3.- Kuhn MA, Smith PD, Wachtel TL, Wright TE, Rogazewski A, Nguyen K, Robson MC, Franz MG. Abdominal wall repair is delayed during hepatic regeneration. *J Surg Res* 2001;95(1): 54-60
- 4.- Flum DR, Horvath K, Koepsell T. Have outcomes of incisional hernia repair improved with time ?. A population-based analysis. *Ann Surg* 2003; 237:129-135
- 5.- Laín Entralgo P. *Historia Universal de la Medicina*. Barcelona: Salvat Editores 1972
- 6.- Read RC. Revisión Histórica del tratamiento de la hernia. En: Nyhus and Cordon (ed.). *Hernia*. Traducción española de la 3ª ed Buenos Aires: Ed. Panamericana 1991:25-47
- 7.- Bassini E. Sull cura radicale dell'ernia inguinale. *Arch. Soc Ital Chir* 1887; 4:380-386
- 8.- Guy de Chauliac. En: *Hernia*. Iason, A.H. The Blakiston Co. Philadelphia 1941:63-66
- 9.- La Chausse. En: *Hernia*. Iason, A.H. The Blakiston Co. Philadelphia 1941: 895-898
- 10.- Witzel O. Über den Verschluss von Bauchwunden und Bruchpfoerten durch versenkte silberdrahtnetze (Einheilung von Filigranpelotten). *Centralblatt für Chirurgie* 1900; 10:258-260
- 11.- Lichtenstein IL, Shore JM. Exploding the myths of hernia repair. *Am J Surg* 1976;132(3):307-315
- 12.- Lalan S, Pomerantseva I, Vacanti JP. Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg* 2001; 25(11):1458-1466
- 13.- Livingstone AS, Sosa JI. Surgical laparoscopy: impact on the management of abdominal disorders. *Dig Dis* 1995; 13(1): 56-67
- 14.- Schumpelick V, Treutner KH, Arlt G. Inguinal hernia. *Lancet* 1994; 44(8919):375-379
- 15.- Ferrando JM, Vidal J, Armengol M, Huguet P, Gil J, Manero JM, Planell JA, Segarra A, Schwartz S, Arbós MA. Early imaging of integration response to polypropylene mesh in abdominal wall by environmental scanning electron microscopy: comparison of two placement techniques and correlation with tensiometric studies. *World J Surg* 2001;25: 840-847

- 16.- Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Control Release* 2002;78:211-128
- 17.- Tyrone JW, Marcus JR, Bonomo SR, Mogford JE, Xia Y, Mustoe TA. Transforming growth factor beta 3 promotes fascial wound healing in a new animal model. *Arch Surg* 2000;135(10):1154-1159
- 18.- Kyriakides TR, Hartzel T, Huynh G et al.. Regulation of angiogenesis and matrix remodeling by localized, matrix-mediated antisense gene delivery. *Mol Ther* 2001;3:842-849
- 19.- Puolakkainen P, Bradshaw AD, Kyriakides TR et al.. Compromised production of extracellular matrix in mice lacking secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) leads to a reduced foreign body reaction to implanted biomaterials. *Am J Pathol* 2003;162:627-635
- 20.- Shi HP, Most D, Efron DT, Witte MB, Barbul A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 2003;11(3): 198-203
- 21.- Arbós MA, Ferrando JM, Vidal J, Quiles MT, Huguet P, Castells J, Segarra A, Armengol M, Schwartz S. Early effects of exogenous arginine after the implantation of prosthetic material into the rat abdominal wall. *Life Sciences* 2000;67:2493-2512
- 22.- Arbós MA, Ferrando JM, Quiles MT, Vidal J, Gil J, Manero JM, Peña J, Huguet P, Schwartz S, Reventós J, Armengol M. Enhanced polypropylene mesh integration in the rat abdominal wall with arginine administration. En fase de publicación
- 23.- Ferrando JM, Vidal J, Armengol M, Gil J, Manero JM, Huguet P, Segarra A, Quiles MT, Schwartz S, Arbós MA. Experimental evaluation of a new layered prostheses exhibiting a low tensile modulus of elasticity. Long-term integration response into the rat abdominal wall. *World J Surg* 2002;26:409-415
- 24.- Gil FJ, Manero JM, Planell JA, Vidal J, Ferrando JM, Armengol M, Quiles MT, Schwartz S, Arbós MA. Stress relaxation tests in polypropylene monofilament meshes used in the repair of abdominal walls. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2003;14: 811-815
- 25.- Balibrea Cantero JL. Tratado de Cirugía. Tomo II. Capítulo XVII (152). Hernias. Página 1854. Gómez Alonso A, del Villar JL, Pérez García A. Ediciones Toray, S.A. Primera edición, enero 1989
- 26.- Keith A. On the origin and nature of hernia. *British J Surg* 1924;11:455-475
- 27.- Wagh PV, Leverich AP, Sun CN, White HJ, Read RC. Direct inguinal herniation in men: A disease of collagen. *J Surg Res* 1974; 17:425-433

- 28.- Bellón JM, Bajo A, Ga-Honduvilla N, Gimeno MJ, Pascual G, Guerrero A, Buján J. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression. *Ann Surg* 2001; 233(2):287-291
- 29.- Klinge U, Si ZY, Zhen H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res* 2000;32(1): 43-48
- 30.-Boemi L, Allison GM, Graham WP, Krummel TM, Ehrlich HP. Differences between scar and dermal cultured fibroblasts derived from a patient with recurrent abdominal incision wound herniation. *Plast Reconstr Surg* 1999;104(5):1397-1405
- 31.- Sugerman HJ. Effects of increased intra-abdominal pressure in severe obesity. *Surg Clin North Am* 2001; 81(5):1063-1075
- 32.- Jorgensen LN, Kallechave F, Christensen E, Siana JE, Gottrup F. Less collagen production in smokers. *Surgery* 1997;123(4): 450-454
- 33.- Clark JL. Ventral incisional hernia recurrence. *J Surg Res* 2001; 99(1):33-39
- 34.- Hussain SI, Bernardini J, Piraino B. The risk of hernia with large exchange volumes. *Adv Perit Dial* 1998;14:105-107
- 35.- Grantcharov TP, Rosenberg J. Vertical compared with transverse incisions in abdominal surgery. *Eur J Surg* 2001;167(4):260-267
- 36.- Rutkow IM. Epidemiologic, economic and sociologic aspects of hernia surgery in the United States in the 1900s. *Surg Clin North Am* 1998;78:941-952
- 37.- Sierra Gil E. Impacto asistencial, económico y social de la cirugía sin ingreso de las hernias parietales. Capítulo 27. Cirugía de la pared abdominal. Guías clínicas de la asociación española de cirujanos. Javier Álvarez Caperochipi, José Luís Porrero Carro y David Dávila Dorta. Ed. Arán 2002.
- 38.- Pera Madrazo C. Evolución histórica del tratamiento de las hernias. Capítulo 1 Cirugía de la pared abdominal, José Luís Porrero. Ed.: Masson 1997
- 39.- Usher FC. The repair of incisional and inguinal hernias. *Surg Gyn Obst* 1970;131: 525-530
- 40.- Validire J, Imbaud P, Dudet D, Duron YY. Large abdominal incisional hernias: Repair by fascial approximation reinforced with a stainless steel mesh. *Br J Surg* 1986; 73: 8-10
- 41.- Koontz AR, Kimberly RC. A further experimental work on protheses for hernia repair. *Surg Gynecol Obstet* 1959;109: 321-327

- 42.- Doran FS, Gibbins RE, Whitehead R. A report on 313 inguinal hernia repaired with nylon mets. *Br J Surg* 1961; 48: 430-434
- 43.- Martin RE, Sureik S, Clossen JN. Polypropylene mesh in 450 hernia repairs: evaluation of wound infections. *Contemp Surg* 1982; 20:46-49
- 44.- LeBlanc KA, Booth WV. Laparoscopic repair of incisional abdominal hernias using expanded polytetrafluoroethylene: preliminary findings. *Surg Laparosc Endosc* 1993; 3(1):39-41
- 45.- Amid PK. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. *Hernia* 1997;1:5-8
- 46.-Memon MA, Cooper NJ, Memon B, Memon MI, Abrams KR. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing open and laparoscopic inguinal hernia repair. *Br J Surg* 2003;90(12):1479-1492
- 47.- Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 1998;19(24):2235-2246
- 48.- Suzuki S, Tanaka R, Yan S, Chen R, Macklem PT, Kayser B. Assesment of abdominal muscle contractility, strength, and fatigue. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1052-1060
- 49.- Belokonev VI, Pushkin SI, Fedorina TA, Nagapetian SV. A biomechanical concept of the pathogenesis of postoperative ventral hernias. *Vestn Khir Im I I Grek.* 2000; 159(5):23-27
- 50.-Vidal J. Eventraciones. Actualizaciones en técnica quirúrgica, integración de biomateriales y problemática jurídica. Capítulo I: Recuerdo anatómico de la pared abdominal. Proceso de cicatrización de las laparotomías. J. Fernández Llamazares J, García Cuyas F, Bellón Caneiro JM, Buján Varela J, Arbós Vía MA. Biblioteca Ciencias y Humanidades. Medicina. 2004
- 51.- Schumpelick V, Nyhus LLM. Meshes: benefits and risks. Capítulo IV: anatomic basics. Prescher A, Conze J. Schumpelick Nyhus Editors.2004
- 52.- Errasti F. La calidad en la asistencia sanitaria. Editor, Francisco Erasti. Principios de Gestion Sanitaria. Ediciones DIAZ de SANTOS. Madrid 1997 Págs. 195-228
- 53.- Schein M, Wittmann DH, Aprahamian CC, Condon RE. The abdominal compartment syndrome: The physiological and clinical consequences of elevated intra-abdominal pressure. *J Am Coll Surg* 1995;180:745-753

- 54.- Bellón JM, Contreras LA, Buján J, Palomares D, Carreras- San Martín A. Tissue response to polypropylene meshes used in the repair of abdominal wall defects. *Biomaterials* 1998; 19:669-675
- 55.- Walker AP, Henderson J, Condon RE. Double-Layer prosthesis for repair of abdominal wall defects in a rabbit model. *J Surg Res* 1993;55(1):32-37
- 56.- Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL, Sostrin S, Young J, Hakakha M. Experimental evaluation of a new composite mesh with the selective property of incorporation to the abdominal wall without adhering to the intestines. *J Biomed Mat Res* 1994;28:373-375
- 57.- Bellón JM, Buján J, Contreras L, Carrera-San Martin A; Jurado F. Comparison of a new type of polytetrafluoroethylene patch (Mycro Mesh) and polypropylene prosthesis (Marlex?) for repair of abdominal wall defects. *J Am Coll Surg* 1996;183:11-18
- 58.- Bendavid R. Composite mesh (polypropylene ePTFE) in the intraperitoneal position. A report of 30 cases. *Hernia*. 1997;1:5-8
- 59.- Cnota MA, Wahle SA, Choe EU, Jacob JT, Flint LM, Ferrara JJ. Development of a novel synthetic material to close abdominal wall defects. *Journal of the American College of Surgeons*. 1998;64:415-418
- 60.- Rath AM, Zhang J, Amouroux J, Chevrel JP. Les prothèses pariétales abdominales. Étude biomécánica et histológica. *Chirurgie* 1996;121:253-265
- 61.- Klinge U, Klosterhalfen B, Conze J, Limberg W, Obelenski B, Öttinger AP, Schumpelick V. A modified mesh for hernia repair that is adapted to the physiology of the abdominal wall. *Eur J Surg* 1998;164(12):951-960
- 62.- Rosch R, Junge K, SchachtruppA, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *Eur Surg Res* 2003;35(3):161-166
- 63.- Schumpelick V, Klinge U, Junge K, Stumpf M. Incisional abdominal hernia: the open mesh repair. *Langenbecks Arch Surg* 2004;389(1):1-5
- 64.- Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:81-110
- 65.- Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Functional Biomaterials: design of novel biomaterials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:183-201
- 66.- Hata K. Intelligent materials in regenerative medicine and the use. *Nippon Rinsho* 2003;61(3):421-425

- 67.- Arem AJ, Madden JW. Effects of stress on healing wounds: I. Intermittent noncyclical tension. *J Surg Res* 1976;20:93-102
- 68.- Li AKC, Koroly MJ. Mechanical and humoral factors in wound healing. *Brit J Surg* 1981;68:738-743
- 69.- Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound healing angiogenesis. Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 1981;90:262-270
- 70.- Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL, DiPietro LA. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery* 1996;119:457-465.
- 71.- Walker GA, Guerrero IA; Leinwand LA. Myofibroblasts: molecular crossdressers. *Curr Top Dev Biol* 2001;51:91-107
- 72.- Madden JW, Peacock EE. Studies on the biology of collagen during wound healing. III. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. *Ann Surg* 1971;174:511-520
- 73.- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(5):349-363
- 74.- Beets GL, Go PM, Van Mameren H. Foreign body reactions to monofilament and braided polypropylene mesh used as preperitoneal implants in pigs. *Eur J Surg* 1996; 162:823-825
- 75.- Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276:75-81
- 76.- Vlodavsky I, Fucks Z, Ishai-Michaeli R. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J Cell Biochem* 1991;45:167-176
- 77.- Whalen GF, Shing Y, Folkman J. The fate of intravenously administered BFGF and the effect of heparin. *Growth* 1989;1:157-164
- 78.- Lepistö J, Peltonen J, Vähä-Kreula M, Söderström KO, J. Niinikoski, Laato M. Selective modulation of collagen gene expression by different isoforms of platelet-derived growth factor in experimental wound healing. *Cell Tissue Res* 1996;286:449-455.
- 79.- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-526

- 80.- Heck DE, Laskin DL, Gardner CR, Laskin JD. Epidermal Growth Factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(30):21277-21280
- 81.- Seifter E, Rettura G, Barbul A, Levenson SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* 1978;84:224-230
- 82.- Barbul A, Purtill WA. Nutrition in wound healing. *Clin Dermatol* 1994;12:133-140
- 83.- Schäffer MR, Tandry U, Ahrendt GM, Wasserkrug HL, Barbul A. Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis. *Journal of the American College of Surgeons* 1997;184:37-43
- 84.- Vernet D, Ferrini MG, Valente EG, Magee TR, Bou-Gharios G, Rajf González-Cadavid NF. Effect of nitric oxide on the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts in the Peyronie's fibrotic plaque and its rat model. *Nitric Oxide* 2002;7(4):262-276
- 85.- Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 2003;90(6):993-1002
- 86.- Muellner T, Kwasny O, Loehnert V, Mallinger R, Unfried G, Schabus R; Plenk H. Jr. Light and electron microscopic study of stress-shielding effects on rat patellar tendon. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121(10):561-565
- 87.- Grinnell F, Ho CH. Transforming growth factor beta stimulates fibroblast-collagen matrix contraction by different mechanisms in mechanically loaded and unloaded matrices. *Exp Cell Res* 2002;15(2):248-255
- 88.- Rose WC. The amino acid requirements of adult man. *Nutr Abstr Rev* 1957;27:631-647
- 89.- Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 1990;108:331-337
- 90.- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Tercera edición. Ediciones Omega, S.A. 2001. Capítulo 22: Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas
- 91.- Barbul A, Rettura G, Levenson SM, Seifter E. Wound healing and Thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1983;37:786-794

- 92.- Palmer JP, Walter RM, Ensinnck JW. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion. I. In normal man. *Diabetes* 1975;24:735-740
- 93.- Barbul A. Arginine: Biochemistry, physiology and therapeutic implications. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1986;10(2):227-237
- 94.- Albina JE, Mills ChD, Henry WL, Caldwell MD. Temporal expression of different pathways of L-Arginine metabolism in healing wounds. *The Journal of Immunology* 1990;144(10):3877-3880
- 95.- Li H, Meininger CM, Hawker JRJr, Haynes TE; Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SMJr, Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine and proline synthesis in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinology and Metabolism* 2001;280(1):E75-E82
- 96.- Bosmans JM, Vrints ChJ, Kockx MM, But H, Cromheeke KM, Herman AG. Continuous perivascular L-Arginine delivery increases total vessel area and reduces neointimal thickening after experimental balloon dilatation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:767-776
- 97.- Deliane K, Morris DR. Increased arginase activity during lymphocyte mitogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1978;81(1):199-204
- 98.- Albina JE, Abate JA, Mastrofrancesco B. Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *Journal of Surgery Research* 1993;55:97-102
- 99.- Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 1999(7):3771-3777
- 100.- Ensenat D, Massan S, Reyna SV, Schafer AI, Durante W. Transforming growth factor-beta 1 stimulates vascular smooth muscle cell L-proline transport by inducing system A amino acid transporter 2 (SAT2) gene expression. *Biochem J* 2001; 360(Pt2):507-512
- 101.- Louis CA, Reichner JS, Henry WL Jr, B. Mastrofrancesco B, Gotoh T, Mori M, Albina JE. Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages; regulation by oxygen tension. *Am J Physiol* 1998;274(3Pt 2): R:775-782
- 102.- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI. Physiological cyclic stretch directs L-Arginine transport and metabolism synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J* 2000;14(12):1775-1783
- 103.- Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of

its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett* 1996;395(2-3):119-122

104.- Shi HP, Fishel RS, Efron DT, Williams JZ, Fishel MH, Barbul A. Effect of supplemental ornithine on wound healing. *J Surg Res* 2002;106(2):299-302

105.- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6(5):199-213

106.- Ovington LG. Overview of matrix metalloprotease modulation and growth factor protection in wound healing. Part 1. *Ostomy Wound Manage* 2002;48(6 suppl.):3-7

107.- Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B. Collagen I/III and matrix metalloproteinase (MMP) 1 and 13 in the fascia of patients with incisional hernias. *J Invest Surg* 2001;14(1):47-54

108.- Kihara Y, Tashiro M, Nakamura H, Yomaguachi T, Yoshikawa H, Otsuki M. Role of TGF-beta 1, extracellular matrix and matrix metalloproteinase in the healing process of the pancreas after induction of acute necrotizing pancreatitis using arginine in rats. *Pancreas* 2001;23(3):288-295

109.- Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz D, Jawerbaum A, González E. Nitric oxide induces gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) during rat embryo implantation. *Fertil Steril* 2002;78(6):1278-1287

110.- Tiwary CD, Rosenbloom AL, Julius RL. Anaphylactic reaction to arginine infusion. *N Engl J Med* 1973;288(4):218

111.- Kapila S, Saba M, Lin CH, Bawle EV. Arginine deficiency-induced hyperammonemia in a home total parenteral nutrition-dependent patient: a case report. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001(5):286-288

112.- Rothe KF, Guggenberger H. Results of therapy of severe metabolic alkalosis using hydrochloric acid infusions. *Anasth Intensivther Notfallmed* 1984;19(2):60-64

113.- Van Bokhorst-De Van Der Schueren MA, Quak JJ, von Blomberg-van der Flier BM; Kuik DJ, Langendoen SI, Snow GB, Green CJ, van Leeuwen PA. Effect of perioperative nutrition, with and without arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2):323-332

114.- Zieve L. Conditional deficiencies of ornithine or arginine. *J Am Coll Nutr* 1986;5(2):167-176

- 115.- Adloff M, Arnaud JP. Étude expérimentale de la résistance de la tolerance biologique de matériaux prothésiques utilisés dans la réparation des pertes de substance de la paroi abdominale. *Chirurgie* 1976;102:390-396
- 116.- Bourgeon R, Borelli JP, Lanfranchi JP. Utilisation des prothèses de mersilène dans le traitement des éventrations post-opératoires. *Ann Chir* 1972;26:541-545
- 117.- Elliot MP, Juler GL. Comparison of marlex mesh and microporous teflon sheets when used for hernia repair in the experimental animals. *Am J Surg* 1979;137:342-344
- 118.- Jenkins SD, Klamer TW, Parteka JJ, Condon RE. A comparative of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects. *Surgery* 1983;94:392-398
- 119.- Lamb JP, Vitale T, Kaminski DL. Comparative evaluation of synthetic meshes used for abdominal wall replacement. *Surgery* 1983;93:643-648
- 120.- Lav NW. A comparison of polypropylene mesh, expanded polytetrafluoroethylene patch and polyglycolic acid mesh for the repair of experimental abdominal wall defects. *Acta Chir Scand* 1990;156:159-162
- 121.- Bellón JM, Contreras LA, Buján J, Carrera-San Martín A, Gimeno MJ, Jurado F. Influencia sobre el proceso cicatrizal de la porosidad de biomateriales protésicos implantados en la pared abdominal. *Cir Esp* 1996;59:296-302
- 122.- Schumpelick V, Conze J, Klinge U. Preperitoneal mesh-plasty in incisional hernia repair. A comparative retrospective study of 272 operated incisional hernias. *Chirurg* 1996;67:1028-1035
- 123.- Usher FC. New technique for repairing incisional hernias with Marlex mesh. *Am J Surg* 1979;138:740-741
- 124.- Matapurkar BG; Gupta AK; Agarwal AK. A new technique of “ marlex-peritoneal sandwich “ in the repair of large incisional henias. *World J Surg* 1991;15(6):768-700
- 125.- Molloy RG, Moran KT, Waldron RP, Brady MP, Kirwan WO. Massive incisional hernia: abdominal wall replacement with Marlex mesh. *Br J Surg* 1991;78(2):242-244
- 126.- Vidal J, Fernández Llamazares J. Myoplastie abdominale totale et partielle pour le soin radical des éventrations. In.: *Proceedings of the 66e Congrès de l'Association des Anatomistes*, Espaxs, editor. Barcelona, Espax, pp. 146, 1983
- 127.- Dabrowiecki S, Svanes K, Lekven J, Grong K. Tissue reaction to polypropylene mesh: A study of oedema, blood flow and inflammation in the abdominal wall. *Eur Surg Res* 1991;23(3-4):240-249
- 128.- Klinge U, Klosterhalfen B, Muller M, Schumpelick V. Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias. *Eur J Surg* 1999;165(7):665-673

- 129.- McLanahan D, King LT, Weems C, Novotney M, Gibson K. Retrorectus prosthetic mesh repair of midline abdominal hernia. *Am J Surg* 1997;173:445-449
- 130.- Dayton MT, Buchele BA, Shirazi SS, Hunt LB. Use of an absorbable mesh to repair contaminated abdominal wall defects. *Arch Surg* 1986;121:954-960
- 131.- Jernigan TW, Fabian TC, Croce MA, Moore N, Pritchard FE, Minard G, Bee TK. Staged management of giant abdominal wall defects: acute and long-term results. *Ann Surg* 2003;238(3):349-355
- 132.- Butler CE, Navarro FA, Orgill DP. Reduction of abdominal adhesions using composite collagen-GAG implants for ventral hernia repair. *J Biomed Mater Res* 2001;58(1):75-80
- 133.- El-Mrakby HH, Milner RH. The vascular anatomy of the lower anterior abdominal wall: a microdissection study on the deep inferior epigastric vessels and the perforator branches. *Plast Reconstr Surg* 2002;109(2):539-543
- 134.- Bellón JM, Buján J, Contreras L, Hernando A. Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response. *Biomaterials* 1995;16(5):381-387
- 135.- Junge K, Klinge U, Rosch R, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Functional and morphologic properties of a modified mesh for inguinal hernia repair. *World J Surg* 2002;26(12):1472-1480
- 136.- Albina JE, Mills CD, Henry WL Jr, Caldwell MD. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine Deiminase pathway. *Journal of Immunology* 1989;143(11):3641-3646.
- 137.- Morris SM Jr Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 2002;22:87-105
- 138.- Albina JE, Reichner JS. Oxygen and the regulation of gene expression in wounds. *Wound Repair Regen* 2003;11(6):445-451
- 139.- Durante W. Regulation of L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. *Cell Biochem Biophys* 2001;35(1):19-34
- 140.- Rickert D, Moses MA, Lendlein A, Kelch S, Franke RP. The importance of angiogenesis in the interaction between polymeric biomaterials and surrounding tissue. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003;28(3):175-181
- 141.- Jenkinson CP, Grody W, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 1996;114(1):107-132

- 142.- Witte MB, Barbul A, Schick MA, Vogt N, Becker HD. Upregulation of arginase expression in wound-derived fibroblasts. *J Surg Res* 2002;105(1):35-42
- 143.- Morris SMJr. Arginine synthesis, metabolism and transport: regulators of nitric oxide synthesis. In: *Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide*, edited by Laskin JD and Laskin DL.. New York: Dekker, 1999, p. 57-85
- 144.- Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racke K. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N-hydroxy-D, L-indsopidine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1997;121(3):395-400
- 145.- DeBord JR. The historical development of prosthetics in hernia surgery. *Surgical Clinics of North America* 1998;78(6):973-1006,vi
- 146.- Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase and immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6(2):223-228
- 147.- Rodriguez PC, Zea AH, De Salvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quinceno DG, Ochoa JB. L- arginine consumption by macrohages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol* 2003;171(3):1232-1239
- 148.- Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surgical Clinics of North America* 1997;77:575-586
- 149.- Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* 2000;105(2):638-647. Erratum in: *Plast Reconstr Surg* 2000;106(1):236-237
- 150.- Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971;27:549-550
- 151.- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986;103:2787-2796
- 152.- DesmouliA`re A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expresión in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:103-111
- 153.- Rosch R, Klinge U, Zhongyi Si, Junge K, Klosterhalfen B, Schumpelick V. A role for the collagen I/III and MMP-1/-13 genes in primary inguinal hernia ?. *BMC Medical Genet* 2002;3(1):2

- 154.- Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML; Cari VM; Saarialho-Kere U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol* 1997;109(1):96-101
- 155.- Paul RG, Tarlton JF, Purslow PP, Sims TJ, Watkins P, Marshall F, Ferguson MJ, Bailey AJ. Biomechanical and biochemical study of a standardized wound healing model. *Int Biochem Cell Biol* 1997;29(1):211-220
- 156.- Gousseu S, Hsu JY, Lin Y, Tjoa T, Maida N, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Diferencial temporal expression of matrix metalloproteinases after spinal cord injury: relationship to revascularization and wound healing. *J Neurosurg* 2003(2 suppl.):188-197
- 157.- Fray MJ, Dickinson RP, Muggins JP, Occeleston NL. A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers. *J Med Chem* 2003;46(16):3514-3525
- 158.- Berges G, Brekken R, McMahon G et al.. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744
- 159.- Rodriguez-Manzanares JC, Lane TF et al.. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12485-12490
- 160.- Harris SR, Thorgeirsson UP. Tumor angiogenesis: biology and therapeutic prospects. *In vivo*. 1998;12(6):563-570
- 161.- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factors receptors. *Exp Cell Res* 1999;253(1):117-130
- 162.- Van Gieson EJ, Skalak TC. Chronic vasodilation induces matrix metalloproteinase 9 (MM-9) expression during microvascular remodeling in rat skeletal muscle. *Microcirculation* 2001;8(1):25-31
- 163.- Scott JE. Elasticity in extracellular matrix “ shape modules “ of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan filament model. *J Physiol* 2003;553:335-343
- 164.- Lozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-652
- 165.- Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol* 2003;14(8):10-13

- 166.- Butler CE, Navarro FA, Orgill DP. Reduction of abdominal adhesions using composite collagen-GAG implants for ventral hernia repair. *J Biomed Mater Res* 2001;58(1):75-80
- 167.- Jernigan TW, Fabian TC, Croce MA, Moore N, Pritchard FE, Minard G, Bee TK. Staged management of giant abdominal wall defects: acute and long-term results. *Ann Surg* 2003;238(3):349-355
- 168.- Murphy JL, Freeman JB, Dionne PG. Comparison of Bard polypropylene and Gore-Tex to repair abdominal wall defects in the rat. *Can J Surg* 1989;32:244-247
- 169.- Amid PK, Lichtenstein IL, Shulman AG, Hakakha M. Biomaterials for “ tension-free “ hernioplasties and principles of their applications. *Minerva Chir* 1995;50(9):821-826
- 170.- Bellón JM, Buján J, Contreras LA, Jurado F. Use of nonporous polytetrafluoroethylene prosthesis in combination with polypropylene prosthetic abdominal wall implants in prevention of peritoneal adhesions. *J Biomed Mater Res* 1997;38:197-202
- 171.- Davidson JA, Mishra AK, Kovacs P, Poggie RA. New surface-hardened, low-modulus, corrosion-resistant Ti-13Nb 13Zr alloy for total hip arthroplasty. *Biomed Mater Eng* 1994;2(3):231-243
- 172.- Meaney DF. Mechanical properties of implantable biomaterials. *Clin Podiatr Med Surg* 1995;12:363-384
- 173.- Reyes CD, García AJ. Engineering integrin-specific surfaces with a triple-helical collagen-mimetic peptide. *J Biomed Mater Res* 2003;65A(4):511-523
- 174.- Van Kooten TG, Spijker HT, Busscher HJ. Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2004;25(10):1735-1747

ABREVIACIONES

| | | |
|----------|---|--|
| d C | : | Después de Cristo |
| GREPA | : | Groupe de Recherche et d'Étude de la Paroi Abdominale |
| CMA | : | Cirugía mayor ambulatoria |
| ILT | : | Incapacidad laboral Transitoria |
| PP | : | Polipropileno |
| PTFE | : | Politetrafluoroetileno |
| e-PTFE | : | Politetrafluoroetileno expandido |
| UCSI | : | Unidad de cirugía sin ingreso |
| ACTH | : | Corticosteroides |
| HGH | : | Hormona de crecimiento |
| MEC | : | Matriz extracelular |
| bFGF | : | Factor de crecimiento de fibroblasto básico |
| PDGF | : | Factor de crecimiento plaquetario |
| Proa1col | : | Procolágeno a1 |
| mRNA | : | Ácido ribonucleico mensajero |
| EDRF | : | Factor de relajación endotelial |
| ON | : | Óxido nítrico |
| EGF | : | Factor de crecimiento epidérmico |
| LPS | : | Lipopolisacárido |
| TNF-a | : | Factor de necrosis tumoral a |
| MPC | : | Malnutrición calórico proteica |
| MMPs | : | Metaloproteinasas |
| OAD | : | 1-Arginina deaminasa |
| ONS | : | Óxido nítrico sintetasa |
| PMN | : | Polimorfonuceares |
| PGs | : | Prostaglandinas |
| ConA | : | Concanavalina A |
| PHA | : | Fitohemaglutinina |
| DL50% | : | Dosis letal 50 |
| BUN | : | Productos de degradación nitrogenados |
| CIBBM | : | Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular |
| UPC | : | Universidad Autónoma de Barcelona |
| ES | : | Estrato superficial |

EP : Estrato profundo
F i : Factor de impacto
ESEM : Microscopio electrónico ambiental de barrido
a-SMA : a Actina de músculo liso
TGF- β 1 : Factor de crecimiento de transformación fibroblástica
VEGF : Factor de crecimiento de células endoteliales
PG : Proteoglicanos
GAGs : Glicosaminglicanos