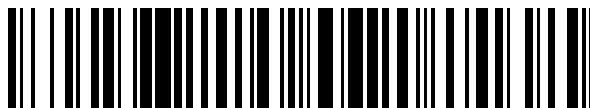


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 802**

21 Número de solicitud: 202230432

51 Int. Cl.:

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 31/729 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.05.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.12.2023

71 Solicitantes:

BIOIBÉRICA, S.A.U. (23.5%)
C/ Antic Camí de Tordera, 109-119
08389 Palafolls (Barcelona) ES;
UNIVERSIDAD DE GRANADA (53.0%) y
UNIVERSIDAD DE JAÉN (23.5%)

72 Inventor/es:

MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;
LÓPEZ RUIZ, Elena;
GÁLVEZ MARTÍN, Patricia y
CHOCARRO WRONA, Carlos

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **HIDROGELES PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL**

57 Resumen:

Hidrogeles para su uso en ingeniería de tejidos de la piel.

La presente invención se relaciona con hidrogeles que comprenden componentes propios de piel nativa, así como a biotintas, composiciones y apósitos basados en los mismos. Además, la invención se relaciona con sus usos en medicina regenerativa, en particular, en la regeneración, reparación y sustitución de tejidos de la piel, y un método de obtención de los hidrogeles de la invención.

ES 2 956 802 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles para su uso en ingeniería de tejidos de la piel

5 La presente invención pertenece al área de ingeniería tisular y biomedicina. En particular, la presente invención se refiere a hidrogeles que comprenden componentes propios de piel nativa, así como a biotintas, composiciones y apósitos basados en los mismos. Además, la invención se relaciona con sus usos en medicina regenerativa, en particular, en la regeneración, reparación y sustitución de tejidos de la piel, y un método
10 de obtención de los hidrogeles de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, constituyendo una barrera natural
15 frente al entorno externo, que desempeña un papel fundamental en la preservación de la homeostasis y protección de los órganos internos del cuerpo. Además, también interviene en muchas funciones esenciales, como la prevención de una pérdida excesiva de agua transepidérmica, la termorregulación, la percepción sensorial a través de receptores especializados o la excreción.

20 Es por ello, que trastornos o patologías relacionadas con la piel, afectan la calidad de vida de los sujetos que los sufren. Trastornos de este tipo pueden estar causados, por ejemplo, por heridas agudas o crónicas, úlceras del pie diabético, fístulas perianales, la epidermólisis bullosa, así como por traumatismos, quemaduras o desgarros, entre otros.

25 Un enfoque típico para el tratamiento de las lesiones cutáneas consiste en sustituir el tejido perdido por un autoinjerto, aloinjerto o xenoinjerto. A pesar de ello, estas soluciones pueden presentar como limitaciones la disponibilidad de donante.

30 La ingeniería tisular es un campo que ha proporcionado muchas aproximaciones destinadas a solventar este tipo trastornos. Los sustitutos de la piel de ingeniería tisular, son un campo de investigación importante con gran impacto en los tratamientos de patología dermatológica. Los sustitutos de la piel deben mostrar propiedades biocompatibles, ayudar a restaurar la función de barrera epidérmica y la homeostasis
35 cutánea (temperatura, pH, TEWL, elasticidad y humedad) y asegurar un resultado clínico correcto.

En el estado de la técnica se encuentran descritas diversas aproximaciones de este tipo:

- 5 En la revisión de Dai C. *et al.* (Dai C. *et al.*, *Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review*. J Dermatolog Treat., 31(6):639-648 (2020)), se recogen y describen las ventajas, desventajas e indicaciones de diferentes sustitutos de piel y su aplicación clínica.
- 10 La solicitud CN106390205A, divulga una piel artificial impresa en 3D y un método de preparación de la misma, que comprende, entre otras, una capa de hidrogel que contiene queratinocitos, y una capa de hidrogel que contiene células del folículo piloso.
- La solicitud WO2019040224A1 divulga un hidrogel para ingeniería tisular y
15 bioimpresión. En concreto, describe una composición de un hidrogel reticulado que es imprimible en una forma definida. El hidrogel reticulado incluye una pluralidad de macrómeros poliméricos naturales biodegradables así como la posibilidad de incluir células.
- 20 No obstante, los biomateriales y modelos o sustitutos de piel que los comprenden desarrollados hasta el momento, no presentan un biomimetismo ideal, tanto en diseño como en composición, o presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas que limitan su aplicación biomédica.
- 25 Es por ello, que existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar aproximaciones alternativas basadas en biomateriales, con propiedades fisicoquímicas y biológicas adecuadas para su aplicación como sustitutos o modelos de piel.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

La presente invención se relaciona con hidrogeles basados en componentes propios de la piel, en particular, colágeno tipo I, dermatán sulfato, elastina y ácido hialurónico, además de agarosa, y que además pueden comprender células vivas. Dichos hidrogeles, además, pueden presentar una disposición monolaminar, bilaminar o
35 trilaminar. La composición, organización en láminas o capas, así como propiedades

emergentes de los hidrogeles de la invención, les permite biomimetizar las capas hipodérmicas, dérmica y/o epidérmica de la piel.

Los inventores han demostrado que estos hidrogeles presentan propiedades
5 fisicoquímicas que los hacen adecuados para su uso en ingeniería tisular, por ejemplo, como biotintas para bioimpresión 3D (Fig. 1B, 1C, 1D y Fig. 2). A su vez, dichos hidrogeles o biotintas que los comprenden, fueron combinados dando lugar a modelos de piel bilaminares o trilaminares, que mostraron propiedades biológicas que les otorgan aplicabilidad en la regeneración, reparación o sustitución de la piel (Fig. 4). En particular,
10 ensayos *in vivo* han mostrado que los hidrogeles de la invención, como el hidrogel o modelo de piel trilaminar (también denominado en el presente documento como BT Skin o Piel BT), promueven eficazmente la cicatrización de heridas de la piel en un modelo animal de cicatrización de herida, presentando resultados similares e incluso superando en algunos casos al tratamiento de referencia o *gold estándar*, así como respecto al
15 tratamiento control (Fig.5).

Asimismo, algunos hidrogeles de la invención, demostraron mantener su integridad tras sufrir una deshidratación parcial, lo que disminuye su grosor y les confiere propiedades mecánicas mejoradas para su uso en ingeniería tisular. Por último, algunos hidrogeles
20 de la invención fueron liofilizados y caracterizados, exhibiendo capacidades para ser aplicados en ingeniería de tejidos de la piel (Fig. 13).

Los hidrogeles de la invención presentan diversas ventajas asociadas a su composición y disposición, que emulan las diferentes capas de la piel: se trata de hidrogeles
25 biomiméticos, lo que mejora potencialmente la respuesta de un sujeto tras su aplicación en regeneración tisular; sus propiedades fisicoquímicas, como los tiempos de gelificación e inyectabilidad, son óptimos para uso como biotintas al lograr una buena capacidad de bioimpresión; sus propiedades biológicas, tales como el mantenimiento de la proliferación celular y altos niveles de viabilidad celular, también le otorgan
30 capacidad para aplicaciones en medicina regenerativa. Todas estas ventajas mencionadas hacen de los hidrogeles de la invención, así como las biotintas, composiciones, o apósitos que los comprenden, una aproximación alternativa como modelos o sustitutos de piel, para su aplicación en el ámbito de la ingeniería tisular y medicina regenerativa.

35

En base a esto, los inventores han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos a continuación:

Hidrogeles de la invención y aspectos derivados del mismo

5

Los inventores han demostrado que hidrogeles que comprenden componentes presentes en la piel, en particular, colágeno tipo I, elastina, dermatán sulfato y ácido hialurónico, además de agarosa, y que pueden incluir también otros componentes, tales como células propias de la piel, presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas de interés, especialmente para su aplicación en ingeniería tisular.

10

El término "hidrogel", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una red o mezcla de materiales, moléculas, polímeros o sustancias que se combinan mediante enlaces químicos, incluidos enlaces covalentes, iónicos y supramoleculares, o mediante cualquier combinación de los mismos. El hidrogel puede presentar una textura sólida, semisólida o semilíquida, y puede ser utilizado como andamio tridimensional en ingeniería de tejidos.

15

Preferiblemente, los hidrogeles de la invención son hidrogeles biomiméticos. El término "hidrogel biomimético", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un hidrogel o andamio que imita el microambiente extracelular natural para facilitar la interacción entre los hidrogeles y las células circundantes a través del reconocimiento molecular, y mejorar la respuesta celular específica y la regeneración tisular.

20

Los hidrogeles monolaminar, bilaminar y trilaminar de la invención, pueden ser referidos de forma conjunta a lo largo del presente documento como "los hidrogeles de la invención".

25

Un hidrogel puede definirse por componentes que lo comprenden, que a su vez definen las propiedades del mismo.

30

El colágeno tipo I (Col I), es una proteína que se ensambla en fibras que forman el andamiaje estructural y mecánico (matriz) de tejidos, incluidos la piel, siendo una proteína de andamiaje esencial que confiere fuerza y elasticidad a la misma.

35

El dermatán sulfato (DS), es el principal glucano en la matriz extracelular de la piel, participando en la reconstrucción de dicha matriz extracelular en el proceso de cicatrización de heridas.

5 El ácido hialurónico, es un polisacárido que también se encuentra en la matriz extracelular dérmica, y que es ampliamente conocido en el estado de la técnica por su utilidad en productos para el cuidado de la piel e ingeniería tisular, y por promover la cicatrización de heridas y la angiogénesis.

10 La agarosa (Ag) es un polisacárido presente en ciertas algas, que tiene propiedades que lo hacen útil para proporcionar soporte mecánico y gelificación rápida.

En la presente invención, los hidrogeles de la invención pueden estar dispuestos u organizados en una o múltiples capas, en particular, en una capa (hidrogel
15 monolaminar), dos capas (hidrogel bilaminar), o tres capas (hidrogel trilaminar), que imitan o biomimetizan las diferentes capas principales propias de la piel, la capa hipodérmica, capa dérmica y/o capa dérmica.

Hidrogel monolaminar

20 Un aspecto de la invención se relaciona con un hidrogel monolaminar, de aquí en adelante, “el hidrogel monolaminar de la invención”, que comprende:

- Colágeno tipo I (Col I),
- Dermatan sulfato (DS),
- 25 - Ácido hialurónico (HA), y
- Agarosa (Ag),

Preferiblemente, el hidrogel monolaminar además comprende elastina (EL).

30 El término “elastina”, se refiere a una proteína altamente entrecruzada, constituyendo una proteína principal en la matriz extracelular de la piel nativa, confiriendo elasticidad a la matriz dérmica.

En una realización preferida, el hidrogel monolaminar de la invención comprende Col I
35 a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 2,2

mg/mL; DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 8,4 mg/mL; HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 1 mg/mL; y Ag a una concentración de 10 a 30 mg/mL, preferiblemente 15 mg/mL (incluyendo los extremos). En una realización más preferida, el hidrogel monolaminar de la invención, además comprende EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 1 mg/mL.

En una realización preferida del hidrogel monolaminar de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel está liofilizado, de aquí en adelante, “el hidrogel monolaminar liofilizado de la invención”. Preferiblemente, el hidrogel monolaminar liofilizado de la invención no comprende células.

Además, los hidrogeles de la invención pueden comprender células, preferiblemente células humanas. Preferiblemente, las células de los hidrogeles de la invención comprenden células que pueden estar presentes en las diferentes capas de la piel nativa. Ejemplos de tipos de células que pueden estar presentes en la piel, incluyen, sin limitar a, queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel, fibroblastos dérmicos, mastocitos, células musculares lisas vasculares, células mioepiteliales, histiocitos, neutrófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Treg), eosinófilos, monocitos, célula madre, células madre del folículo piloso células madre mesenquimales, adipocitos, células NK (por sus siglas en inglés, *Natural Killer*).

En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel monolaminar de la invención comprende células que pueden estar presentes en la dermis y/o hipodermis de la piel nativa. Más preferiblemente, el hidrogel monolaminar de la invención comprende células seleccionadas de la lista que consiste en fibroblastos dérmicos, mastocitos, células musculares lisas vasculares, células mioepiteliales, histiocitos, neutrófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Tregs), eosinófilos, monocitos, célula madre, células madre del folículo piloso células madre mesenquimales, adipocitos, células NK, y cualquier combinación de las mismas. Aún más preferiblemente, el hidrogel monolaminar de la invención comprende células madre mesenquimales y/o fibroblastos dérmicos.

Los hidrogeles de la invención pueden organizarse, como ya se ha mencionado, en una o múltiples capas (o láminas). El término “capa”, tal como se utiliza aquí, se refiere a

una asociación en los planos X, Y y Z de componentes propios de la matriz extracelular. Cada capa puede definirse por su composición y propiedades. Preferiblemente, cada capa presenta una composición y/o propiedades homogéneas en la misma.

- 5 El término “monolaminar”, tal y como se usa aquí, en relación al hidrogel y su organización o disposición, se refiere a que los componentes que conforman el hidrogel están dispuestos en una capa.

Hidrogel bilaminar

- 10 Otro aspecto de la invención se relaciona con un hidrogel bilaminar, de aquí en adelante “el hidrogel bilaminar de la invención”, que comprende dos capas del hidrogel monolaminar de la invención. El hidrogel bilaminar de la invención comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato, ácido hialurónico y elastina.
- 15 Como se ha mencionado previamente, los hidrogeles de la invención pueden organizarse en múltiples capas (o láminas). Cada capa puede definirse por su composición y/o propiedades asociadas. Preferiblemente, cada capa presenta una composición y/o propiedades homogéneas en la misma, que la diferencian entre sí. La organización en capas de los hidrogeles de la invención, permiten emular o imitar la
- 20 estructura de los tejidos corporales, en particular, tejidos de la piel, más en particular las principales capas de la piel, dotándolos de una arquitectura estructural que contribuyen a mejorar el biomimetismo de los mismos.

- El término “bilaminar”, tal y como se usa aquí, en relación al hidrogel y su organización
- 25 o disposición, se refiere a que los componentes que conforman el hidrogel están dispuestos en dos capas, una capa inferior y una capa superior.

- En una realización preferida del hidrogel bilaminar de la invención, la capa inferior comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato y ácido hialurónico, y la capa
- 30 superior comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato, ácido hialurónico y elastina.

- En otra realización más preferida del hidrogel bilaminar de la invención, ambas capas comprenden elastina.

35

En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel bilaminar de la invención comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 2,2 mg/mL; DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 8,4 mg/mL; HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 1 mg/mL; Ag a una concentración de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 15 mg/mL; y EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), preferiblemente 1 mg/mL.

10 En otra realización más preferida del hidrogel bilaminar de la invención:

-la capa superior comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), Ag a una concentración de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos), y EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos); y

-la capa inferior comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), Ag a una concentración de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos), y EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos).

En otra realización aún más preferida del hidrogel bilaminar de la invención:

25 -la capa superior comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA, a una concentración de 1 mg/mL, Ag a una concentración de 15 mg/mL, y EL a una concentración de 1 mg/mL; y

30 -la capa inferior comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA, a una concentración de 1 mg/mL, Ag a una concentración de 15 mg/mL, y EL a una concentración de 1 mg/mL.

35 En una realización preferida del hidrogel bilaminar de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel está liofilizado, de aquí

en adelante, "el hidrogel bilaminar liofilizado de la invención". Preferiblemente, el hidrogel bilaminar liofilizado de la invención no comprende células.

Además, los hidrogeles de la invención pueden comprender células, preferiblemente células humanas. Preferiblemente, las células de los hidrogeles de la invención comprenden células que pueden estar presentes en las diferentes capas de la piel nativa. Ejemplos de tipos de células que pueden estar presentes en la piel, incluyen, sin limitar a, queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel, fibroblastos dérmicos, mastocitos, células musculares lisas vasculares, células mioepiteliales, histiocitos, neutrófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Treg), eosinófilos, monocitos, células madre, células madre del folículo piloso, adipocitos, células NK (por sus siglas en inglés, *Natural Killer*).

En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel bilaminar de la invención comprende células que pueden estar presentes en la dermis y/o hipodermis de la piel nativa. Más preferiblemente, el hidrogel bilaminar de la invención comprende células seleccionadas de la lista que consiste en fibroblastos dérmicos, mastocitos, células musculares lisas vasculares, células mioepiteliales, histiocitos, neutrófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Tregs), eosinófilos, monocitos, células madre, células madre del folículo piloso, adipocitos, células NK, y cualquier combinación de las mismas. Aún más preferiblemente, el hidrogel bilaminar de la invención comprende células madre mesenquimales y fibroblastos dérmicos.

El término "células madre mesenquimales" (MSCs, por sus siglas en inglés *mesenchymal stem cells*) se refiere en el presente documento a células estromales multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos celulares, incluyendo osteoblastos (células óseas), condrocitos (células del cartílago), miocitos (células musculares), fibroblastos y adipocitos.

30

Como entiende un experto en la materia, métodos para obtener células madre mesenquimales de un sujeto, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, son ampliamente conocidas en el estado de la técnica. Las células madre mesenquimales pueden aislarse de tejidos u órganos de un sujeto, como por ejemplo y sin limitarse a, médula ósea, placenta, sangre del cordón umbilical, de gelatina de

35

Wharton, tejido adiposo, músculo adulto, estroma corneal, líquido amniótico, endometrio y tejidos dentales. Preferiblemente, las células madre mesenquimales son aisladas de tejido adiposo.

- 5 El término “fibroblastos dérmicos” (DFs, por sus siglas en inglés *dermal fibroblasts*), tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a células residentes del tejido conectivo que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular de los tejidos en muchos animales. En particular, los fibroblastos dérmicos se encuentran en la capa de la dermis de la piel, donde generan y mantienen el tejido conectivo, desempeñando un
- 10 papel crucial en la cicatrización de heridas y produciendo proteínas para la matriz extracelular que une la dermis y la epidermis.

En la presente invención, el hidrogel bilaminar puede imitar la estructura y/o composición de las capas dérmica e hipodérmica de la piel nativa.

- 15 Así, en una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel bilaminar de la invención comprende una primera capa inferior que comprende el hidrogel monolaminar de la invención, donde dicho hidrogel monolaminar comprende células madre mesenquimales, y una segunda capa superior,
- 20 dispuesta encima de la primera, que comprende el hidrogel monolaminar de la invención, donde dicho hidrogel monolaminar comprende fibroblastos dérmicos. Más preferiblemente, la concentración de fibroblastos dérmicos en la capa superior es de 1M/mL, y la concentración de células madre mesenquimales en la capa inferior es de 1M/mL.

- 25 En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, los fibroblastos dérmicos y/o las células madre mesenquimales son humanos.

- 30 Además, otras células que pueden estar comprendidas en el hidrogel incluyen células utilizadas en la regeneración de tejidos, tales como, pero sin limitar a, células primarias, células madre del folículo piloso, células endoteliales, fibras nerviosas, corpúsculos de Pacini, corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Krause, los corpúsculos de Ruffini.

- 35 Además, el hidrogel bilaminar de la invención puede presentar unas dimensiones

adecuadas para aplicaciones de ingeniería tisular. En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel bilaminar de la invención comprende una anchura de 10 a 120 mm (incluyendo los valores extremos), una longitud de 5 a 120 mm (incluyendo los valores extremos) y una altura de 0,2 a 10 mm (incluyendo los valores externos). Más preferiblemente, el hidrogel bilaminar de la invención comprende una anchura de 30 mm, una longitud de 15 mm y una altura de 1,4 mm.

En ciertas realizaciones del hidrogel bilaminar de la invención, el grosor de la capa superior es de 100 a 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 200 a 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 300 a 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 400 a 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 900 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 800 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 700 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 600 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de, al menos, 100 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de, al menos, 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de, al menos, 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de, al menos, 400 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior 2000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior 3000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior 4000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 1500 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 900 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 800 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 700 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 600 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de aproximadamente 500 μm .

En ciertas realizaciones del hidrogel bilaminar de la invención, el grosor de la capa inferior es superior a 100 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 400 μm . En

ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 500 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 2000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 3000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 4000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 5000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a unos 500 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a 400 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es de aproximadamente 150 μm .

Hidrogel trilaminar

Otro aspecto de la invención se relaciona con un hidrogel trilaminar, de aquí en adelante “el hidrogel trilaminar de la invención”, que comprende:

- una capa inferior que comprende el hidrogel monolaminar de la invención,
- una capa intermedia que comprende el hidrogel monolaminar de la invención,
- 20 y
- una capa superior que comprende un hidrogel que comprende Col I, queratina (Kt), y esfingolípidos (Sph).

Como se ha mencionado previamente, los hidrogeles de la invención pueden organizarse en múltiples capas (o láminas). Cada capa puede definirse por su composición y propiedades fisicoquímicas y/o biológicas. Preferiblemente, cada capa presenta una composición y/o propiedades homogéneas en la misma, que la diferencian. La organización en capas de los hidrogeles de la invención, les permiten emular o imitar la estructura de los tejidos corporales, dotándolos de una arquitectura estructural que contribuyen a mejorar el biomimetismo de los mismos.

El término “trilaminar”, tal y como se usa aquí, en relación al hidrogel y su organización o disposición, se refiere a que los componentes que conforman el hidrogel están dispuestos en tres capas.

35

En la presente invención, el hidrogel trilaminar imita la estructura de la piel. La piel presenta tres capas diferenciadas, ordenadas de más superficial a menos como se indica a continuación: la epidermis o capa epidérmica, la dermis o capa dérmica y la hipodermis o capa hipodérmica. La “capa hipodérmica” de la piel es una capa situada
 5 directamente debajo de la dermis. Esta capa está formada por tejido conectivo areolar o laxo bien vascularizado, y por tejido adiposo, que funciona como modo de almacenamiento de grasa y proporciona aislamiento y amortiguación. La “capa dérmica” de la piel es la capa intermedia de la piel. Esta capa presenta tejido conectivo, y otras estructuras. Está formada por una fina capa superior llamada dermis papilar y una
 10 gruesa capa inferior llamada dermis reticular. La “capa epidérmica” de la piel es una capa delgada que constituye la cara externa de la piel. Esta capa, a su vez puede comprender diversas capas o estratos, denominadas como estrato córneo, estrato lúcido, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato basal.

15 Así, en la presente invención, el hidrogel trilaminar está organizado en tres capas, cada una de las cuales a su vez comprende un hidrogel (o biotinta que lo comprende):

La capa inferior del hidrogel trilaminar comprende el hidrogel monolaminar de la invención, que comprende colágeno tipo I (Col I), dermatán sulfato (DS), ácido
 20 hialurónico (HA), y agarosa (Ag). Preferiblemente, dicha capa inferior, dispuesta debajo de la capa intermedia, biomimetiza la capa hipodérmica de la piel.

La capa intermedia del hidrogel trilaminar comprende el hidrogel monolaminar de la invención, que comprende colágeno tipo I (Col I), dermatán sulfato (DS), ácido
 25 hialurónico (HA) y agarosa (Ag). Preferiblemente, dicha capa intermedia del hidrogel trilaminar además comprende elastina. Más preferiblemente, dicha capa intermedia biomimetiza la capa dérmica de la piel.

La capa superior del hidrogel trilaminar comprende Col I, queratina (Kt) y esfingolípidos
 30 (Sph). Preferiblemente, dicha capa superior, dispuesta encima de la capa intermedia del hidrogel trilaminar, biomimetiza la capa epidérmica de la piel.

En una realización preferida del hidrogel trilaminar de la invención:

35 -la capa superior comprende Col I a una concentración de 3,5 a 5,5 mg/mL (incluyendo los extremos), Kt a una concentración de 10 a 30 mg/mL (incluyendo

los extremos) y Sph a una concentración de 2,5 a 7,5 mg/mL (incluyendo los extremos);

5 -la capa intermedia comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), Ag a una concentración de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos), y EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos); y

10 -la capa inferior comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), HA a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), y Ag a una concentración de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos).

15

En otra realización más preferida del hidrogel trilaminar de la invención:

-la capa superior comprende Col I a una concentración de 4,4 mg/mL, Kt a una concentración de 15,2 mg/mL y Sph a una concentración de 5 mg/mL;

20 -la capa intermedia comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA, a una concentración de 1 mg/mL, Ag a una concentración de 15 mg/mL, y EL a una concentración de 1 mg/mL; y

25 -la capa inferior comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA a una concentración de 1 mg/mL, y Ag a una concentración de 15 mg/mL.

30 En una realización preferida del hidrogel trilaminar de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel está liofilizado, de aquí en adelante, "el hidrogel trilaminar liofilizado de la invención". Preferiblemente, el hidrogel trilaminar liofilizado de la invención no comprende células.

35 En la presente invención, el término "liofilizado", se refiere a que el producto, en la presente invención, el hidrogel trilaminar, monolaminar o bilaminar de la invención, así como el apósito de la invención descrito más adelante, ha sido sometido a un proceso

de liofilización. El término “liofilización”, se refiere a la rápida congelación y deshidratación del producto bajo condiciones de alto vacío. En la presente invención, el término los “hidrogeles liofilizados de la invención”, se emplea para referirse al hidrogel monolaminar liofilizado de la invención, hidrogel bilaminar liofilizado de la invención y al
 5 hidrogel trilaminar liofilizado de la invención de forma conjunta

En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel monolaminar, bilaminar o trilaminar de la invención está deshidratado.

10

Además, como ya se ha mencionado previamente, los hidrogeles de la invención pueden comprender células, preferiblemente células humanas. Preferiblemente, las células de los hidrogeles de la invención comprenden células que pueden estar presentes en las diferentes capas de la piel nativa. Ejemplos de tipos de células que
 15 pueden estar presentes en la piel, incluyen, sin limitar a, queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel, fibroblastos dérmicos, mastocitos, células musculares lisas vasculares, células mioepiteliales, histiocitos, neutrófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Treg), eosinófilos, monocitos, células madre, células madre del folículo piloso, células madre
 20 mesenquimales, adipocitos, células NK (por sus siglas en inglés, *Natural Killer*).

Así, en una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel trilaminar de la invención además comprende células seleccionadas de la lista que consiste en queratinocitos, melanocitos, células de
 25 Langerhans, células de Merkel, fibroblastos dérmicos, mastocitos, células musculares lisas vasculares, células mioepiteliales, histiocitos, neutrófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Treg), eosinófilos, monocitos, células madre mesenquimales, adipocitos, células NK, y cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, el hidrogel trilaminar de la invención, comprende fibroblastos dérmicos
 30 (DFs), células madre mesenquimales (MSCs) y/o queratinocitos epidérmicos (EK). Más preferiblemente, la capa superior comprende EK, la capa intermedia comprende DFs y la capa inferior comprende MSCs. Aún más preferiblemente, los DFs, MSCs y/o EK son humanos.

35 Los términos “células madre mesenquimales” y fibroblastos dérmicos”, han sido

explicados previamente en otro aspecto de la invención, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas, son aplicables al presente aspecto de la invención.

El término “queratinocitos epidérmicos”, (EK, por sus siglas en inglés *Epidermal Keratinocytes*), tal como se utiliza aquí, se refiere al principal tipo de célula de la epidermis, constituyendo aproximadamente el 90% de las células de la misma. Los queratinocitos epidérmicos proliferan en el estrato basal de la epidermis y comienzan a diferenciarse en su camino hacia la superficie, sufriendo una diferenciación gradual. Durante este proceso, cambian profundamente su morfología y comienzan a producir queratina, citoquinas, factores de crecimiento, interleucinas y factores del complemento. Los queratinocitos desempeñan un papel importante en la protección, ya que forman una barrera hermética que impide la entrada de sustancias extrañas en el cuerpo, al tiempo que minimizan la pérdida de humedad, calor y otros componentes. Estas células tienen también un papel estructural, formando estrechos vínculos con las demás células de la epidermis y manteniéndolas en su lugar. Además, los queratinocitos funcionan como inmunomoduladores tras las lesiones cutáneas.

En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, las células madre mesenquimales proceden de tejido adiposo, preferiblemente tejido adiposo humano. En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, los fibroblastos dérmicos y/o los queratinocitos epidérmicos, proceden de muestras de piel, preferiblemente humanas.

En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la concentración de MSCs en la capa inferior del hidrogel trilaminar de la invención es de 1M/mL y la concentración de DFs en la capa intermedia del hidrogel trilaminar de la invención es de 1M/mL.

En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la concentración de EKs en el hidrogel trilaminar de la invención es de 1M/cm².

Además, otras células que pueden estar comprendidas en el hidrogel trilaminar de la invención incluyen células utilizadas en la regeneración de tejidos, tales como, pero sin limitar a, células madre de folículo piloso, células endoteliales, fibras nerviosas,

corpúsculos de Pacini, corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Krause, los corpúsculos de Ruffini.

En una realización preferida, el hidrogel trilaminar de la invención está deshidratado.

5 Métodos de deshidratación son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, el hidrogel trilaminar deshidratado se obtiene mediante una etapa de deshidratación que comprende la aplicación de presión, más preferiblemente, la aplicación de 50 a 150g de presión, incluyendo los valores extremos. Aún más preferiblemente, la deshidratación comprende la aplicación de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80,
10 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 g de presión.

En otra realización preferida, la deshidratación comprende la aplicación de presión durante 1 a 5 minutos. Preferiblemente, comprende la aplicación de presión durante 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. Más preferiblemente, comprende la aplicación de presión durante 2
15 minutos.

En otra realización más preferida, la deshidratación comprende la aplicación de 100 g de presión durante 2 minutos.

20 Además, el hidrogel trilaminar de la invención puede presentar unas dimensiones adecuadas para las aplicaciones de ingeniería tisular. En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel trilaminar de la invención comprende un diámetro de 10 a 40 mm (incluyendo los valores extremos), y una altura de 0,3 a 10 mm (incluyendo los valores externos). Más preferiblemente, el
25 hidrogel bilaminar de la invención comprende un diámetro de 20 mm, y una altura de 4 mm.

En ciertas realizaciones del hidrogel trilaminar de la invención, el grosor de la capa superior es de 100 a 500 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es
30 de 100 a 400 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de 100 a 400 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a unos 300 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a 100 μm . En determinadas
35 realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a 200 μm . En determinadas

realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a 300 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a 400 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a 500 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es superior a 600 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a unos 500 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 400 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 300 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa superior es inferior a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa superior es de aproximadamente 150 μm .

10

En ciertas realizaciones del hidrogel trilaminar de la invención, el grosor de la capa intermedia es de 100 a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 200 a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 300 a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 400 a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 100 a 900 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 100 a 800 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 100 a 700 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de 100 a 600 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de, al menos, 100 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de, al menos, 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de, al menos, 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de, al menos, 400 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior 2000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior a 1500 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior a 900 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior a 800 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior a 700 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es inferior a 600 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa intermedia es de aproximadamente 500 μm .

30

En ciertas realizaciones del hidrogel trilaminar de la invención, el grosor de la capa inferior es superior a unos 100 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 400 μm .

35

En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 500 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 600 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 700 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 800 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 900 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 1000 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 400 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 500 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es superior a 125 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a unos 500 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a 400 μm . En determinadas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a 300 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es inferior a 200 μm . En ciertas realizaciones, el grosor de la capa inferior es de aproximadamente 150 μm .

Biotintas de la invención

Los inventores han caracterizado biotintas basadas en los hidrogeles de la invención, demostrando que presentan propiedades fisicoquímicas apropiadas para su aplicación práctica, como su pH, inyectabilidad, tiempo de gelificación, degradación o reología.

Así, otro aspecto de la invención se relaciona con una biotinta que comprende cualquiera de los hidrogeles de la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de cualquiera de los hidrogeles de la invención para la fabricación de una biotinta.

El término "biotinta", tal como se utiliza aquí, se refiere a un hidrogel o a una mezcla de componentes, en la presente invención, componentes que pueden estar presentes en piel nativa, pudiendo incluir células, utilizado para la bioimpresión y/o pulverización ("spraying"). La textura de la biotinta puede ser líquida, semisólida, o sólida.

El término "biompresión", o más en particular, "bioimpresión 3D", se refiere a la utilización de técnicas de impresión, preferiblemente impresión 3D, para combinar biomateriales con el fin de fabricar un objeto, pieza, tejido o estructura en 3D que imite

al máximo las características naturales y biológicas. Preferiblemente, la bioimpresión 3D utiliza el método de capa por capa para depositar materiales o biotintas para crear estructuras que posteriormente se utilizan en los campos de la biotecnología, la medicina y la ingeniería de tejidos.

5

Como sabe un experto en la materia, la biotinta puede además comprender otros componentes útiles en el proceso de bioimpresión o en el producto final. Ejemplos de dichos componentes incluyen, sin limitar a, alginato, gelatina de diversos orígenes (piel de pescado, bovina, porcina), fibrinógeno de diversos orígenes (plasma bovino, porcino, humano), hialuronato sódico intraarticular, fibroína de seda y sericina, xantano, genipina, agarosa, agar, quitosano, nanocelulosa, o sus variantes metacriladas, o cualquier combinación de los mismos.

10

Según el hidrogel de la invención en el que estén basados, se pueden diferenciar diferentes biotintas. En el presente documento, se emplea el término “biotintas de la invención”, para referirnos a las biotintas de forma conjunta, o a cualquiera/s de las biotintas de la invención.

15

Otro aspecto de la invención, se refiere al uso del hidrogel monolaminar como biotinta hipodérmica o dérmica.

20

Una realización preferida, se refiere al uso del hidrogel monolaminar como biotinta hipodérmica cuando el hidrogel comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato y ácido hialurónico. Otra realización más preferida, se refiere al uso del hidrogel monolaminar como biotinta hipodérmica, cuando el hidrogel comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato, ácido hialurónico y células madre mesenquimales, preferiblemente donde las células madre mesenquimales son humanas.

25

Otra realización preferida, se refiere al uso del hidrogel monolaminar como biotinta dérmica cuando el hidrogel comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato, ácido hialurónico y elastina. Otra realización más preferida, se refiere al uso del hidrogel monolaminar como biotinta dérmica cuando el hidrogel comprende colágeno tipo I, agarosa, dermatán sulfato, ácido hialurónico, elastina y fibroblastos dérmicos, preferiblemente donde los fibroblastos dérmicos son humanos.

30

35

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un hidrogel que comprende Col I, queratina y esfingolípidos como biotinta epidérmica. Una realización preferida, se refiere al uso de un hidrogel que comprende Col I, queratina, esfingolípidos y queratinocitos, como biotinta epidérmica, preferiblemente donde los queratinocitos son humanos.

5

Los términos explicados para las biotintas de la invención han sido explicados previamente en otros aspectos de la invención, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas, son aplicables a las biotintas de la invención.

10 *Apósito de la invención*

Los hidrogeles de la invención, incluyendo los hidrogeles liofilizados de la invención, y biotintas de la invención, pueden formar parte de un apósito o implante. De hecho, los hidrogeles y biotintas de la invención pueden ser usados para la fabricación de un apósito o implante.

15

Así, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de un hidrogel o hidrogeles de la invención, o de una biotinta o biotintas de la invención para la fabricación de un apósito o implante, preferiblemente cutáneo o subcutáneo.

20 Otro aspecto de la invención, se relaciona con un apósito o implante, de aquí en adelante, "el apósito o implante de la invención", preferiblemente cutáneo o subcutáneo, que comprende un hidrogel o hidrogeles de la invención, o una biotinta o biotintas de la invención.

25 Los términos "apósito" o "implante", se utilizan como sinónimos y se refieren a cualquier objeto o elemento que sea biocompatible con el estado fisiológico del cuerpo del sujeto y no produzca efectos secundarios adversos, y que esté estructurado diseñado o configurado para ser colocado parcial o totalmente en el cuerpo de un sujeto con uno o más fines terapéuticos o profilácticos, como el aumento de los tejidos, el contorno, el
30 restablecimiento de la función fisiológica, la reparación o el restablecimiento de los tejidos dañados por una enfermedad o un traumatismo, y/o la administración de agentes terapéuticos a órganos y tejidos normales, dañados o enfermos.

En una realización preferida, el apósito o implante está liofilizado. El término "liofilizado"
35 ya ha sido explicado en otros aspectos de la invención, y tanto su definición como

realizaciones preferidas, son aplicables presente aspecto de la invención.

El apósito o implante puede ser sólido, semisólido o líquido, y puede ser amorfo, esférico, semiesférico, rectangular, cuadrado, discoidal o cilíndrico. Además, por ejemplo, el diámetro apósito puede ser de 0,05 mm a 100 mm, de 0,1 mm a 50 mm, de 0,1 mm a 30 mm, o de 0,2 mm a 15 mm, y puede ser proveído en tal tamaño o forma. Además, el apósito o implante puede aplicarse a un sitio objetivo (por ejemplo, un sitio de daño tisular), implantarse o puede cambiar su forma de acuerdo con la forma del sitio dañado.

10

Los términos del presente aspecto de la invención han sido explicados previamente en otros aspectos de la invención, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas, son aplicables al apósito de la invención.

15 *Composición farmacéutica de la invención*

El hidrogel monolaminar, bilaminar o triaminar de la invención, así como la biotinta/s de la invención, pueden estar comprendidas en una composición, de aquí en adelante la “composición de la invención”. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, de aquí en adelante “la composición farmacéutica de la invención”, que comprende el hidrogel monolaminar, el hidrogel bilaminar, el hidrogel trilaminar de la invención, o la biotinta/s de la invención.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, más preferiblemente a un mamífero, incluyendo un humano, en una amplia variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse a, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden

prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido

5 algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

Como entiende un experto en la materia, la composición según la presente invención

10 puede formularse con un excipiente y/o un vehículo. Así, en una realización particular, la composición de la invención comprende un excipiente y/o un vehículo. En el caso de la composición farmacéutica, ésta puede formularse con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 El término "excipiente" se refiere a una sustancia que ayuda a absorber alguno de los componentes de la composición de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda en la preparación de la composición, como por ejemplo darle consistencia. Así, los excipientes pueden tener la función de mantener unidos los componentes, como por ejemplo los almidones, los azúcares o las celulosas, una función edulcorante, una

20 función colorante, la función de proteger el medicamento, como por ejemplo aislarlo del aire y/o de la humedad, una función de relleno de un comprimido, de una cápsula o de cualquier otra forma de formulación, como por ejemplo el fosfato cálcico dibásico, una función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo. Por

25 lo tanto, el término "excipiente" se define como cualquier material incluido en las formas galénicas que se añade a los principios activos o a sus asociaciones para permitir su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición y su biodisponibilidad. El excipiente "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de los compuestos de la

30 composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes. Ejemplos de excipientes son aglutinantes, cargas, desintegradores, lubricantes, recubrimientos, edulcorantes, aromatizantes y colorantes. Ejemplos no limitantes y más específicos de excipientes aceptables son almidones, azúcares, xilitol, sorbitol, fosfato de calcio, grasas esteroideas, talco, sílice o glicerina, entre otros.

35

El término "vehículo" se refiere a un compuesto que facilita la incorporación de otros compuestos para permitir una mejor dosificación y administración o para dar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se utiliza para diluir alguno de los componentes de la composición de la presente invención hasta un volumen o peso determinado, o incluso sin diluir dichos componentes, capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. En una realización particular, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

- 10 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende al menos un principio activo capaz de modular las propiedades/funciones de los tejidos o áreas en las que se aplica o administra.

- 15 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende al menos un principio activo que favorece la reparación o regeneración de tejidos de la piel.

- El principio activo puede incluir polinucleótidos y/o polipéptidos que codifican o comprenden, por ejemplo, factores de transcripción, factores de diferenciación, factores de crecimiento y combinaciones de los mismos. La frase "al menos un agente activo" también puede incluir cualquier agente capaz de promover la formación de tejido (por ejemplo, tejidos de la piel), y/o dirigirse a un estado de enfermedad específico, preferiblemente, enfermedad que afecte a la piel. Preferiblemente, el principio activo es un agente bioactivo. Entre los ejemplos de agentes bioactivos se encuentran, sin limitar a, agentes quimiotácticos, glicoproteínas, lipoproteínas, mediadores de la unión celular, ligandos biológicamente activos, secuencia de unión a integrinas, diversos agentes de crecimiento y/o diferenciación y fragmentos de los mismos (por ejemplo, EGF), HGF, VEGF, factores de crecimiento de fibroblastos (por ejemplo, bFGF), PDGF, factor de crecimiento similar a la insulina (por ejemplo, IGF-I, IGF-II) y factores de crecimiento transformantes (por ejemplo, TGF- β I-III), factores de diferenciación del crecimiento (por ejemplo, GDF5, GDF6, GDF8), factores de crecimiento humanos recombinantes (p. ej, MP-52 y la variante MP-52 rhGDF-5), proteínas morfogénicas derivadas del cartílago (CDMP-1, CDMP-2, CDMP-3), pequeñas moléculas que afectan a la regulación de factores de crecimiento específicos, tenascina-C, condroitín sulfato, fibronectina, decorina, tromboelastina péptidos derivados de la trombina, dominios de unión a la

heparina, heparina, sulfato de heparina, polinucleótidos, fragmentos de ADN, plásmidos de ADN, MMP, TIMP, moléculas de ARN de interferencia, ADN que codifique un ARN de interés, oligonucleótidos, proteoglicanos, glicoproteínas y glucosaminoglicanos.

- 5 La vía de administración de la composición de la invención, preferiblemente la composición farmacéutica de la invención, y/o sus formulaciones, así como los hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, las biotintas de la invención, incluye, sin limitar a, administración parenteral como intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o inyección intraarticular, 10 administración dérmica, administración intradérmica, administración tópica, administración intranasal, administración oral, o administración transmucosa.

En una realización preferida, la vía de administración es seleccionada de la lista que consiste en administración tópica, dérmica, intradérmica, subcutánea e intralesional.

15

Usos de la invención

Los hidrogeles de la invención, así como los aspectos derivados del mismo, encuentran diversos usos y aplicaciones, que serán descritos a continuación.

20

Usos terapéuticos

- Como se ha explicado previamente, los inventores han demostrado que los hidrogeles de la invención y aspectos derivados de los mismos, presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas de interés, especialmente para su aplicación en ingeniería tisular, además de ser capaces de promover la cicatrización de heridas, teniendo 25 aplicación en medicina, más en particular en medicina regenerativa y/o en la regeneración, reparación, o sustitución de tejidos de la piel de un sujeto.

- En la presente invención se entiende por “sujeto” a cualquier animal, preferiblemente un 30 mamífero, más preferiblemente un primate, en particular, un ser humano, de cualquier raza, sexo o edad.

- Así, otro aspecto de la invención se relaciona con uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la 35 invención, biotintas de la invención, o composición farmacéutica de la invención, para

su uso en medicina, preferiblemente en medicina regenerativa.

En otro aspecto, la invención se relaciona con uno de los hidrogeles de la invención, los hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, o biotinta de la invención para su uso en medicina, preferiblemente en
5 medicina regenerativa, en donde el hidrogel, hidrogeles, hidrogeles obtenidos por el método de obtención, o biotinta de la invención es proveído en forma de un implante.

Otro aspecto de la invención se relaciona con uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotintas de la invención, o composición farmacéutica de la invención, para
10 su uso en la regeneración, reparación o sustitución de tejidos de la piel.

Los tejidos de la piel incluyen tejidos propios de las capas epidérmicas, dérmicas e hipodérmicas. Así, una realización preferida, se refiere a los hidrogeles de la invención
15 (hidrogel monolaminar, hidrogel bilaminar y/o hidrogel trilaminar), la biotinta de la invención o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la regeneración, reparación y/o sustitución de la epidermis, dermis y/o hipodermis.

El término “regeneración”, tal y como se usa aquí, se refiere a la sustitución completa del tejido dañado por tejido nuevo.
20

El término “reparación”, tal y como se usa aquí, se refiere a la restauración de la estructura de un tejido que previamente ha sufrido un daño, así como la restauración de sus componentes y/o función.
25

El término “sustitución”, tal y como se usa aquí, se refiere a un reemplazo o reproducción de propiedades presentes en tejido nativo.

Otro aspecto de la invención se relaciona con uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotintas de la invención, o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de lesiones o heridas de la piel.
30

Tal como se utiliza aquí, el término “tratamiento” (término intercambiable con “terapia” y
35

que pueden emplearse en el presente documento de forma indistinta) se refiere a procesos que implican una ralentización, interrupción, detención, control, detención, reducción o reversión de la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, condición o enfermedad existente, pero no implica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas, condiciones o trastornos relacionados con la enfermedad. Además, el "tratamiento" también puede referirse a un proceso que implica evitar la aparición de síntomas que aún no se han manifestado, pero que se manifestarán debido a una progresión no tratada del trastorno, condición o enfermedad. El tratamiento de un trastorno o enfermedad puede, por ejemplo, conducir a la detención de la progresión del trastorno o la enfermedad (por ejemplo, sin deterioro de los síntomas) o a un retraso en la progresión del trastorno o la enfermedad (en caso de que la detención de la progresión sea sólo de carácter transitorio). El "tratamiento" de un trastorno o enfermedad también puede conducir a una respuesta parcial (por ejemplo, la mejora de los síntomas) o completa (por ejemplo, la desaparición de los síntomas) del sujeto/paciente que sufre el trastorno o la enfermedad. Por consiguiente, el "tratamiento" de un trastorno o enfermedad también puede referirse a una mejora del trastorno o enfermedad, que puede, por ejemplo, conducir a una detención de la progresión del trastorno o enfermedad o a un retraso en la progresión del trastorno o enfermedad. Dicha respuesta parcial o completa puede ir seguida de una recaída. Debe entenderse que un sujeto/paciente puede experimentar una amplia gama de respuestas a un tratamiento (como las respuestas ejemplares descritas anteriormente). En la presente invención, la condición o el trastorno a tratar son afecciones o patologías que afectan a la piel, preferiblemente lesiones o heridas de la piel.

25 *Usos de los hidrogeles de la invención, y aspectos derivados del mismo, en la fabricación de un medicamento.*

Como ya se ha mencionado, los hidrogeles de la invención y aspectos derivados del mismo, tienen aplicación en medicina, más en particular en medicina regenerativa, y/o en la regeneración, reparación, o sustitución de tejidos de la piel de un sujeto.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, o biotintas de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica o medicamento. Las técnicas y procedimientos para elaborar

composiciones farmacéuticas son conocidas en el estado de la técnica. A su vez, el término composición farmacéutica, así como sus realizaciones preferidas ya han sido explicadas en el presente documento.

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, o biotinta de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para regenerar, reparar o sustituir tejidos de la piel.
- 10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, o biotintas de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de lesiones o heridas de la piel.
- 15 Los términos empleados para definir dichos aspectos de la invención ya han sido explicados previamente, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son aplicables a ellos.

Uso cosmético

- 20 Otro aspecto de la invención se relaciona con una composición cosmética, de aquí en adelante "la composición cosmética de la invención" que comprende el hidrogel monolaminar, el hidrogel bilaminar, el hidrogel trilaminar de la invención, o la biotinta/s de la invención. La composición cosmética de la invención puede prepararse en diversas formas, por ejemplo, emulsiones, lociones, cremas (aceite en agua, agua en aceite,
- 25 multifase), soluciones, suspensiones, productos anhidros (a base de aceite y glicol), geles, máscaras, paquetes, polvos y similares. Además, la composición cosmética de la presente invención puede incluir un vehículo aceptable en una preparación cosmética. Aquí, el "vehículo aceptable en la preparación cosmética" es un compuesto conocido en el estado de la técnica que puede incluirse en las preparaciones cosméticas.

- 30 Ejemplos de vehículos aceptables en la preparación cosmética incluyen, sin limitar a, alcoholes, aceites, tensioactivos, ácidos grasos, aceites de silicona, agentes humectantes, agentes hidratantes, modificadores de la viscosidad, emulsiones, estabilizadores, protectores solares, colorantes, fragancias y similares.

35

Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso cosmético de cualquiera de los hidrogeles de la invención, biotinta de la invención, composición de la invención, preferiblemente la composición cosmética de la invención, o apósito de la invención.

- 5 El término “uso cosmético” se refiere a un uso no terapéutico que puede mejorar el aspecto estético o la comodidad de algún área, órgano o tejido de un sujeto, en la presente invención relacionada con la piel, así como su mejora y/o prevención de daños. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

10 *Usos in vitro de los hidrogeles de la invención, y aspectos derivados del mismo*

Además de las aplicaciones mencionadas más arriba, también es posible la aplicación del hidrogel, así como los aspectos inventivos derivados del mismo en ensayos *in vitro*.

- 15 Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso de uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotinta de la invención, composición de la invención, o apósito de la invención, para promover *in vitro* la cicatrización de heridas.

- 20 El término “cicatrización”, tal y como se emplea aquí, se refiere a un proceso natural que tiene el cuerpo para regenerar tejidos comprometidos, en la presente invención tejidos de la piel, debidas a una herida. En dicho proceso se llevan a cabo una serie de complejos fenómenos bioquímicos que tienen lugar para reparar el daño causado por la herida.

25

El término “herida”, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un trastorno en el que áreas o tejidos se cortan, se desgarran, se queman o se traumatizan provocando daños. También puede referirse a una lesión o trastorno en el cuerpo humano causada por una enfermedad. Además, la herida puede ser una herida causada por otra enfermedad. Por ejemplo, la herida puede ser una fibrosis, una diabetes, una úlcera diabética, una enfermedad cutánea autoinmune, una abrasión, una laceración, una incisión, un hematoma, un pinchazo, un desprendimiento, una quemadura, una úlcera, una úlcera de decúbito o una combinación de ellas

- 35 En una realización preferida, la herida se selecciona del grupo que consiste en herida

crónica, herida aguda, herida quirúrgica, herida ortopédica, herida traumática, herida de combate, y cualquier combinación de las mismas.

Además, los hidrogeles de la invención y aspectos derivados de los mismos han
 5 mostrado la capacidad de restaurar los niveles de melanina. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de uno de los hidrogeles de la invención, los hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotintas de la invención, composición o apósito de la invención, para promover *in vitro* la producción de melanina en células aisladas de piel. Preferiblemente, las células
 10 aisladas son de piel humana.

Los hidrogeles de la invención, el apósito de la invención o las biotintas de la invención pueden utilizarse como modelo de piel, incluyendo modelo patológico de piel, lesiones o tumores. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con el uso *in vitro* de uno de
 15 los hidrogeles de la invención, los hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotinta de la invención, o apósito de la invención como modelo de piel artificial. Preferiblemente, se relaciona con el uso *in vitro* como modelo de piel artificial en tests o pruebas de laboratorio para evaluar los efectos ejercidos por sustancias bajo estudio.

20 Además, los hidrogeles de la invención, el apósito de la invención o las biotintas de la invención pueden emplearse para testear fármacos y/o compuestos tóxicos para la piel. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con el uso *in vitro* de uno de los hidrogeles de la invención, los hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de
 25 obtención de la invención, biotinta de la invención, o apósito de la invención para testear fármacos y/o compuestos tóxicos para la piel.

Tal y como se usa aquí, el término “testear” se refiere a medir o valorar el potencial efecto en la piel de sustancias bajo estudio, tales como compuestos químicos,
 30 moléculas, compuestos tóxicos, o fármacos. También se refiere a valorar el efecto de sustancias bajo estudio, para identificar fármacos y/o compuestos tóxicos para la piel.

Método de obtención del hidrogel

35 Los hidrogeles de la invención pueden ser obtenidos por un método, de aquí en adelante

“el método de obtención de los hidrogeles de la invención” o “método de la invención”. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con un método de obtención de los hidrogeles de la invención que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) mezclar Col I, agarosa, DS, HA y EL, obteniendo una solución (i),
b) mezclar Col I, agarosa, DS, HA, obteniendo una solución (ii), y
c) poner en contacto la solución (i) y la solución (ii), obteniendo un hidrogel bilaminar.

- 10 Preferiblemente, el hidrogel bilaminar obtenido en la etapa c) es el hidrogel bilaminar de la invención.

En otra realización preferida del método de la invención, la agarosa es previamente calentada a una temperatura de 60 a 80 °C, preferiblemente 70 °C. antes de mezclar
15 con el resto de componentes en las etapas a) y b) del método. Más preferiblemente, la agarosa es previamente calentada a una temperatura de 60 a 80 °C, preferiblemente 70 °C, y posteriormente atemperada, preferiblemente a una temperatura de, al menos, 37 °C, más preferiblemente atemperada a una temperatura de 37 a 40 °C (incluyendo los extremos), antes de mezclar con el resto de componentes en las etapas a) y b) del
20 método.

El término “atemperada”, tal y como se usa aquí, se refiere a una reducción o moderación de la temperatura a la que es calentada la agarosa.

- 25 En otra realización preferida del método de la invención, la etapa b) además comprende mezclar EL con el resto de componentes.

En otra realización preferida del método de la invención, las soluciones (i) y (ii) se filtran a través de un filtro o membrana porosa antes de la etapa c) del método de la invención.

- 30 Más preferiblemente, el filtro comprende un tamaño de poro de 0,22 µm.

En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas:

- 35 -la concentración de Col I es de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), la concentración de DS es de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), la

concentración de HA es de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), la concentración de Ag es de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos), y la concentración de EL es de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos) en la solución (i); y

5

- la concentración de Col I es de 1 a 3,5 mg/mL (incluyendo los extremos), la concentración de DS es de 7 a 10 mg/mL (incluyendo los extremos), la concentración de HA es de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos), la concentración de Ag es de 10 a 30 mg/mL (incluyendo los extremos), y la concentración de EL es de 0,5 a 1,5 mg/mL (incluyendo los extremos) en la solución (ii).

10

En otra realización más preferida del método de la invención:

-la concentración de Col I es 2,2 mg/mL, la concentración de DS es 8,4 mg/mL, la concentración de HA es 1 mg/mL, la concentración de Ag es 15 mg/mL, y la concentración de EL es 1 mg/mL en la solución (i); y

15

-la concentración de Col I es 2,2 mg/mL, la concentración de DS es 8,4 mg/mL, la concentración de HA es 1 mg/mL, y la concentración de Ag es 15 mg/mL en la solución (ii).

20

Un ejemplo de fuente adecuada de DS y HA para el propósito de la presente invención incluye el producto Dermial®, que contiene ambos componentes. Así, en otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, se utiliza Dermial® como fuente de DS y HA.

25

Además, como ya se ha mencionado previamente, algunos hidrogeles de la invención pueden comprender células, preferiblemente células humanas. Así, en otra realización preferida del método de la invención, la etapa a) además comprende añadir DFs, preferiblemente DFs humanos (hDFs), y la etapa b) además comprende añadir MSCs, preferiblemente MSCs humanos (hMSCs). En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la concentración de MSCs es de 1M/mL y la concentración de DFs es de 1M/mL.

30

Los términos “células madre mesenquimales” y fibroblastos dérmicos”, han sido

35

explicados previamente en otro aspecto de la invención, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas, son aplicables al presente aspecto de la invención.

5 En una realización preferida del método de obtención de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, en la etapa (c) que comprende poner en contacto la solución (i) y la solución (ii), ambas soluciones se añaden secuencialmente. Más preferiblemente, la solución (ii) se añade tras la solución (i). Aún más preferiblemente, la adición secuencial se realiza mediante una jeringuilla.

10 En otra realización del método de obtención del hidrogel bilaminar de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el hidrogel bilaminar es cultivado a una temperatura de 30 a 40 °C (incluyendo los valores extremos), preferiblemente a 37 °C. En otra realización preferida del método de obtención de hidrogel bilaminar de la invención, el hidrogel bilaminar es cultivado a una temperatura
15 de 30 a 40 °C en presencia de CO₂ al 5%.

Además, para la obtención de algunos hidrogeles de la invención, el método de la invención puede comprender etapas adicionales. Así, una realización preferida del método de obtención de los hidrogeles de la invención, además comprende las
20 siguientes etapas adicionales:

(d) mezclar Col I con Kt y Sph, obteniendo una solución (iii), y

(e) poner contacto la solución (iii) con el hidrogel bilaminar obtenido en c), obteniendo un hidrogel trilaminar.

25

Preferiblemente, el hidrogel trilaminar obtenido en la etapa e) del método de la invención es el hidrogel trilaminar de la invención.

30 Una realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, comprende una etapa adicional de gelificación. Dicha etapa de gelificación es posterior a la obtención del hidrogel bilaminar o posterior a la obtención del hidrogel trilaminar.

35 El término “gelificar”, como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que una solución o mezcla de componentes es transformada a un estado sólido,

semisólido o semilíquido en condiciones en las que se producen diferentes fuerzas o interacciones de los componentes que la forman mediante, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, Fuerzas de van der Waals, enlaces covalentes, iónicos, supramoleculares y combinaciones de los mismos.

5

En una realización preferida del método de la invención, la gelificación comprende:

-una primera subetapa de gelificación, que comprende incubar el hidrogel bilaminar o el hidrogel trilaminar obtenido en el método de la invención a una temperatura inferior a 37 °C durante 1 a 5 minutos (incluyendo los extremos), y

10

-una segunda subetapa, posterior a la primera subetapa de gelificación, que comprende incubar el hidrogel bilaminar o el hidrogel trilaminar a una temperatura de 37°C, preferiblemente durante 15 a 120 minutos (incluyendo los extremos).

En una realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la concentración en la solución (iii) de Col I es de 3,5 a 5,5 mg/mL (incluyendo los extremos), la concentración de Kt es de 10 a 20 mg/mL (incluyendo los extremos) y la concentración de Sph es de 2,5 a 7,5 mg/mL (incluyendo los extremos).

15

20

En otra realización más preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la concentración en la solución (iii) de Col I es 4,4 mg/mL la concentración de Kt es 15,2 mg/mL y la concentración de Sph es 5 mg/mL.

25

Como ya se ha mencionado en otros aspectos de la invención, algunos hidrogeles de la invención pueden comprender EKs. Así, otra realización preferida del método de obtención de los hidrogeles de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, además comprende añadir EKs, preferiblemente EKs humanos (hEKs). En una realización más preferida, las EKs se añaden sobre el hidrogel trilaminar obtenido en la etapa (e) o tras la etapa de gelificación. En otra realización aún más preferida, las EKs añadidas se dejan cultivar durante 0,5 a 3 semanas, más preferiblemente 1 semana. En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la concentración de EKs es de 1M/cm².

30

35

Por otro lado, los hidrogeles de la invención pueden encontrarse deshidratados,

preferiblemente, deshidratados parcialmente, lo que les otorga propiedades que incluyen, sin limitar a, mayor resistencia, rigidez o propiedades mecánicas. Así, otra realización preferida el método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, además comprende una etapa (f) de deshidratación, del
 5 hidrogel, posterior a la obtención de un hidrogel bilaminar, o posterior a la obtención de un hidrogel trilaminar

Preferiblemente, la etapa de deshidratación comprende la aplicación de presión, más preferiblemente, la aplicación de 50 a 150 g de presión, incluyendo los valores extremos.
 10 Aún más preferiblemente, la deshidratación comprende la aplicación de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 g de presión.

En otra realización preferida, la deshidratación comprende la aplicación de presión
 15 durante 1 a 5 minutos. Preferiblemente, comprende la aplicación de presión durante 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. Más preferiblemente, comprende la aplicación de presión durante 2 minutos. Aún más preferiblemente, la deshidratación comprende la aplicación de 100 g de presión durante 2 minutos.

20 Como se ha descrito previamente en otros aspectos de la invención, algunos hidrogeles de la invención, se encuentran liofilizados. Así, en algunas realizaciones preferidas, el método de la invención además comprende una última etapa de liofilización del hidrogel. La etapa de liofilización comprende liofilizar el hidrogel, preferiblemente comprende liofilizar el hidrogel bilaminar o el hidrogel trilaminar sin células. El término “liofilización”,
 25 ya ha sido explicado en aspectos de la invención anteriores, y tanto él, como sus realizaciones preferidas son aplicables al método de la invención.

Más preferiblemente, la liofilización del hidrogel comprende la congelación y posterior aplicación de vacío.

30

En una realización aún más preferida, la congelación de la etapa de liofilización se lleva a cabo a una temperatura de -20 °C a -80°C (incluyendo los extremos), más preferiblemente a -60 °C a -80 °C (incluyendo los extremos), aún más preferiblemente a -70 °C.

35

En una realización aún más preferida, sola o en combinación con las realizaciones preferidas anteriores, la etapa de aplicación de vacío se lleva a cabo durante 1,5 horas a 16 horas (incluyendo los extremos).

- 5 El hidrogel obtenido tras la última etapa de liofilización es el hidrogel bilaminar liofilizado de la invención, o el hidrogel trilaminar liofilizado de la invención.

- En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el método de la invención comprende una etapa adicional de congelación, preferiblemente, posterior a la etapa de deshidratación y previa a la liofilización. Dicha etapa de congelación comprende incubar la muestra a una temperatura inferior a -10 °C. Preferiblemente, la etapa de congelación se lleva a cabo a una temperatura de -40 °C a -10 °C, incluyendo los valores extremos. Más preferiblemente, la congelación se lleva a cabo a una temperatura de -40, -35, -30, -25, -20, -15, o -10 °C. Aún más preferiblemente, la congelación se lleva a cabo a una temperatura de -20 °C.
- 10
- 15

Como ya se ha mencionado, los hidrogeles de la invención pueden ser obtenidos por el método de obtención de los hidrogeles de la invención.

- 20 Así, otro aspecto de la invención se relaciona con el hidrogel bilaminar de la invención obtenido por el método de la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con el hidrogel bilaminar liofilizado de la invención obtenido por el método de la invención.

- 25 Otro aspecto de la invención se relaciona con el hidrogel trilaminar de la invención obtenido por el método de la invención.

- Otro aspecto de la invención se relaciona con el hidrogel trilaminar liofilizado de la invención obtenido por el método de la invención.
- 30

Algunos términos empleados para definir el método de obtención de los hidrogeles de la invención, ya han sido explicados previamente, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son aplicables al mismo.

Método de tratamiento de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de lesiones o heridas de la piel en un sujeto, que comprende la administración de uno de los
 5 hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotintas de la invención, composición farmacéutica de la invención, apósito o implante de la invención a dicho sujeto.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método de regeneración, reparación o
 10 sustitución de tejidos de la piel en un sujeto, que comprende la administración de uno de los hidrogeles de la invención, hidrogeles de la invención, hidrogeles obtenidos por el método de obtención de la invención, biotinta de la invención, composición farmacéutica de la invención, apósito o implante de la invención a dicho sujeto.

15 En una realización preferida el sujeto es un mamífero, más preferiblemente un primate, aún más preferiblemente, un ser humano.

Las referencias a los métodos de tratamiento *in vivo* mediante terapia de esta descripción deben interpretarse como referencias a las sustancias, composiciones
 20 farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en dichos métodos.

Los términos definidos y explicados para el resto de aspectos de la invención, así como las realizaciones preferidas de los mismos, también son aplicables al presente aspecto de la invención.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. (A) Diseño del hidrogel BT Skin en comparación con piel nativa. Se representan células como queratinocitos, fibroblastos y células madre mesenquimales (MSC), y
 30 componentes biológicos como queratina, esfingolípidos, colágeno tipo I, sulfato de dermatán, ácido hialurónico y elastina. (B) Imágenes de prueba de inversión de tubo y (C) resultados del tiempo de gelificación de cada biotinta hipodérmico, dérmico y epidérmico. (D) Fuerza mínima necesaria para extruir las biotintas a través de una jeringa de bioimpresora de 3 ml. Significación estadística: * P <0,05; *** P <0,005.

35

Fig. 2. Ensayos de hinchamiento (A), degradación (B) y reológicos (C y D). (A) Comportamiento de hinchazón y (B) porcentaje de degradación del hidrogel BT Skin durante 21 días. Módulos de Young (C) y módulos viscoelásticos (D) de hidrogeles BT Skin, con o sin células, antes y después del proceso de deshidratación parcial, después de 21 días en cultivo, en comparación con piel nativa. Significación estadística: * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$.

Fig. 3. Proliferación celular (A) y viabilidad (B) de la biotinta hipodérmica. Proliferación celular (C) y viabilidad (D) de la biotinta dérmica. (E) Imágenes de microscopía representativas de las biotintas hipodérmicas y dérmicas en los días 0, 7, 14 y 21. Se empleó ensayo *live/dead*, usando calceína y homodímero de etidio, las células vivas se tiñeron con calceína mientras que las células muertas se tiñeron con homodímero de etidio. Las flechas blancas señalan las células muertas, las células no señaladas son células vivas. Barras de escala: 200 μm .

Fig. 4. Proliferación celular (A) y viabilidad (B y C) del hidrogel BT Skin (las flechas blancas señalan las células muertas, las células no señaladas son células vivas. Barras de escala: 200 μm). Imágenes macroscópicas del hidrogel BT Skin (D; flecha negra: capa epidérmica), antes (E) y después (F) de la deshidratación parcial (barras de escala = 5 mm). (G) Imagen de fluorescencia confocal del hidrogel BT Skin después de 21 días de cultivo (hEK etiquetadas en la parte superior, hDF etiquetadas en Cell Tracker Red en el medio y hMSC etiquetadas en Cell Tracker Green en la parte inferior).

Fig. 5. Imágenes macroscópicas del proceso de cicatrización de heridas a lo largo del tiempo (A). El tipo de tratamiento se indica en cada fila, mientras que el tiempo de progresión (semana 0, 2, 4, 6, 8) se representa en cada columna. Las barras de escala están representadas en cada imagen: 1 cm. Evaluación cuantitativa del área de la herida/cicatriz a lo largo del tiempo para todos los grupos (B) y en grupos separados (C). Significación estadística en comparación con el control: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$. Significación estadística en comparación con el día 14: # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$.

Fig. 6. Análisis de parámetros de homeostasis por semana y grupo. Los gráficos muestran los resultados de cada grupo de tratamiento frente al grupo de piel nativa. (A, B, C, D, E, F y G) Grupo de control; (H, I, J, K, L, M y N) Grupo de autoinjerto; (O, P, Q, R, S, T y U) Piel BT sin células; (V, W, X, Y, Z, AA y AB) Piel BT. Los resultados por

semana se calcularon como el valor medio de todas las medidas de los ratones en cada momento de estudio; Grupos de control, autoinjerto, piel BT sin células y piel BT (n semanas 2, 4, 6, 8 = 8, 8, 4, 4); Grupo de piel nativa (n semanas 2, 4, 6, 8 = 32, 32, 16, 16). Significación estadística: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$.

5

Fig. 7. Tinciones histológicas con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico de Masson a partir de biopsias de la zona de la herida/cicatriz de los ratones y la piel nativa después de 4 y 8 semanas. Barra de escala: 50 μm .

10 **Fig. 8.** Perfiles de fibronectina y citoqueratina del área de la herida/cicatriz de ratones y biopsias de piel nativa después de 4 y 8 semanas. Observaciones de microscopía fluorescente. Barra de escala: 100 μm .

15 **Fig. 9.** Inyectabilidad de las biotintas base (Col I y Agarosa) y biotintas estudiadas (epidérmica, hipodérmica y dérmica).

20 **Fig. 10.** Análisis de homeostasis por parámetro. Los gráficos muestran los resultados de cada grupo de tratamiento frente al grupo de piel nativa. Los resultados por semana se calcularon como el valor medio de todas las medidas de los ratones en cada momento de estudio; Grupos de control, autoinjerto, piel BT sin células y piel BT (n semanas 2, 4, 6, 8 = 8, 8, 4, 4); Grupo de piel nativa (n semanas 2, 4, 6, 8 = 32, 32, 16, 16). Significación estadística: *** $P < 0,005$.

25 **Fig. 11.** Tinciones histológicas con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico de Masson a partir de biopsias de la zona de la herida/cicatriz de los ratones y la piel nativa después de 4 y 8 semanas. Barra de escala: 500 μm .

30 **Fig. 12.** Liofilizado (F-D). (A) Compresión y (B) Viscoelasticidad. Proliferación (C) y viabilidad (D) celular. (E) Imágenes de fluorescencia confocal tras 21 días. D: días.

35 **Fig. 13.** (A) Imágenes macroscópicas del proceso de curación de herida a lo largo del tiempo. Tipo de tratamiento indicado en cada fila, progresión temporal indicada en cada columna (semanas 0, 2, 4, y 8). Las barras de escala representadas en cada imagen: 1 cm. (B) Evaluación cuantitativa del área de herida/cicatriz a lo largo del tiempo para todas las condiciones, y (C) por condición. Significación estadística comparada con el

control: ***P < 0.005. Significación estadística comparada con el día 14: #P < 0.05; ##P < 0.01.

Fig. 14. Análisis de los parámetros de homeostasis por semana y grupo. Las gráficas muestran los resultados de cada grupo comparado con los de piel nativa. (A, B, C, D, E, P, Q) Grupo apósito liofilizado, (F, G, H, I, J, R, S) grupo autoinjerto, y (K, L, M, N, O, T, U) grupo control. Los resultados por semana se calcularon como la media de las medidas de todos los ratones a cada punto temporal; Liofilizado, autoinjerto, control (n por semana 2, 4, 6, 8 = 24, 24, 12, 12); piel nativa (n por semana 2, 4, 6, 8 = 8, 8, 4, 4). Significación estadística: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,005.

Fig. 15. Tinciones histológicas de hematoxilina & eosina (H&E) y Tricrómico de Masson de biopsias de piel de ratón en zona de herida/cicatriz y piel nativa tras 4 y 8 semanas. Escala: 50 µm.

Fig. 16. Perfiles de fibronectina y citoqueratina de biopsias de piel de ratón en zona de herida/cicatriz y piel nativa tras 4 y 8 semanas. Observaciones de microscopía fluorescente. Escala: 100 µm.

Fig. 17. Viabilidad celular de las formulaciones de los hidrogeles AC_{low} y AC. (A) Imágenes de confocal de los hidrogeles cargados con fibroblastos tras 7 y 14 días. La calceína marca las células vivas y el heterodímero de etidio las muertas. Las flechas blancas señalan las células muertas, las células no señaladas son células vivas. Escala = 500µm. (B) Viabilidad celular (%) en los hidrogeles tras 7 y 14 días. Se realizó un análisis de t de Student de doble cola para calcular la significación de las muestras de los hidrogeles AC_{low} y AC en unos niveles de significación de: * p < 0.05.

Fig. 18. Ensayo de viabilidad celular de muestras de hidrogel AC, ACD, ACDH y ACDHE. (A) Imágenes de microscopía confocal de hidrogeles cargados con hDF a los 0, 7, 14 y 21 días. La calceína tiñe las células vivas, mientras que el EthD-1 tiñe las células muertas. Las flechas blancas señalan las células muertas, las células no señaladas son células vivas. Barra de escala = 500 µm. (B) Viabilidad celular (%) en los andamios de hidrogel después de 0, 1, 7, 14 y 21 días. Se realizaron análisis de prueba T de Student de dos colas para muestras de ACD, ACDH, ACDHE en comparación con muestras de AC en cada punto de tiempo en niveles significativos de: * p < 0,05 y ** p

< 0,01; y para muestras de ACDHE comparadas con ACD, muestras de ACDH en cada punto de tiempo a niveles significativos de: # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$.

Fig. 19. Prueba de inversión de tubo y ultraestructura de los hidrogeles. (A) Representación de hidrogeles AC (tapa blanca) y ACDHE (tapa negra) que resisten la prueba de inversión del tubo. (B) imágenes ESEM (barra de escala = 1 μm) y (C) caracterización del tamaño de poro de los hidrogeles ACD, ACDH y ACDHE. Se realizaron análisis de la prueba T de Student de dos colas para las muestras de ACDH y ACDHE en comparación con las muestras de ACD con un nivel de significación de: *** $p < 0,05$.

Fig. 20. Ensayos de hinchamiento, degradación y mecánica. (A) Comportamiento de hinchamiento y (B) tasas de degradación del hidrogel ACDHE en un lapso de tiempo de 21 días. (C-E) Mediciones mecánicas: (C) Módulos de Young, (D) módulos de almacenamiento, y (E) módulos de pérdida de hidrogeles AC y ACDHE sin células y con células a 1, 14 y 21 días en condiciones de cultivo, en comparación con piel humana nativa. Se realizaron análisis de prueba T de Student de dos colas para muestras de piel humana en comparación con muestras AC y ACDHE en el día 21 a niveles significativos de: * $p < 0,05$ y *** $p < 0,005$; y para muestras AC comparadas con muestras ACDHE en cada punto de tiempo a un nivel de significancia de: # $p < 0,05$.

Fig. 21. Rango de tensión analizado para obtener el módulo de Young de los hidrogeles con y sin células AC y ACDHE, y de muestras de piel humana.

Fig. 22. Ensayo de cicatrización de herida in vitro de hDF y hMSC tratadas con medios suplementados con DHE. Se utilizó medio de cultivo sin suplementos como control para las células no tratadas. Las imágenes (A) y los resultados analizados (B, C) mostraron el cierre de la herida a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Significación estadística: * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$. Abreviaturas: DHE, dermatán sulfato, ácido hialurónico y elastina; MSC, células madre mesenquimales.

Fig. 23. Hidrogel ACDHE bilaminar. (A) Aspecto macroscópico de los hidrogeles ACDHE bilaminares. (B) Imagen de sección transversal vertical del hidrogel bilaminar adquirido por microscopía confocal (las flechas blancas señalan las células muertas, las células no señaladas son células vivas. Barras de escala: 200 μm). Las vistas lateral e inferior

también se incluyen en los lados derecho e inferior de la figura. Los hDF y las hMSC se tiñen con CellTrackerTM Green CMFDA (CTG) y CellTrackerTM Red CMTPX (CTR), respectivamente. Barra de escala = 1000 μm . (C) Imágenes de microscopía confocal de la viabilidad celular del hidrogel ACDHE en los días 0, 7, 14 y 21. Adicionalmente se muestra la imagen aumentada del hidrogel ACDHE bilaminar en el día 21, la línea de puntos blanca separa la capa de fibroblastos (arriba) de la capa hMSCs (abajo). Barra de escala = 500 μm . (D) Resultados de proliferación de los hidrogeles ACDHE hasta 21 días.

Fig. 24. ESEM de hidrogel bilaminar ACDHE. (A-F) Imágenes ESEM (barra de escala = 1 μm) de hidrogeles ACDHE. Barras de escala: (A) 20 μm ; (B) 10 μm ; (C y E) 3 μm ; (D y F) 2 μm . (E y F). Imágenes ESEM que muestran células y estructuras similares a la MEC producidas por células.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la invención.

1. Materiales y métodos

1.1. Modelo trilaminar

1.1.1. Cultivos celulares

Se aislaron células madre mesenquimales humanas (hMSC, por sus siglas en inglés) del tejido adiposo humano y se caracterizaron utilizando un método ya descrito (López-Ruiz E, *et al.*, Eur Cells Mater., 35:209–24 (2018); Gálvez-Martín P, *et al.*, Eur J Pharm Biopharm., 86(3):459–68 (2014)). Todas las muestras humanas utilizadas en este estudio se obtuvieron con consentimiento informado y aprobación del Comité de Revisión Institucional (número de permiso ético: 02/022010 Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, España), y se transportaron al laboratorio en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) con penicilina y estreptomicina al 1% (P/S; Invitrogen). Las hMSC se cultivaron en DMEM con alto

contenido de glucosa complementado con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) al 10% y P/S al 1%, a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. El medio se renovó cada 3 días. Al 80% de confluencia, las células se subcultivaron y se usaron entre los pases 4 y 6 para todos los experimentos.

5

Los fibroblastos dérmicos humanos (hDF, por sus siglas en inglés) y queratinocitos epidérmicos humanos (hEK, por sus siglas en inglés) se aislaron de muestras de piel humana obtenidas de donantes utilizando un método ya publicado (Sierra-Sánchez Á, *et al.*, J Eur Acad Dermatology Venereol. (2020)). Una vez extirpadas las muestras de piel, se transportaron al laboratorio en recipientes estériles que contenían DMEM con alto contenido de glucosa sin rojo fenol suplementado con antibióticos. Todas las muestras de piel humana se obtuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité responsable de experimentación humana (Comités Éticos Provinciales de Granada) y con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983. Una vez aisladas, las hDF y hEK se cultivaron (Carriel V. *et al.*, Cells Tissues Organs, 196196:1–121(2012)).

10
15

1.1.2. Preparación de biotintas y del sustituto BT skin

Se prepararon biotintas basadas en hidrogeles para crear un sustituto de piel trilaminar (también denominado BT Skin o Piel BT).

20

En primer lugar, se preparó una solución de agarosa (Ag) (UltraPure™ Low Melting Point Agarose Thermo Scientific™) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 2 h y se almacenó a 4 °C hasta su uso. La Ag se precalentó y se mantuvo a 37 °C en baño de agua para evitar la gelificación y estabilizar su temperatura en 37 °C. La solución de Col I (3,3 mg/mL rat tail collagen I, Corning®) se neutralizó con NaHCO₃ 0,8M. A continuación, se prepararon tres soluciones utilizando Kt (Kerapro S, Proalan S.A., Barcelona, España), Sph, DS, HA y EL (Bioibérica S.A.U, Barcelona, España) diluidas en PBS: i) Kt + Sph (KS); ii) DS + HA (DH); iii) DS + HA + EL (DHE). Para incluir el DS y el HA se utilizó Dermal®[®], un producto que abarca ambos principios activos. Cada solución se mezcló con Col I a la concentración final como se muestra en la Tabla 1. Todas las soluciones de los componentes se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm (Merck Millipore) antes de su uso.

25
30
35

Tabla 1. Concentraciones de agarosa, colágeno I, dermatán sulfato (DS), ácido hialurónico (HA), elastina (EL), queratina (Kt) y esfingolípidos (Sph) en las diferentes biotintas.

Composición (mg/mL)	Agarosa	Colágeno I	DS	HA	EL	Kt	Sph
Biotinta epidérmica	-	4,4	-	-	-	15,2	5,0
Biotinta dérmica	15	2,2	8,4	1,0	1,0	-	-
Biotinta hipodérmica	15	2,2	8,4	1,0	-	-	-

5

Para biofabricar el sustituto de piel BT, se prepararon las biotintas dérmica e hipodérmica cargadas de células mezclando Col I + DHE con hDFs y Col I + DH con hMSCs, respectivamente, y se agregó Ag precalentado a cada mezcla, obteniendo una concentración final de $1 \cdot 10^6$ células/mL. Una vez obtenidas tanto la capa hipodérmica como la dérmica, se colocó encima la biotinta epidérmica (Col I + KS) y se dejó gelificar dentro de una incubadora a 37 °C durante 15 min. Una vez que la capa epidérmica gelificó, se sembraron $2 \cdot 10^6$ hEK sobre el hidrogel BT Skin y se cultivaron durante 1 semana. Pasado este tiempo, las muestras se deshidrataron parcialmente mediante la aplicación de 100 g de presión durante 2 min, otorgando a los hidrogeles una mayor resistencia y potenciando su rigidez y propiedades mecánicas.

15

1.1.3. Caracterización fisicoquímica de los hidrogeles trilaminares

Test de inversión de tubo

20

La prueba de inversión de tubo se utilizó para definir el tiempo de gelificación de las biotintas. Las biotintas se vertieron en viales de vidrio, invirtiendo los viales boca abajo cada 1 minuto para comprobar la formación de geles estables. El tiempo de gelificación se estimó como el momento en el que las muestras formaron un gel estable que permaneció en el fondo de los viales cuando se invirtió.

25

pH

El pH de las muestras de hidrogel se determinó utilizando un pHmetro digital calibrado Hach Sension + (Hach Lange S.L., España) a temperatura ambiente (TA).

30

Test de inyectabilidad

La fuerza requerida para extruir las diferentes mezclas de biomateriales se midió usando un reómetro torsional MCR302 (Anton Paar, Austria). El equipo utilizado para el ensayo se dispuso como se ve en la Fig. 1D, donde se mantuvo una jeringa de 3 mL rodeada de agua caliente a una temperatura de 37 °C para evitar una gelificación rápida y reproducir el ambiente de una jeringa calentada con bioimpresora 3D. Las muestras se colocaron en la jeringa y se controló la fuerza requerida para extruir las biotintas.

10 Test de hinchamiento

Se analizaron las tasas de hinchamiento de las muestras liofilizadas. Brevemente, las muestras se pesaron previamente y se sumergieron en PBS. La tasa de hinchamiento de las muestras de hidrogel se calculó en diferentes momentos de la siguiente manera:

15

$$Tasa\ de\ hinchamiento\ (\%) = \left(\frac{(W_t - W_0)}{W_0} \right) \times 100$$

W_0 representa el peso inicial de las muestras en el día cero y W_t representa el peso húmedo de las muestras en el momento correspondiente.

20 Test de degradación

La tasa de degradación se analizó cuantificando la pérdida de peso de las muestras a lo largo del tiempo. Los hidrogeles se incubaron con agitación suave a 37 °C, se recuperaron en diferentes momentos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos.

25 Se eliminó el sobrenadante y se pesaron las muestras. La tasa de degradación (%) se calculó como una medida de la pérdida de peso de la siguiente manera:

$$Tasa\ de\ degradación\ (\%) = \left(\frac{(W_t - W_i)}{W_i} \right) \times 100$$

W_i representa el peso inicial de las muestras y W_t representa el peso húmedo de los hidrogeles en el momento correspondiente.

30

Análisis mecánico

Las pruebas reológicas se llevaron a cabo utilizando un reómetro torsional MCR302. Las muestras de hidrogel se moldearon usando un molde de 20 mm de diámetro y 5 mm de altura. Se diseñó un ensayo de tres pasos para obtener datos sobre las características de compresión y cizallamiento de los hidrogeles. En el primer paso, las muestras se colocaron en la base del reómetro, acercándose a la cabeza del reómetro a 10 µm/s hasta una fuerza normal de 0,5 N. En segundo lugar, las muestras se sometieron a cizallamiento oscilatorio con una amplitud de deformación de 0,00001% a una frecuencia de 1 Hz y fuerza normal de 0,5 N para analizar los módulos viscoelásticos de cizallamiento, y finalmente se retiró la placa superior a una velocidad constante de 10 µm/s.

1.1.4. Ensayo de viabilidad celular

Se utilizó el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD™ (Invitrogen, Massachusetts, EEUU) para analizar la viabilidad celular. Los hidrogeles se tiñeron usando una solución de calceína AM (2 µM; verde) y homodímero de etidio (4 µM; rojo) diluida en PBS a 37 °C durante 30 min. Las muestras se observaron mediante microscopía confocal (Nikon Eclipse Ti-E A1) en diferentes momentos y se analizaron mediante el software NIS-Elements. Las células vivas y muertas se cuantificaron utilizando el software ImageJ (Fiji), determinar el porcentaje de viabilidad celular de la siguiente manera:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Células\ vivas}{(Células\ vivas + Células\ muertas)} \times 100$$

1.1.5. Ensayos de proliferación celular

Se utilizó el ensayo AlamarBlue HS® (Invitrogen) para analizar la proliferación celular de las muestras después de 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo. Se midió la fluorescencia después de la incubación, lo que dio lugar a una señal que puede estar relacionada con la actividad metabólica de las células. Las muestras se incubaron con la solución AlamarBlue HS® a 37 °C durante 1 h. La fluorescencia de la solución reducida se determinó a longitudes de onda de excitación/emisión de 530/590 nm.

1.1.6. Ensayo *in vivo*

1.1.6.1. Modelo animal de cicatrización de herida, procedimientos quirúrgicos y grupos experimentales

5

Un total de 32 ratones ATHYM-Foxn1nu/nu machos y hembras, inmunodeficientes, atímicos, lampiños y albinos, de 4 semanas de vida, fueron empleados para el ensayo *in vivo*. Todos los procedimientos de manipulación de animales siguieron la legislación nacional y de la Unión Europea (RD 53/2013 y Directiva de la UE 2010/63) para la

10

protección de animales utilizados con fines científicos y de acuerdo con los Principios Éticos y Directrices para el Uso de Animales aprobados por Provincial. Comités de Ética de Granada.

15

Se realizó una cirugía para extirpar un área de piel de 2 cm² desde la parte superior dorsal, en una posición longitudinal a la columna del ratón, utilizando unas tijeras quirúrgicas. Una férula impresa en 3D utilizando el elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-butanodiol (b-TPUe), porosa, en forma de donut, diseñada con una tapa con bisagras se centró sobre la herida y se aseguró con siete suturas interrumpidas. Luego, los ratones se trasplantaron con BT Skin, BT Skin sin células,

20

autoinjerto de piel de la espalda baja (Autoinjerto), o se dejaron sin tratar como condiciones de control (Control) (n = 8 por grupo). Finalmente, se cerró la tapa de la férula con ocho suturas interrumpidas. Para todos los grupos se injertaron muestras y férulas, y se aplicó un ungüento antibiótico (Mupirocina 20 mg/g; ISDIN). Asimismo, se inyectó subcutáneamente un analgésico (Bupredine 0,3 mg/mL 10 mL; Fatro Ibérica,

25

Desvern, Barcelona, España) y un antibiótico (Ganadexil Enrofloxacin 5% 100 mL; Industrial Veterinaria, S.A. Invesa) como tratamiento postoperatorio.

1.1.6.2. Monitoreo de cicatrización

30

A lo largo de 8 semanas se realizó un seguimiento, recogiendo información clínica, como área cicatriz/herida, y varios parámetros de homeostasis. Además, después de 8 semanas, las cicatrices se evaluaron mediante una adaptación de la Escala de evaluación de cicatrices del paciente y el observador (POSAS). Cada 2 semanas, se anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano para evitar un estrés

35

innecesario y se midieron los parámetros cutáneos de homeostasis mediante el sistema

de sonda Microcaya (Microcaya SL, Bilbao, España), permitiendo la monitorización de diferentes parámetros cutáneos: la sonda Thermometer® permitía medir la piel temperatura en °C; la sonda Skin pH-meter® midió el pH de la piel; la sonda Tewameter® determinó la pérdida transepidérmica de agua (TEWL), como la evaporación del agua en g / h / m²; la sonda Cutometer® analizó la elasticidad de la piel (µm) con succión (450 mbar de presión negativa - 2 s); la sonda Corneometer® determinó la hidratación de la piel a través de la capacitancia de un medio dieléctrico; y la sonda Mexameter®, basada en la absorción/reflexión de la luz de tres longitudes de onda, fue capaz de medir el eritema y la pigmentación de la piel, obteniendo información indirecta sobre la vascularización (niveles de hemoglobina) y la pigmentación (melanina), respectivamente. Los valores de piel sana se obtuvieron midiendo un área sana de piel (piel nativa) de cada ratón del estudio.

1.1.6.3. Análisis histológico e inmunotinciones

Cuatro y ocho semanas más tarde, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical una vez anestesiados por inhalación de isoflurano. Se recolectaron biopsias de injerto y muestras de piel nativa, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron, se incrustaron en parafina o en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) (Tissue-Tek®, Sakura Finetek) y se cortaron en secciones de 5 µm u 8 µm utilizando un micrótopo y un criostato, respectivamente.

Las secciones de parafina se desparafinaron, rehidrataron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y tricómico de Masson para revelar la estructura histológica. Para el análisis de inmunofluorescencia, las criosecciones se incubaron con anticuerpos primarios contra fibronectina (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) y citoqueratina (Invitrogen, 1:100). A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa-488 (ThermoFisher, 1:500) y se contratiñeron con Hoechst. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Leica DM 5500B y se analizaron con el software Image J.

1.2. Modelo trilaminar liofilizado

Para fabricar el modelo trilaminar liofilizado se prepararon las biotintas dérmica e hipodérmica mezclando Col I + DHE y Col I + DH, y se agregó Ag precalentado a cada

mezcla. Una vez obtenidas tanto la capa hipodérmica como la dérmica, se colocó encima la biotinta epidérmica (Col I + KS) y se dejó gelificar dentro de una incubadora a 37 °C durante 15 min. Una vez que la capa epidérmica gelificó, las muestras se deshidrataron parcialmente mediante la aplicación de 100 g de presión durante 2 min, otorgando a los hidrogeles una mayor resistencia y potenciando su rigidez y propiedades mecánicas. Finalmente, las muestras se congelaron a -20 °C, se introdujeron en el liofilizador cuya trampa de frío fue previamente enfriada a -70 °C. Se cerró la cámara de liofilización, manteniendo las muestras a temperatura ambiente y se aplicó vacío utilizando una bomba de aire presurizado. Las muestras se mantuvieron en proceso de liofilización hasta que se pudo observar macroscópicamente que se habían deshidratado correctamente (entre 2-16 h).

1.2.1. Caracterización biológica y mecánica de los apósitos liofilizados

Para este modelo trilaminar liofilizado, se llevaron a cabo análisis mecánico, ensayos de viabilidad celular, y ensayo de proliferación celular bajo las mismas condiciones experimentales que para el modelo trilaminar sin liofilizar.

1.2.2. Ensayos *in vivo*

Además, al igual que en el modelo trilaminar sin liofilizar, se llevaron a cabo una serie de ensayos *in vivo*.

Modelo animal de cicatrización de herida, procedimientos quirúrgicos y grupos experimentales

Un total de 24 ratones ATHYM-Foxn1nu/nu machos y hembras, inmunodeficientes, atímicos, lampiños y albinos, de 4 semanas de vida, fueron empleados para el ensayo *in vivo*.

Se realizó una cirugía para extirpar un área de piel de 2 cm² desde la parte superior dorsal, en una posición longitudinal a la columna del ratón, utilizando unas tijeras quirúrgicas. Una férula impresa en 3D utilizando el elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-butanodiol (b-TPUe), porosa, en forma de donut, diseñada con una tapa con bisagras se centró sobre la herida y se aseguró con siete suturas

interrumpidas. Luego, los ratones se trasplantaron con el apósito liofilizado, autoinjerto de piel de la espalda baja (Autoinjerto), o se dejaron sin tratar como condiciones de control (Control) (n = 8 por grupo). Finalmente, se cerró la tapa de la férula con ocho suturas interrumpidas. Para todos los grupos se injertaron muestras y férulas, y se aplicó un ungüento antibiótico (Mupirocina 20 mg/g; ISDIN). Asimismo, se inyectó subcutáneamente un analgésico (Bupredine 0,3 mg/mL 10 mL; Fatro Ibérica, Desvern, Barcelona, España) y un antibiótico (Ganadexil Enrofloxacin 5% 100 mL; Industrial Veterinaria, S.A. Invesa) como tratamiento postoperatorio.

10 Monitoreo de cicatrización

A lo largo de 8 semanas se realizó un seguimiento, recogiendo información clínica, como área cicatriz/herida, y varios parámetros de homeostasis. Cada 2 semanas, se anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano para evitar un estrés innecesario y se midieron los parámetros cutáneos de homeostasis mediante el sistema de sonda Microcaya (Microcaya SL, Bilbao, España), permitiendo la monitorización de diferentes parámetros cutáneos: la sonda Thermometer® permitía medir la piel temperatura en °C; la sonda Skin pH-meter® midió el pH de la piel; la sonda Tewameter® determinó la pérdida transepidermica de agua (TEWL), como la evaporación del agua en g / h / m²; la sonda Cutometer® analizó la elasticidad de la piel (µm) con succión (450 mbar de presión negativa - 2 s); la sonda Corneometer® determinó la hidratación de la piel a través de la capacitancia de un medio dieléctrico; y la sonda Mexameter®, basada en la absorción/reflexión de la luz de tres longitudes de onda, fue capaz de medir el eritema y la pigmentación de la piel, obteniendo información indirecta sobre la vascularización (niveles de hemoglobina) y la pigmentación (melanina), respectivamente. Los valores de piel sana se obtuvieron midiendo un área sana de piel (piel nativa) de cada ratón del estudio.

Análisis histológico e inmunotinciones

Cuatro y ocho semanas más tarde, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical una vez anestesiados por inhalación de isoflurano. Se recolectaron biopsias de injerto y muestras de piel nativa, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4%, se deshidrataron, se incrustaron en parafina o en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) (Tissue-Tek®, Sakura Finetek) y se cortaron en secciones de 5 µm u 8

µm utilizando un micrótopo y un criostato, respectivamente.

Las secciones de parafina se desparafinaron, rehidrataron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y tricómico de Masson para revelar la estructura histológica. Para el análisis de inmunofluorescencia, las crio-secciones se incubaron con anticuerpos primarios contra fibronectina (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) y citoqueratina (Invitrogen, 1:100). A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa-488 (ThermoFisher, 1:500) y se contra-tiñeron con Hoechst. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Leica DM 5500B y se analizaron con el software Image J.

1.3. Modelo bilaminar

1.3.1. Cultivos celulares

Los hDF se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC® PCS-201-012) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS; Sigma), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin (Invitrogen) a 37 °C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂. El medio se cambió cada 3 días. Cuando se alcanzó el 80% de la confluencia, las células se liberaron con Tryple Express (Gibco) y se subcultivaron. Se usaron hDF entre los pasajes 4 y 6 para todos los experimentos.

Las hMSC se obtuvieron de tejido adiposo humano y se caracterizaron utilizando un método ya descrito (López-Ruiz E, *et al.*, Eur Cells Mater., 35:209–24 (2018); Gálvez-Martín P, *et al.*, Eur J Pharm Biopharm., 86(3):459–68 (2014)). Las hMSC se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Sigma) complementado con 10 % de FBS, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin (Invitrogen) a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5 % de CO₂. El medio se cambió cada 3 días. Al 80% de confluencia, se subcultivaron las células. Se utilizaron hMSC entre los pases 4 y 6 para todos los experimentos.

1.3.2. Formulación del hidrogel

Para preparar el hidrogel se disolvieron dos concentraciones diferentes de Ag, una

formulación de hidrogel de Ag-Col I (AC) previamente reportada (Ag 1,5 % p/v) y un hidrogel de AC con una concentración de agarosa reducida (1,2 % p/v) (AClow). Las soluciones de Ag se prepararon disolviendo Agarosa UltraPure de bajo punto de fusión (Thermo Scientific) en tampón fosfato (PBS). Esta solución se autoclavó a 120 °C durante 2 h y se almacenó a 4 °C. Antes de su uso, la Ag se precalentó a 70 °C y se mantuvo en un baño de agua a 37 °C para templar y evitar la gelificación. La solución de Col I (4,42 mg/ml de colágeno I de cola de rata, Corning) se mantuvo en hielo antes de su uso y se neutralizó con NaHCO₃ 0,8 M. El pH de la solución Col I después de la neutralización fue de 7,4. A continuación, se prepararon tres soluciones madre utilizando DS, HA y EL (Bioibérica SAU) diluidas en PBS (DS; DS + HA; DS + HA + EL) y se mezclaron con Col I a las concentraciones finales que se muestran en la Tabla 2. Las soluciones de Col I fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro de luz de poro de 0,22 µm (Merck Millipore) antes de su uso. De manera similar, el polvo liofilizado DS, HA y EL se esterilizó usando radiación UV durante al menos 30 min. Finalmente, se prepararon hidrogeles cargados de células mezclando las soluciones antes mencionadas con hDFs o hMSCs y se añadió Ag precalentado a la mezcla, obteniendo 1,1 mL de hidrogel con 1·10⁶ células/mL.

Tabla 2. Concentración de los componentes en el hidrogel bilaminar. AC: agarosa + colágeno; ACD: agarosa + colágeno + dermatán sulfato; ACDH: agarosa + colágeno + dermatán sulfato + ácido hialurónico; ACDHE: agarosa + colágeno + dermatán sulfato + ácido hialurónico+elastina.

(mg/mL)	Agarosa	Colágeno	Dermatán sulfato	Ácido hialurónico	Elastina
AC	0,015	2,2	-	-	-
ACD	0,015	2,2	8,4	-	-
ACDH	0,015	2,2	8,4	1,0	-
ACDHE	0,015	2,2	8,4	1,0	1,0

1.3.3. Caracterización física del hidrogel ACDHE

Test de inversión

Para analizar la gelificación del hidrogel se realizó la prueba de inversión del tubo y se ensayaron las formulaciones de AC y ACDHE. La mezcla de hidrogel se vertió en un vial de vidrio para la preparación de los hidrogeles. Para comprobar la formación de un gel estable, el vial se invirtió boca abajo cada 1 minuto y se anotó el tiempo de gelificación.

Análisis de pH

Los valores de pH de los hidrogeles generados a temperatura ambiente se determinaron utilizando un pHmetro digital calibrado Hach Sension+ (Hach Lange S.L.) a $25,0 \pm 0,5$ °C. Las mediciones se realizaron por contacto directo del electrodo del pHmetro en hidrogeles.

Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)

La ESEM se utilizó para observar la morfología de la superficie de los hidrogeles y la distribución celular interna. Las muestras de hidrogel se fijaron con glutaraldehído al 2,5% p/v (Merck) durante 1 hora a 4°C, luego se lavaron y mantuvieron en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M (EMS, Electron Microscopy Science). Antes de su análisis, las muestras fueron procesadas mediante la técnica de secado en punto crítico. Cuatro muestras se fijaron con tetróxido de osmio al 1 % p/v, se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol de concentración creciente (50, 70, 90 y 100 %) durante 15 min cada una, y se secaron en el punto crítico en un secador Leica EM CPD300. Finalmente, las muestras se cubrieron con carbón usando el evaporador de carbón EMITECH K975X. Las imágenes se adquirieron con ESEM QEMSCAN 650F y los tamaños de poro del hidrogel se analizaron con el software ImageJ (Fiji).

Ensayo de hinchamiento

Los hidrogeles liofilizados previamente pesados se sumergieron en PBS. El peso de los hidrogeles preparados se calculó en diferentes tiempos. La relación de hinchamiento se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Tasa\ de\ hinchamiento\ (\%) = \left(\frac{(W_t - W_0)}{W_0} \right) \times 100$$

Donde W_0 representa el peso seco de la muestra en el día cero y W_t representa el peso húmedo de las muestras en un momento específico.

5

Test de degradación

El comportamiento de degradación de los hidrogeles se analizó pesando cantidades conocidas de muestras de hidrogel. A continuación, las muestras de hidrogel se incubaron con agitación suave en un horno de hibridación a 37 °C. Las muestras se recuperaron en diferentes momentos del horno de hibridación y se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 min. Después de eliminar el sobrenadante, finalmente se pesaron las muestras de hidrogel. La tasa de degradación (%) como medida de la pérdida de peso se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

15

$$Tasa\ de\ degradación\ (\%) = \left(\frac{(W_t - W_0)}{W_0} \right) \times 100$$

Donde W_0 representa el peso inicial de la muestra y W_t representa el peso húmedo de las muestras en un momento específico.

20 Ensayos mecánicos

Los análisis mecánicos se realizaron en un reómetro torsional MCR302 (Anton Paar) a 25°C. Los hidrogeles libres de células y cargados con hDF se moldearon con forma cilíndrica en moldes (20 x 5 mm). Se diseñó una prueba de tres pasos para obtener información sobre las características de compresión y corte de las muestras. En primer lugar, las muestras se colocaron en la base del reómetro. Luego, la cabeza del reómetro se acercó a una velocidad constante (10 µm/s) hasta una fuerza normal de 0,5 N. A continuación, la muestra se cizalló oscilatoriamente de acuerdo con una amplitud de deformación de 0,00001 % a una frecuencia de 1 Hz y una fuerza normal de 0,5 N para determinar los módulos viscoelásticos de corte y, finalmente, la placa superior se separó a una velocidad constante (10 µm/s).

30

1.3.4. Ensayo de cierre de herida

Se sembraron hDF y hMSC en placas multipocillo de 12 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante 72 h. Se eliminó el medio de cultivo, se enjuagaron las células con PBS y se incubaron con medio de cultivo suplementado con 8,4 mg/mL de DS, 1,0 mg/mL de HA y 1,0 mg/mL de elastina durante 24 h. Se utilizó medio de cultivo sin suplementos como condición de control no tratada. Después de 24 h, se retiró el medio, las células se lavaron con PBS y se realizó un trazo sobre la monocapa celular mediante rascado manual con una punta de pipeta de 200 µL. Se repusieron los medios suplementados y de control, y se tomaron imágenes de las heridas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Las muestras se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las imágenes se tomaron con un microscopio Leica DMi8 (Leica Microsystems) con el software Leica Application Suite (LAS) X y se analizaron con el software ImageJ (Fiji).

1.3.5. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó utilizando el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD™ (Invitrogen). Las muestras se incubaron en PBS que contenía calceína AM (2 µM) y homodímero de etidio (4 µM) a 37 °C durante 30 min para teñir las células vivas (verde) y muertas (roja). Se obtuvieron imágenes de hidrogeles mediante microscopía confocal en diferentes momentos y se analizaron con el software NIS-Elements (Nikon Eclipse Ti-E A1). Las células vivas y muertas se contaron utilizando el software ImageJ (Fiji), y la viabilidad celular se determinó de la siguiente manera:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{células\ vivas}{(células\ vivas + células\ muertas)} \times 100$$

1.3.6. Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se analizó utilizando el ensayo AlamarBlue® (Invitrogen) a los días 1, 3, 5, 7, 14 y 21. Este reactivo es una solución de resazurina, un compuesto azul permeable a las células no fluorescente que es modificado por el entorno reductor de las células viables en resorufina, un compuesto rojo fluorescente. Se puede medir la fluorescencia tras la incubación y, por tanto, la señal generada relacionada con la actividad metabólica de las muestras. Los hidrogeles se incubaron con solución AlamarBlue® a 37 °C durante 3 h. La fluorescencia de AlamarBlue® reducido se

determinó a longitudes de onda de excitación/emisión de 530/590 nm.

1.3.7. Diseño del hidrogel bilaminar

5 Se prepararon hidrogeles separados cargados con hMSC o hDF en tubos cónicos y se cargaron en jeringas estériles de 3 mL. Luego, las capas de hidrogel se apilaron secuencialmente ubicando la capa de hMSC en la parte inferior y la capa de hDF en la parte superior. Los hidrogeles bicapa se dejaron gelificar y luego se colocaron en una placa multipocillo rectangular de 4 pocillos con DMEM que contenía FBS al 10 % y
10 penicilina/estreptomicina al 1 % y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

1.3.8. Caracterización morfológica de los hidrogeles bilaminares

15 La monitorización del mantenimiento de la forma del hidrogel se llevó a cabo durante un período de cultivo de 21 días. Para observar el tamaño de los hidrogeles con el tiempo, se prepararon tres muestras de hidrogel y se sembraron con hDF y hMSC, se sumergieron en medio de cultivo y se mantuvieron en una incubadora. A intervalos de tiempo preestablecidos (0, 7, 14 y 21 días) se recuperaron los hidrogeles de la solución,
20 se eliminó el exceso de medio con papel filtro y se midió el largo y ancho de las muestras.

1.4. Análisis estadístico

25 Los resultados de este trabajo se representan como media $\pm$ desviación estándar (SD). Las diferencias entre dos grupos de datos se probaron utilizando la prueba T de Student de dos colas para muestras no apareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en $P < 0,05$ (* / #), $P < 0,01$ (** / ##) y $P < 0,005$ (***/ ###).

30 2. Resultados

2.1. Modelo trilaminar

2.1.1. Propiedades fisicoquímicas del hidrogel trilaminar

35

Test de inversión de tubo y pH

El tiempo de gelificación se analizó aplicando la prueba de inversión de tubos para las biotintas hipodérmica, dérmica y epidérmica. La Fig. 1B muestra imágenes representativas de las biotintas en su forma líquida y gelificada. Los tiempos de gelificación promedio de las biotintas fueron $0,76 \pm 0,03$, $0,91 \pm 0,03$ y $5,22 \pm 0,09$ min (Fig. 1C), respectivamente. El valor de pH del hidrogel BT Skin completo fue de $7,59 \pm 0,12$.

10 Inyectabilidad de las biotintas

Para caracterizar la inyectabilidad de las biotintas, se midió la fuerza requerida para extruir las soluciones de una jeringa de 3 mL. Los resultados variaron entre 1,0 y 2,3 N (Fig. 1D y Figura 9), donde la biotinta epidérmica ($0,34 \pm 0,03$ N) mostró el valor más bajo, incluso menor que la fuerza necesaria para extruir Col I ($1,04 \pm 0,04$ N). Respecto a las biotinta hipodérmica ($1,82 \pm 0,57$ N) y dérmica ($2,30 \pm 0,49$ N), aunque no mostraron diferencias entre ellas ni en comparación con su mezcla de base, Ag ($1,99 \pm 0,17$ N) y Ag + Col I ($2,22 \pm 0,19$ N), mostraron un rango más alto de N (1,25 - 2,79 N) que el Col I y la biotinta epidérmica (0,31 - 1,08 N).

20

Comportamiento de hinchamiento y degradación del hidrogel BT Skin

Los hidrogeles BT Skin liofilizados se sumergieron en PBS (pH 7,4) para observar su comportamiento de hinchamiento. La cinética de hinchazón de la piel BT durante un tiempo transcurrido de 21 días se muestra en la Fig. 2A. La hinchazón media del hidrogel BT Skin fue del $70 \pm 7\%$. El hidrogel BT Skin (liofilizado) mostró alcanzar una etapa de meseta después de 7 días. Para analizar la resistencia del hidrogel BT Skin a lo largo del tiempo, se llevó a cabo un ensayo de degradación midiendo el cambio de peso hasta 21 días (Fig. 2B). Los resultados mostraron que la tasa máxima de degradación se alcanzó después de 14 días con un $8,8 \pm 1,5\%$ de pérdida de masa.

30

Propiedades mecánicas del hidrogel BT Skin

Los hidrogeles BT Skin con y sin células antes (Pre BT Skin y Pre *Cell-free* BT Skin) y después (BT Skin y *Cell-free* BT Skin) se generaron y se mantuvieron a 37 °C en una

35

atmósfera de CO₂ al 5%. Los módulos de Young de los hidrogeles mantenidos hasta 21 días en comparación con las biopsias de piel humana nativa se representan en la Fig. 2C. Aunque se encontraron variaciones en Pre BT Skin ($7,49 \pm 0,62$ kPa) y *Cell-free* BT Skin ($13,24 \pm 0,30$ kPa) en comparación con la piel nativa ($9,46 \pm 0,79$ kPa), BT Skin ($9,06 \pm 0,21$ kPa) no mostró diferencias significativas en comparación con el tejido de referencia.

También se midieron los módulos viscoelásticos de hidrogeles BT Skin cargados de células y libres de células antes y después de la deshidratación y se muestran en la Fig. 2D. Aunque se encontró que las cuatro condiciones probadas compartían el mismo rango de módulo de pérdida de la piel nativa ($2,92 \pm 0,91$ kPa), solo el módulo de pérdida de hidrogeles BT Skin ($0,28 \pm 0,10$ kPa) no mostró diferencias significativas con respecto al módulo de pérdida de piel natural ($0,83 \pm 0,33$ kPa).

2.1.2. Caracterización biológica de las biotintas y el hidrogel BT Skin

Se realizó una caracterización biológica de las biotintas hipodérmica y dérmica con ensayos de proliferación y viabilidad celular. Dado que la manipulación de la biotinta epidérmica era complicada, ya que se mostraba frágil una vez gelificada, se incorporó esta biotinta al hidrogel BT Skin y se realizó la caracterización biológica del hidrogel completo. Las tasas de proliferación celular de los hidrogeles de las biotintas hipodérmica y dérmica en los días 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 18 y 21 se muestran en las Fig. 3A y C, respectivamente. Los hidrogeles hipodérmicos mostraron un aumento de la proliferación celular al día 5, manteniendo una etapa de meseta hasta el final del experimento. Asimismo, los hidrogeles dérmicos incrementaron su proliferación celular desde el día 14, manteniendo su nivel hasta el final del experimento. Ambas condiciones pudieron mantener el nivel de viabilidad celular por encima del 97% durante la duración del ensayo (Fig. 3B, D y E), como lo demuestran las imágenes adquiridas a los 0, 7, 14 y 21 días.

El hidrogel BT Skin se preparó en tres capas con la capa hipodérmica en la parte inferior, una capa dérmica intermedia, y la capa epidérmica en la parte superior (Fig. 1A), y se deshidrató parcialmente. La Fig. 4D muestra el aspecto macroscópico de la piel BT (flecha negra que indica la capa epidérmica), y las Fig. 4E y F muestran la diferencia de altura del hidrogel antes y después del proceso de deshidratación parcial, donde se

reducen 2 mm de la altura del hidrogel.

La tasa de proliferación de células cutáneas y la viabilidad hasta 21 días se muestran en las Fig 4A y B, respectivamente. De manera similar, para los hidrogeles de biotintas hipodérmica y dérmica, el BT Skin mostró un aumento en la tasa de proliferación celular desde el día 5, permaneciendo en una etapa de meseta hasta el final del experimento. Las células que pudieron adherirse y crecer en contacto con las células circundantes en algunas áreas de los hidrogeles, como se puede observar en la Fig. 4C. Además, BT Skin mostró tasas de viabilidad celular entre 90,9 y 98%. Para observar la distribución de los tres tipos de células dentro del hidrogel, se tiñeron hMSC, hDF y hEK con CellTrackerTM Green CMFDA, CellTrackerTM Red CMTX y CellTrackerTM Green CMFDA, respectivamente. Se pudo ver que las tres capas del hidrogel estaban bien diferenciadas (Fig. 4G).

2.1.3. Ensayos *in vivo*

2.1.3.1. Análisis clínico

Se observó una adecuada estabilización de la herida para todos los grupos de ratones a las 4 semanas, sin complicaciones (Fig. 5A). La resolución de la herida fue más rápida en el caso de los grupos tratados con Autoinjerto, Piel BT sin células y Piel BT que en el grupo Control. De manera similar, la reparación de heridas fue más rápida y efectiva en el caso del grupo BT Skin, mientras que los grupos Control, Autoinjerto y BT Skin sin células experimentaron una mejora más lenta. En el caso de BT Skin, se observó una reparación total de la piel después de 8 semanas.

La evaluación de los resultados mediante observación clínica visual (Fig. 5A) se correlacionó con el análisis cuantitativo del área de la herida / cicatriz (Fig. 5B y C), donde se encontraron diferencias significativas entre los grupos de piel con BT sin células y piel con BT en comparación con el grupo de control en la semana 2, lo que indica un efecto positivo de estas condiciones en el proceso de cicatrización de heridas, pero al final del experimento, solo el grupo BT Skin mostró diferencias significativas con el grupo Control.

2.1.3.2. Estudio de parámetros de homeostasis

Se monitorizaron la temperatura, pH, TEWL, elasticidad y humedad (Fig. 6 y Fig. 10), comparando todos los grupos con la piel nativa de ratones.

5 Los resultados de temperatura (Fig. 6A, H, O y V) y pH (Fig. 6B, I, P y W) mostraron una evolución homogénea en todos los grupos en general del estudio, sin diferencias en comparación con piel nativa (también referida como *Native Skin*). Los valores de temperatura de todos los grupos durante el estudio oscilaron entre 31,8 y 36,6 °C, superponiendo el rango de la temperatura de la piel nativa (34,0 - 36,0 °C). De manera
10 similar, los rangos de pH de todos los grupos (5,2 - 7,8) y la piel nativa (6,4 - 7,3) también se superpusieron en general a la duración del experimento.

TEWL (Fig. 6C, J, Q y X) mostró una disminución significativa después de 2 semanas en todos los grupos (Fig. 10), alcanzando niveles de piel nativa. En cuanto a la
15 elasticidad (Fig. 6D, K, R e Y), aunque en los grupos Control y Piel BT mostraron un comportamiento oscilatorio a lo largo del experimento, no hubo diferencias significativas entre todos los grupos y la Piel Nativa en general las 8 semanas. Finalmente, de manera similar a los resultados de TEWL, la monitorización de la humedad (Fig. 6E, L, S y Z) mostró una recuperación después de 2 semanas, restaurando los niveles de piel nativa
20 a las 4 semanas en todos los grupos.

2.1.3.3. Eritema y pigmentación

La evaluación del eritema (Fig. 6F, M, T y AA) de los grupos de piel BT de control,
25 autoinjerto y sin células no mostró diferencias significativas con respecto a la piel nativa, sin embargo, la piel BT mostró niveles significativamente más altos durante las 8 semanas del experimento.

Con respecto a la pigmentación (Fig. 6G, N, U y AB), mientras que los grupos Control y
30 Autoinjerto no pudieron alcanzar los niveles de melanina de piel nativa hasta 4 semanas, después de 2 semanas, los grupos *Cell-free* BT Skin y BT Skin ya habían restaurado esos niveles.

2.1.3.4. Análisis histológico e inmunotinciones

35

Las tinciones de H&E y tricrómico de Masson de biopsias de heridas (Figura 7 y Fig. 11) mostraron una correcta regeneración de la epidermis y la dermis después de 4 y 8 semanas en todos los grupos; sin embargo, los grupos Autoinjerto, Piel BT sin células y Piel BT presentaron una estructura de matriz dérmica más compleja más cercana a la Piel nativa que al grupo Control, que mostró una estructura de matriz dérmica menos densa después de 4 semanas de procedimiento quirúrgico.

Como se puede observar en la Fig. 8, el análisis por inmunotinción mostró la expresión de fibronectina, una proteína típica que se encuentra en la matriz extracelular (MEC) dérmica expresada abundantemente. Asimismo, se observó la expresión de citoqueratina, un marcador de diferenciación epidérmico específico, en todos los grupos.

2.2. Modelo trilaminar liofilizado

2.2.1. Propiedades mecánicas

Las muestras con y sin células se generaron y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los módulos de Young de las muestras mantenidas hasta 21 días se representan en la Fig.12A. Aunque se encontraron variaciones entre las 2 condiciones en el lapso de 21 días, no se observaron diferencias significativas.

También se midieron los módulos viscoelásticos de las muestras cargadas de células y libres de células y se muestran en la Fig.12B. Se observó que las dos condiciones probadas compartían un rango similar de módulos de viscoelasticidad, sin mostrar diferencias significativas entre ellas durante los 21 días.

2.2.2. Propiedades biológicas

Se realizó una caracterización biológica de las muestras con ensayos de proliferación y viabilidad celular. Las tasas de proliferación celular de los apósitos liofilizados en los días 1, 3, 5, 7, 14 y 21 se muestran en la Fig. 12C. Los apósitos liofilizados mostraron un aumento de la proliferación celular desde el día 3, manteniendo una etapa de meseta hasta el final del experimento desde el día 5. Los apósitos liofilizados pudieron mantener el nivel de viabilidad celular por encima del 93% durante la duración del ensayo (Fig. 12D y E), como lo demuestran las imágenes adquiridas a los 1, 10, y 21 días.

El hidrogel BT Skin se preparó en tres capas con la capa hipodérmica en la parte inferior, una capa dérmica intermedia, y la capa epidérmica en la parte superior, y se deshidrató parcialmente. La Fig. 4D muestra el aspecto macroscópico de la piel BT (flecha negra
 5 que indica la capa epidérmica), y las Fig. 4E y F muestran la diferencia de altura del hidrogel antes y después del proceso de deshidratación parcial, donde se reducen 2 mm de la altura del hidrogel.

2.2.3. Ensayos *in vivo*

Evaluación del proceso de cicatrización en la piel de ratas

Se observó una adecuada estabilización de la herida para todos los grupos de ratones a las 4 semanas, sin complicaciones (Fig. 13A). La resolución de la herida fue más
 15 rápida en el caso del grupo tratado con apósito liofilizado que en el grupo Control. De manera similar, la reparación de heridas fue más rápida y efectiva en el caso de este grupo, mientras que los grupos Control, Autoinjerto y BT Skin sin células experimentaron una mejora más lenta. La evaluación de los resultados mediante observación visual (Fig. 13A) se correlacionó con el análisis cuantitativo del área de la herida / cicatriz (Fig 13B
 20 y C), donde se encontraron diferencias significativas entre los grupos de piel con apósito liofilizado en comparación con el grupo de control en la semana 2, lo que indica un efecto positivo de esta condición en el proceso de cicatrización de heridas.

Estudio de parámetros de homeostasis

Se monitorizaron la temperatura, pH, TEWL, elasticidad y humedad (Figura 3), comparando todos los grupos con la piel nativa de ratones. Los resultados de temperatura (Figuras 14A, F, y K) y pH (Figuras 14, G, y L) mostraron una evolución homogénea en todos los grupos en general del estudio, sin diferencias en comparación
 30 con piel nativa. Los valores de temperatura de todos los grupos durante el estudio oscilaron entre 31,8 y 36,6 °C, superponiendo el rango de la temperatura de la piel nativa (34,0 - 36,0 °C). De manera similar, los rangos de pH de todos los grupos (5,2 - 7,8) y la piel nativa (6,4 - 7,3) también se superpusieron en general a la duración del experimento.

La TEWL (Figuras 14C, H, y M) mostró una disminución significativa después de 2 semanas en todos los grupos, alcanzando niveles de piel nativa. En cuanto a la elasticidad (Figuras 14D, I, y N), aunque en el grupo Control se observó un comportamiento oscilatorio a lo largo del experimento, no hubo diferencias significativas entre todos los grupos y la Piel Nativa en general las 8 semanas. Finalmente, de manera similar a los resultados de TEWL, la monitorización de la humedad (Figuras 14E, J, y O) mostró una recuperación después de 2 semanas, restaurando los niveles de piel nativa a las 4 semanas en todos los grupos.

10 Eritema y pigmentación

La evaluación del eritema (Figuras 14P, R, y T) de los 3 grupos no mostró diferencias significativas con respecto a la piel nativa. Con respecto a la pigmentación (Fig. 14Q, S, y U), los 3 grupos alcanzaron los niveles de melanina de piel nativa tras 4 semanas.

15

Análisis histológico e inmunotinciones

Las tinciones de H&E y tricrómico de Masson de biopsias de heridas (Fig. 15) mostraron una correcta regeneración de la epidermis y la dermis después de 4 y 8 semanas en todos los grupos; sin embargo, los grupos Autoinjerto y liofilizado presentaron una estructura de matriz dérmica más compleja más cercana a la Piel nativa que el grupo Control, que mostró una estructura de matriz dérmica menos densa después de 4 semanas de procedimiento quirúrgico.

20

Como se puede observar en la Fig. 16, el análisis por inmunotinción mostró la expresión de fibronectina, una proteína típica que se encuentra en la matriz extracelular dérmica expresada abundantemente. Asimismo, se observó la expresión de citoqueratina, un marcador de diferenciación epidérmico específico, en todos los grupos.

25

2.3. Modelo bilaminar

30

2.3.1. Formulación del hidrogel

Para determinar la concentración de agarosa más adecuada, se investigó la viabilidad celular de los hidrogeles AC_{low} y AC con el ensayo Live/Dead. Se usaron imágenes confocales para calcular el porcentaje de viabilidad celular. Aunque ambas

35

concentraciones mostraron buenas tasas de viabilidad, la viabilidad celular en hidrogeles AC_{low} fue significativamente menor en comparación con los hidrogeles AC en los días 7 y 14 (Fig. 17).

- 5 Además, se observó una pérdida de integridad estructural en hidrogeles AC_{low} después de 7 días en cultivo. Por lo tanto, la concentración de Ag referenciada (Köpf *et al.*, 8(2):025011 (2016)) se mantuvo en experimentos posteriores.

10 Para crear un hidrogel que imita la composición de la matriz extracelular (ECM) de la piel, los hidrogeles basados en AC se complementaron con componentes de la piel. Es decir, DS, un glucosaminoglucano que se encuentra en la piel humana nativa; HA, un polisacárido ECM de la piel natural; y EL, una proteína relacionada con la elasticidad ECM de la piel, se agregaron a la formulación de AC generando tres formulaciones secuenciales: ACD, ACDH y ACDHE.

15 Las soluciones de hidrogel cargadas con hDF se pipetearon en la superficie de una placa de Petri, se dejaron gelificar, se transfirieron suavemente a una placa de cultivo multipocillo y se cultivaron durante 21 días. Todas las condiciones estaban pobladas principalmente por células vivas, mostrando una distribución uniforme dentro de los
20 hidrogeles (Fig. 18A).

Los resultados de todas las formulaciones no mostraron efectos negativos sobre la viabilidad de los hDF hasta los 21 días. Las formulaciones de control e hidrogel enriquecidas con materiales relacionados con la piel pudieron mantener niveles de
25 viabilidad superiores al 78 y 86 %, respectivamente (Fig. 18B), durante al menos 21 días. Estos resultados coinciden con las especificaciones de viabilidad de los productos farmacéuticos antes de su administración a los pacientes, en base a los criterios primarios de calidad establecidos por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA) ($\geq 70\%$ y $\geq 80\%$, respectivamente). Los hidrogeles
30 ACDHE mostraron niveles de viabilidad más altos después de 21 días en comparación con los hidrogeles AC, ACD y ACDH. Las tasas de viabilidad celular de la condición ACDHE se mantuvieron por encima del 93 % durante todo el experimento. Por lo tanto, se utilizó la formulación de hidrogel ACDHE con todos los componentes de ECM para los experimentos posteriores.

35

2.3.2. Propiedades fisicoquímicas del hidrogel ACDHE

Test de inversión y pH

5 El tiempo transcurrido para que la solución se convierta en un gel se registró utilizando la prueba de inversión del tubo. Los tiempos promedio de gelificación de los hidrogeles AC y ACDHE fueron $3,4 \pm 0,2$ y $4,1 \pm 0,2$ min, respectivamente. La Fig. 19A muestra evidencia de hidrogeles AC (vial de tapa blanca) y ACDHE (vial de tapa negra) en su forma líquida y gelificada. El valor de pH de los hidrogeles ACDHE fue de $7,36 \pm 0,05$.

10

Ultraestructura del hidrogel

Para caracterizar físicamente los hidrogeles, se realizó un análisis ESEM para las formulaciones de ACD, ACDH y ACDHE. Las tres formulaciones de hidrogel mostraron una organización reticular uniforme y homogénea, con una red porosa interconectada (Fig. 19B). El tamaño de poro aumentó proporcionalmente con la complejidad de la formulación de hidrogel, mostrando el hidrogel ACDHE el mayor tamaño de poro (Fig. 19C).

20 Comportamientos de hinchamiento y degradación del hidrogel ACDHE

Se sumergieron hidrogeles de ACDHE liofilizados en PBS (pH 7,4) para estudiar el comportamiento de hinchamiento de esta formulación. Los resultados de la cinética de hinchamiento del hidrogel se muestran en la Fig. 20A. Se encontró que la tasa de hinchamiento promedio del hidrogel ACDHE era $42 \pm 8\%$. La cinética de hinchamiento del hidrogel ACDHE indicó que se alcanzó una fase estacionaria alrededor de los 3 días después de comenzar el ensayo, con un pico máximo en el día 14. Para estudiar la estabilidad de la formulación de ACDHE, se determinó la degradación del hidrogel midiendo la variación de peso a lo largo del tiempo hasta 21 días (Fig. 20B). La máxima tasa de degradación se encontró después de 14 días con casi $7,14 \pm 0,22 \%$.

30

Propiedades mecánicas del hidrogel

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles AC y ACDHE se determinaron mediante ensayos mecánicos. Como se indicó en la sección de materiales y métodos, los

35

hidrogeles sin y con células (hDFs) se colocaron en moldes de forma cilíndrica (20 mm de diámetro y 5 mm de altura) y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. En la Fig. 20C se muestran los módulos de Young obtenidos de los ensayos de compresión de los hidrogeles AC y ACDHE hasta 21 días en cultivo y se comparan con piel humana.

A pesar de que se encontraron ligeras variaciones entre los módulos de Young de los hidrogeles AC sin células y ACDHE a lo largo del tiempo, el hidrogel AC sin células después de 21 días en cultivo ($10,14 \pm 0,72$ kPa) mostró diferencias significativas en comparación con el rango de elasticidad observado en muestras de piel nativa humana ($5,22 \pm 0,39$ kPa), mientras que no se encontraron diferencias significativas el día 21 de cultivo en hidrogeles libres de células ACDHE ($7,50 \pm 0,94$ kPa) en comparación con la piel nativa humana. Por otro lado, además de que los módulos de Young de los hidrogeles cargados con células también mostraron variaciones en el tiempo, después de 21 días de cultivo, ni los hidrogeles AC ($5,68 \pm 0,00$ kPa) ni los hidrogeles ACDHE ($5,86 \pm 0,38$ kPa) mostraron diferencias significativas en comparación con la piel nativa humana ($5,22 \pm 0,39$ kPa). Esto puede deberse al hecho de que el tejido de la piel humana y los hidrogeles comparten un rango de rigidez similar ubicado en el orden de magnitud kPa. El rango de tensión analizado para los módulos de Young obtenidos en hidrogeles y muestras de piel se muestra en la Fig. 21

Los módulos viscoelásticos de los hidrogeles AC y ACDHE, con y sin células, se muestran en las Fig. 20D y Fig. 20E. Aunque los módulos de almacenamiento de los hidrogeles AC y ACDHE, ya sea sin células ($3,19 \pm 0,61$ y $2,56 \pm 0,29$ kPa, respectivamente) o con células ($2,49 \pm 0,03$ y $1,89 \pm 0,12$ kPa, respectivamente) mostraron una ligera variación con el tiempo, no se encontraron diferencias significativas después de 21 días en comparación con muestras de piel nativa humana ($2,94 \pm 0,27$ kPa) (Fig. 20D).

Por otro lado, como se puede observar en la Fig. 20E al analizar los módulos de pérdida, se encontraron diferencias significativas en el día 21 para los hidrogeles AC y ACDHE, ya sea para sin células ($0,19 \pm 0,04$ y $0,17 \pm 0,00$ kPa, respectivamente) o hidrogeles con células ($0,14 \pm 0,00$ y $0,12 \pm 0,00$ kPa, respectivamente) en comparación con muestras de piel nativa humana ($0,63 \pm 0,13$ kPa).

2.3.3. Ensayo de cierre de herida

Para estudiar el efecto de cicatrización de heridas de los compuestos biológicos solubles suplementados en la formulación de hidrogel, se llevó a cabo un ensayo de herida por rascado. A continuación, se añadió la solución de dermatán/ácido hialurónico/elastina (DHE) a los medios de cultivo y se estudió en hDF y hMSC (Fig. 22A). Curiosamente, los hDF cultivados con medios suplementados con DHE mostraron un importante efecto de cicatrización de heridas, mostrando una mayor tasa de cierre de heridas después de 6 y 12 h, incluso logrando un 100% de cierre de heridas 24 h antes que el grupo de control (Fig. 22B). Además, el efecto de cierre de heridas de la formulación de DHE en hMSC mostró una tasa de curación de heridas significativamente más alta a las 48 h en comparación con el grupo de control; sin embargo, se logró el cierre completo de la herida a las 72 h en condiciones tratadas y de control (Fig. 22C). Estos resultados indican que la suplementación con DHE puede promover significativamente la tasa de cicatrización de heridas, especialmente para los hDF.

2.3.4. Hidrogel ACDHE bilaminar celular

Para la biofabricación de un hidrogel bicapa se utilizaron dos tipos de células. Por un lado, los hDFs, componente esencial de la dermis de la piel, y por otro lado, las hMSCs, que pueden aportar factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que favorecen la supervivencia celular y regulan la regeneración tisular. La formulación de hidrogel ACDHE se preparó de forma bilaminar con hDF ubicados en la capa superior y hMSC en la capa inferior. Se colocó una capa cargada con ACDHE hMSCs en la superficie de una placa de Petri y se dejó gelificar mientras se preparaba la solución ACDHE cargada con hDFs. Luego, la capa cargada con hDFs se agregó en la parte superior de la capa cargada con hMSCs. Debido a la viscosidad de la formulación de ACDHE, las dos capas no se mezclaron durante el proceso, sino que permanecieron adheridas durante la gelificación. Una vez gelificadas por completo, las muestras se transfirieron a placas de cultivo multipocillo y se sumergieron en medio de cultivo celular. La Fig. 23A muestra la apariencia macroscópica del hidrogel bicapa ACDHE en los días 0 y 21, lo que demuestra que podría mantener su forma con el tiempo.

Para evaluar la distribución de las células dentro de los hidrogeles, los hDF y las hMSC se tiñeron previamente con CellTrackerTM Green CMFDA y CellTrackerTM Red

CMPX, respectivamente. Se pudieron observar dos capas bien diferenciadas con los dos tipos de células diferentes (Fig. 23B). La vista inferior de la sección transversal permitió ver las células distribuidas uniformemente a lo largo de la estructura bicapa. Además, esta estructura mantuvo su distribución, pudiendo observarse ambas capas durante todo el tiempo de cultivo. Las imágenes de viabilidad celular adquiridas en los días 0, 7, 14 y 21 mostraron que la mayoría de las células eran viables, con pocas células muertas. Las muestras de hidrogel de ACDHE bicapa demostraron sustentar la viabilidad celular hasta 21 días (Fig. 23C), manteniendo la distribución bilaminar claramente diferenciada, con hDF mostrando una morfología celular fibroblástica (arriba) y hMSC mostrando una forma esférica (abajo). La tasa de proliferación de los hidrogeles bilaminares en los días 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 18 y 21 mostró una disminución inicial en la tasa de proliferación (en los días 1 a 5) y un aumento significativo posterior (desde el día 10 al 21) (Fig. 23D).

Además, utilizando ESEM también se analizó los hidrogeles ACDHE bilaminares cargados de células (Fig. 24). Se podían observar células encapsuladas dentro de la matriz de hidrogel (Fig. 24A y B), e incluso parecía que podían producir estructuras similares a ECM (Fig. 24C y D). Las Fig. 24E y 24F muestran células y ECM depositada.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel monolaminar que comprende:

- 5
- Colágeno tipo I (Col I),
 - dermatán sulfato (DS),
 - ácido hialurónico (HA), y
 - agarosa (Ag).

10 2. Un hidrogel monolaminar según la reivindicación 1, que además comprende elastina (EL).

3. Un hidrogel bilaminar que comprende dos capas del hidrogel monolaminar según la reivindicación 2, donde ambas capas comprenden elastina.

15

4. Hidrogel bilaminar según la reivindicación 3, que comprende una primera capa inferior que comprende el hidrogel monolaminar según la reivindicación 2, donde dicho hidrogel monolaminar comprende células madre mesenquimales (MSCs), y una segunda capa superior, dispuesta encima de la primera, que comprende el hidrogel monolaminar según la reivindicación 2, donde dicho hidrogel monolaminar comprende fibroblastos dérmicos (DFs).

20

5. Hidrogel bilaminar según la reivindicación 4, donde los fibroblastos dérmicos y/o las células madre mesenquimales son humanos.

25

6. Hidrogel bilaminar según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde:

-la capa superior comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL, DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL, HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL, Ag a una concentración de 0,010 a 0,030 mg/mL, y EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL; y

30

-la capa inferior comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL, DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL, HA, a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL, Ag a una concentración de 0,010 a 0,030 mg/mL, y EL a una

35

concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL.

7. Hidrogel bilaminar según la reivindicación 6, en donde:

- 5 -la capa superior comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA, a una concentración de 1 mg/mL, Ag a una concentración de 0,015 mg/mL, y EL a una concentración de 1 mg/mL; y
- 10 -la capa inferior comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA, a una concentración de 1 mg/mL, Ag a una concentración de 15 mg/mL, y EL a una concentración de 1 mg/mL.

8. Un hidrogel trilaminar que comprende:

- 15 -una capa inferior que comprende el hidrogel monolaminar según la reivindicación 1,
- una capa intermedia que comprende el hidrogel monolaminar según la reivindicación 1 o 2, y
- 20 -una capa superior que comprende un hidrogel que comprende Col I, queratina (Kt), y esfingolípidos (Sph).

9. Hidrogel trilaminar según la reivindicación 8, que además comprende DFs, MSCs y/o queratinocitos epidérmicos (EK).

- 25 10. Hidrogel trilaminar según la reivindicación 9, en donde la capa superior comprende EKs, la capa intermedia comprende DFs y la capa inferior comprende MSCs.

30 11. Hidrogel trilaminar según la reivindicación 9 o 10, donde los DFs, MSCs y/o EKs son humanos.

12. Hidrogel trilaminar según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde:

- 35 -la capa superior comprende Col I a una concentración de 3,5 a 5,5 mg/mL, Kt a una concentración de 10 a 20 mg/mL y Sph a una concentración de 2,5 a 7,5 mg/mL;

5 -la capa intermedia comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL, DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL, HA a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL, Ag a una concentración de 10 a 20 mg/mL, y EL a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL; y

10 -la capa inferior comprende Col I a una concentración de 1 a 3,5 mg/mL, DS a una concentración de 7 a 10 mg/mL, HA a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/mL, y Ag a una concentración de 10 a 20 mg/mL.

13. Hidrogel trilaminar según la reivindicación 12, en donde:

15 -la capa superior comprende Col I a una concentración de 4,4 mg/mL, Kt a una concentración de 15,2 mg/mL y Sph a una concentración de 5 mg/mL;

 - la capa intermedia comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA, a una concentración de 1 mg/mL, Ag a una concentración de 15 mg/mL, y EL a una concentración de 1 mg/mL; y

20 -la capa inferior comprende Col I a una concentración de 2,2 mg/mL, DS a una concentración de 8,4 mg/mL, HA a una concentración de 1 mg/mL, y Ag a una concentración de 15 mg/mL.

25 14. Hidrogel monolaminar según la reivindicación 1 o 2, hidrogel bilaminar según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, o hidrogel trilaminar según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde el hidrogel está liofilizado.

30 15. Biotinta que comprende el hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

 16. Uso del hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la fabricación de una biotinta.

35 17. Uso del hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o de la biotinta según la reivindicación 15, para la fabricación de un apósito o implante, preferiblemente

cutáneo o subcutáneo.

18. Apósito o implante, preferiblemente cutáneo o subcutáneo, que comprende el hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o la biotinta según la
5 reivindicación 15.

19. Composición farmacéutica que comprende el hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o la biotinta según la reivindicación 15.

10 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, que además comprende al menos un principio activo que favorece la reparación o regeneración de tejidos de la piel.

21. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, biotinta según la
15 reivindicación 15, o composición farmacéutica según la reivindicación 19 o 20, para su uso en medicina, preferiblemente en medicina regenerativa.

22. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, biotinta según la reivindicación 15, o composición farmacéutica según la reivindicación 19 o 20, para su
20 uso en la regeneración, reparación o sustitución de tejidos de la piel.

23. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o biotinta según la reivindicación 15, o composición farmacéutica según la reivindicación 19 o 20, para su uso en el tratamiento de lesiones o heridas de la piel.

25 24. Uso del hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, de la biotinta según la reivindicación 15, del apósito según la reivindicación 18, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 19 o 20, para promover *in vitro* la cicatrización de heridas.

30 25. Uso del hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, de la biotinta según la reivindicación 15, del apósito según la reivindicación 18, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 19 o 20, para promover *in vitro* la producción de melanina en células aisladas de piel.

35

26. Uso *in vitro* del hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, de la biotinta según la reivindicación 15, del apósito según la reivindicación 18 para testear fármacos y/o compuestos tóxicos para la piel.

5 27. Método de obtención del hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14, que comprende las siguientes etapas:

- a) mezclar Col I, agarosa, DS, HA y EL, obteniendo una solución (i),
- b) mezclar Col I, agarosa, DS, HA, obteniendo una solución (ii), y
- 10 c) poner en contacto la solución (i) y la solución (ii), obteniendo un hidrogel bilaminar.

28. Método de obtención según la reivindicación 27, en donde la etapa b) además comprende mezclar EL con el resto de componentes.

15

29. Método de obtención según la reivindicación 27 o 28, en donde:

-la concentración de Col I es de 1 a 3,5 mg/mL, la concentración de DS es de 7 a 10 mg/mL, la concentración de HA es de 0,5 a 1,5 mg/mL, la concentración de Ag es de 10 a 30 mg/mL, y la concentración de EL es de 0,5 a 1,5 mg/mL en la solución (i); y

20

- la concentración de Col I es de 1 a 3,5 mg/mL, la concentración de DS es de 7 a 10 mg/mL, la concentración de HA es de 0,5 a 1,5 mg/mL, la concentración de Ag es de 10 a 30 mg/mL, y la concentración de EL es de 0,5 a 1,5 mg/mL en la solución (ii).

25

30. Método de obtención según la reivindicación 29, en donde:

-la concentración de Col I es 2,2 mg/mL, la concentración de DS es 8,4 mg/mL, la concentración de HA es 1 mg/mL, la concentración de Ag es 15 mg/mL, y la concentración de EL es 1 mg/mL en la solución (i); y

30

-la concentración de Col I es 2,2 mg/mL, la concentración de DS es 8,4 mg/mL, la concentración de HA es 1 mg/mL y la concentración de Ag es 15 mg/mL en la

35

solución (ii).

31. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en donde se utiliza Dermial ® como fuente de DS y HA.

5

32. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde la etapa a) además comprende añadir DFs, preferiblemente DFs humanos (hDFs), y en donde la etapa b) además comprende añadir MSCs, preferiblemente MSCs humanos (hMSCs).

10

33. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, que además comprende las siguientes etapas adicionales:

(d) mezclar Col I con Kt y Sph, obteniendo una solución (iii), y

15

(e) poner contacto la solución (iii) con el hidrogel bilaminar obtenido en c), obteniendo un hidrogel trilaminar.

34. Método de obtención según la reivindicación 33, en donde la concentración en la solución (iii) de Col I es de 3,5 a 5,5 mg/mL, la concentración de Kt es de 10 a 20 mg/mL y la concentración de Sph es de 2,5 a 7,5 mg/mL.

20

35. Método de obtención según la reivindicación 34, en donde la concentración en la solución (iii) de Col I es 4,4 mg/mL la concentración de Kt es 15,2 mg/mL y la concentración de Sph es 5 mg/mL.

25

36. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, que además comprende añadir EKs, preferiblemente EKs humanos (hEKs).

37. Método de obtención del hidrogel según la reivindicación 36, en donde las EKs se añaden sobre el hidrogel trilaminar obtenido en la etapa (e).

30

38. Método de obtención del hidrogel según la reivindicación 36 o 37, en donde las EKs añadidas se dejan cultivar durante 0,5 a 3 semanas, preferiblemente 1 semana.

35

39. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 38, que

además comprende una etapa (f) de deshidratación del hidrogel.

40. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 39, que además comprende una última etapa de liofilización del hidrogel.

5

41. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 40, en donde la agarosa es previamente calentada a una temperatura de 60 a 80 °C, preferiblemente 70 °C, antes de mezclar con el resto de componentes en las etapas a) y b) del método.

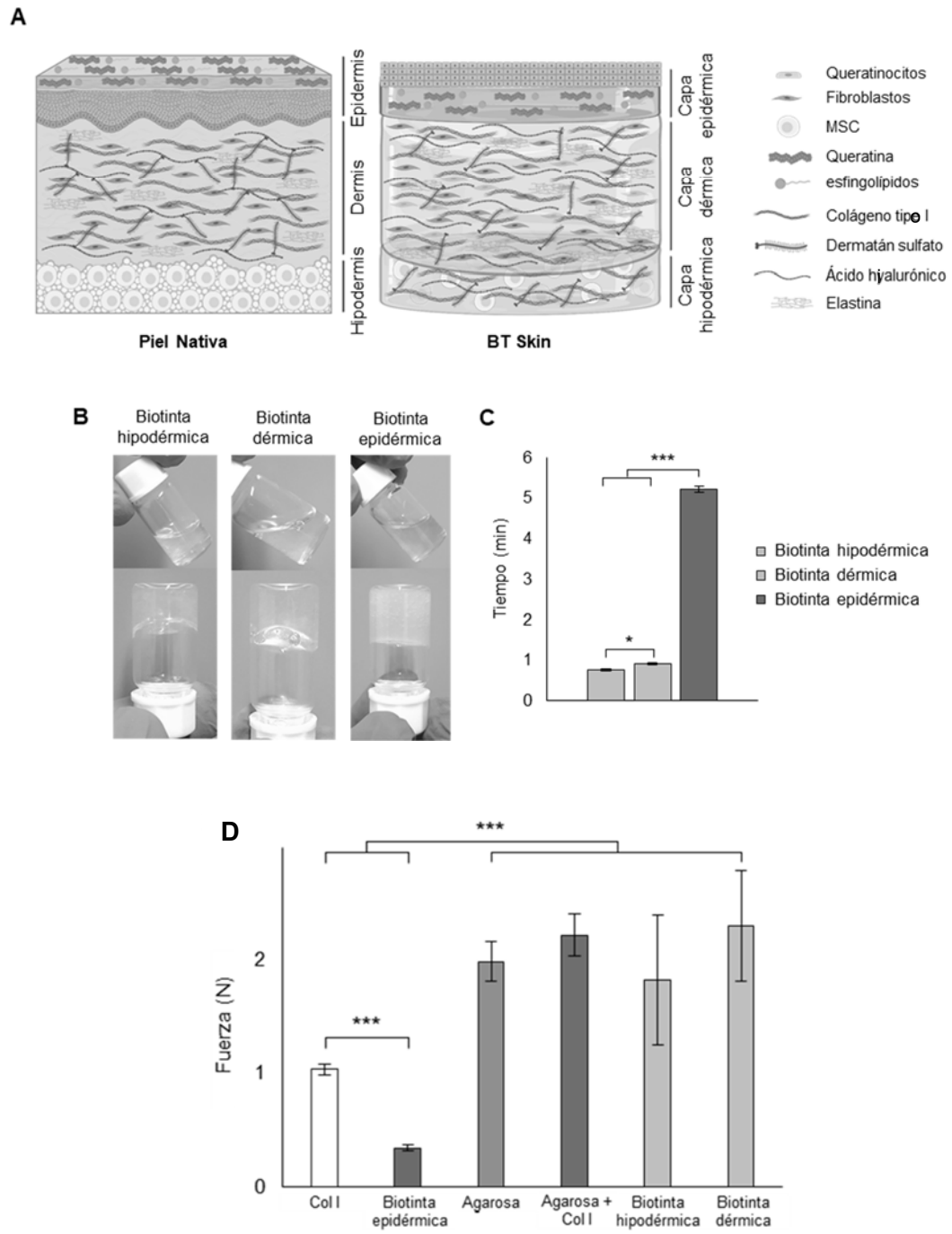


Fig. 1

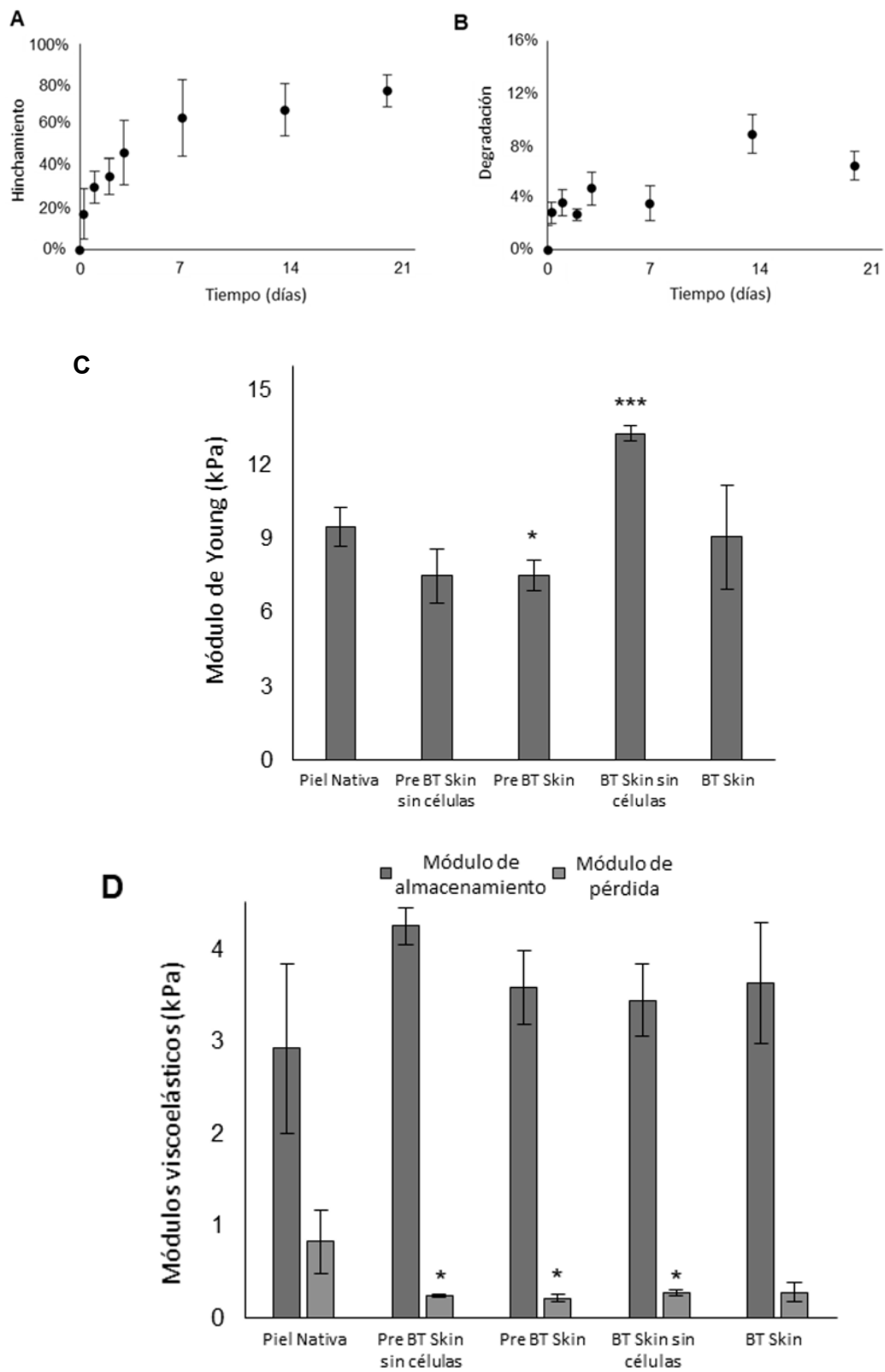


Fig. 2

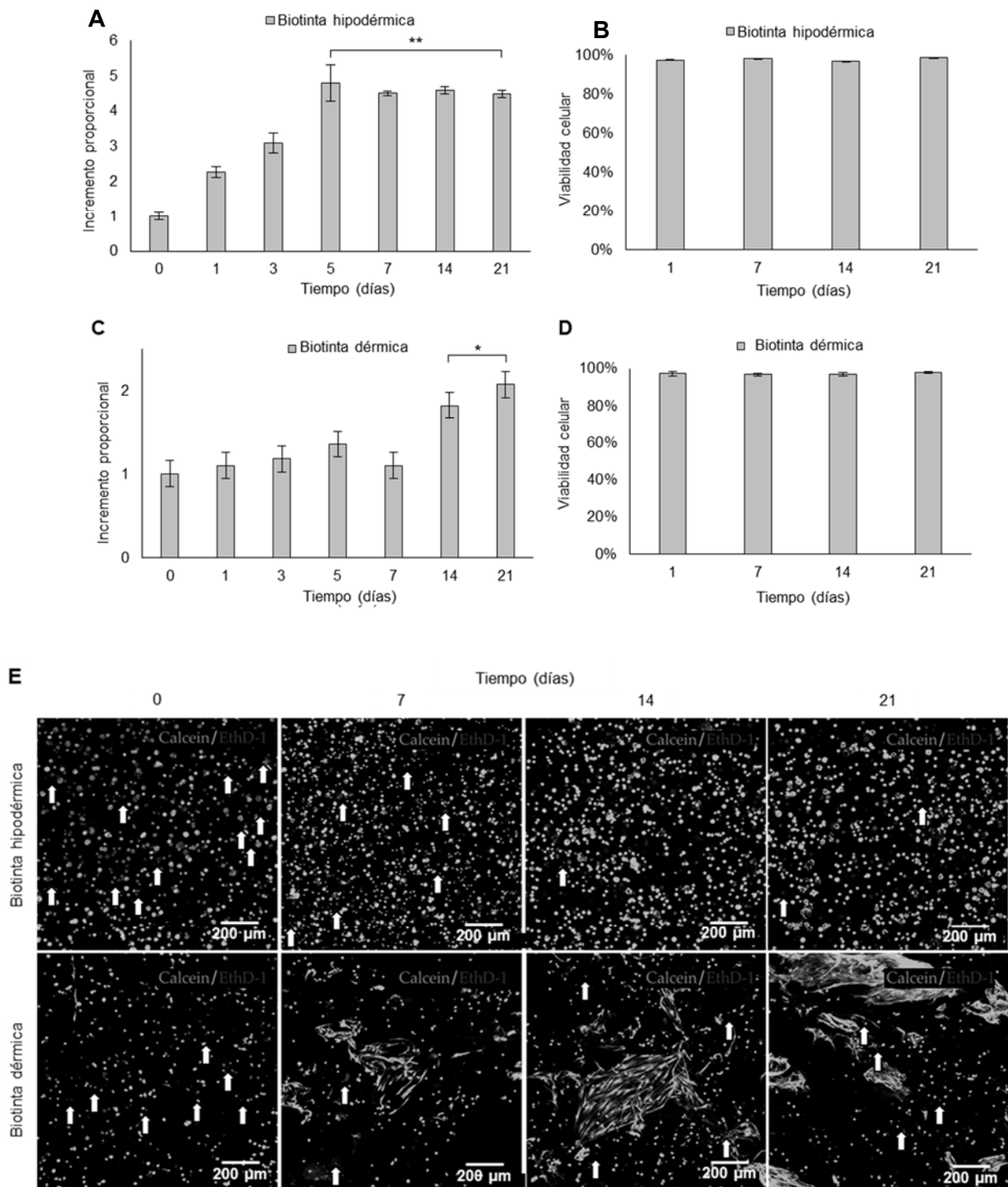


Fig. 3

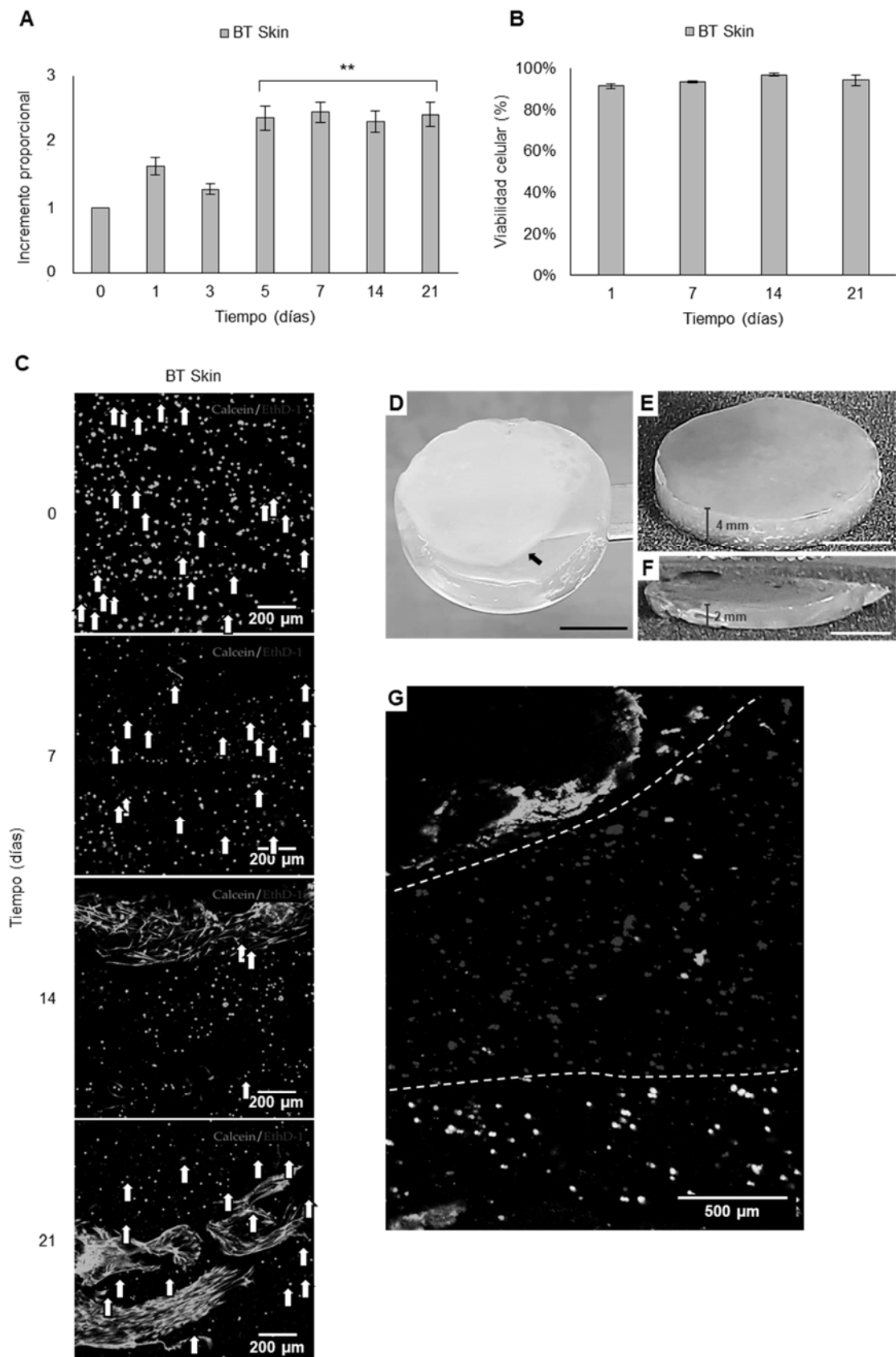


Fig. 4

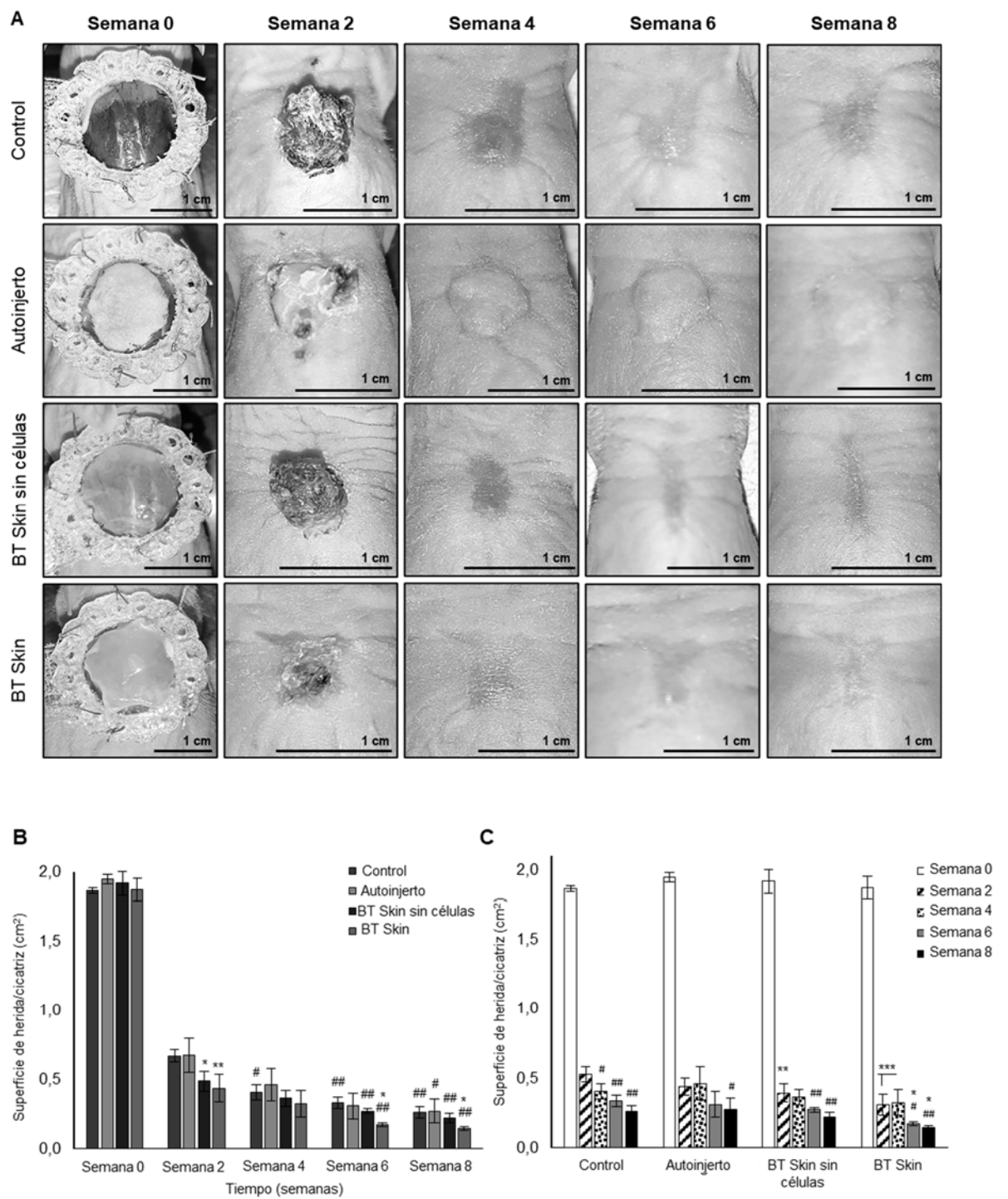


Fig. 5

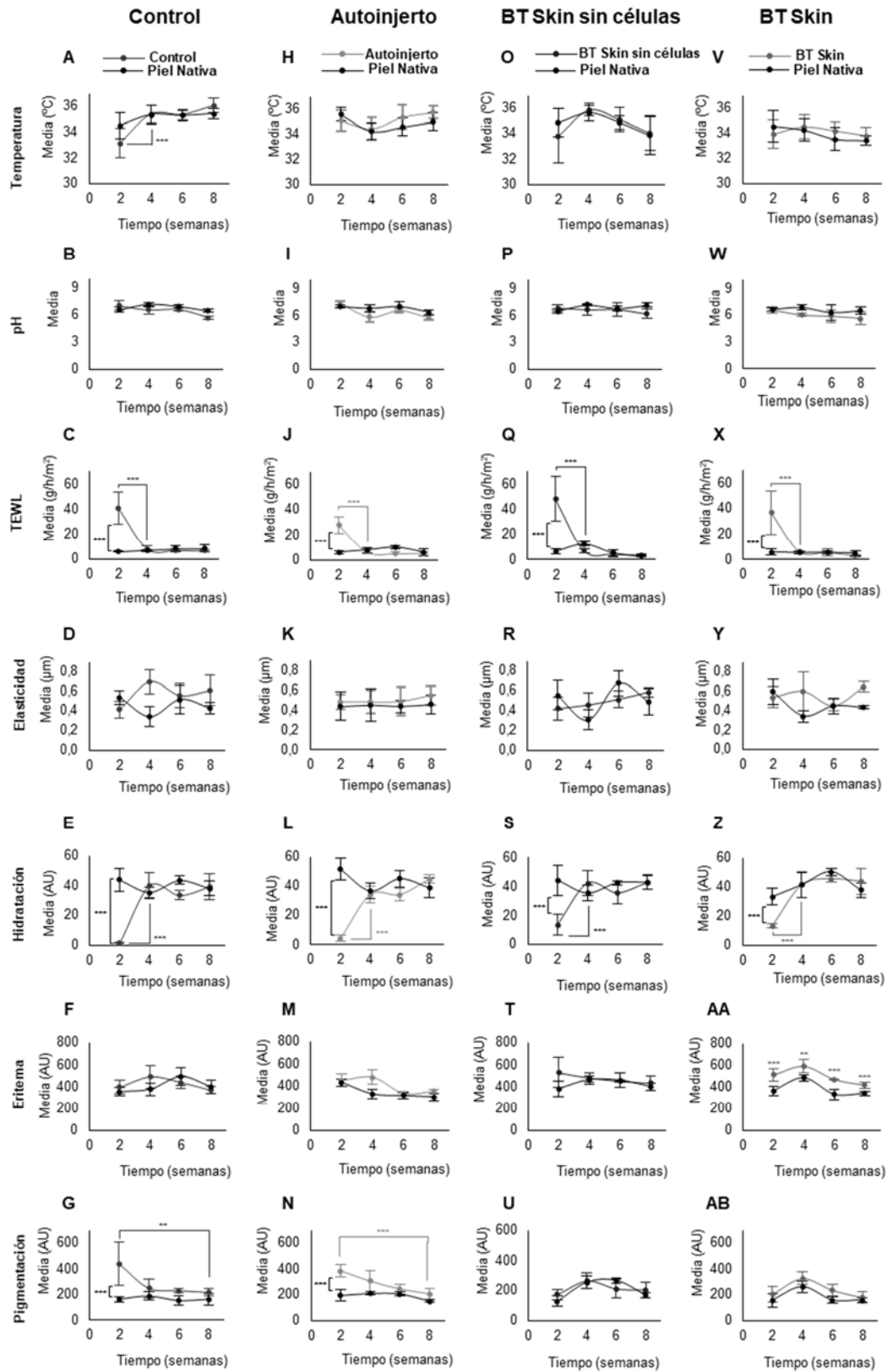


Fig. 6

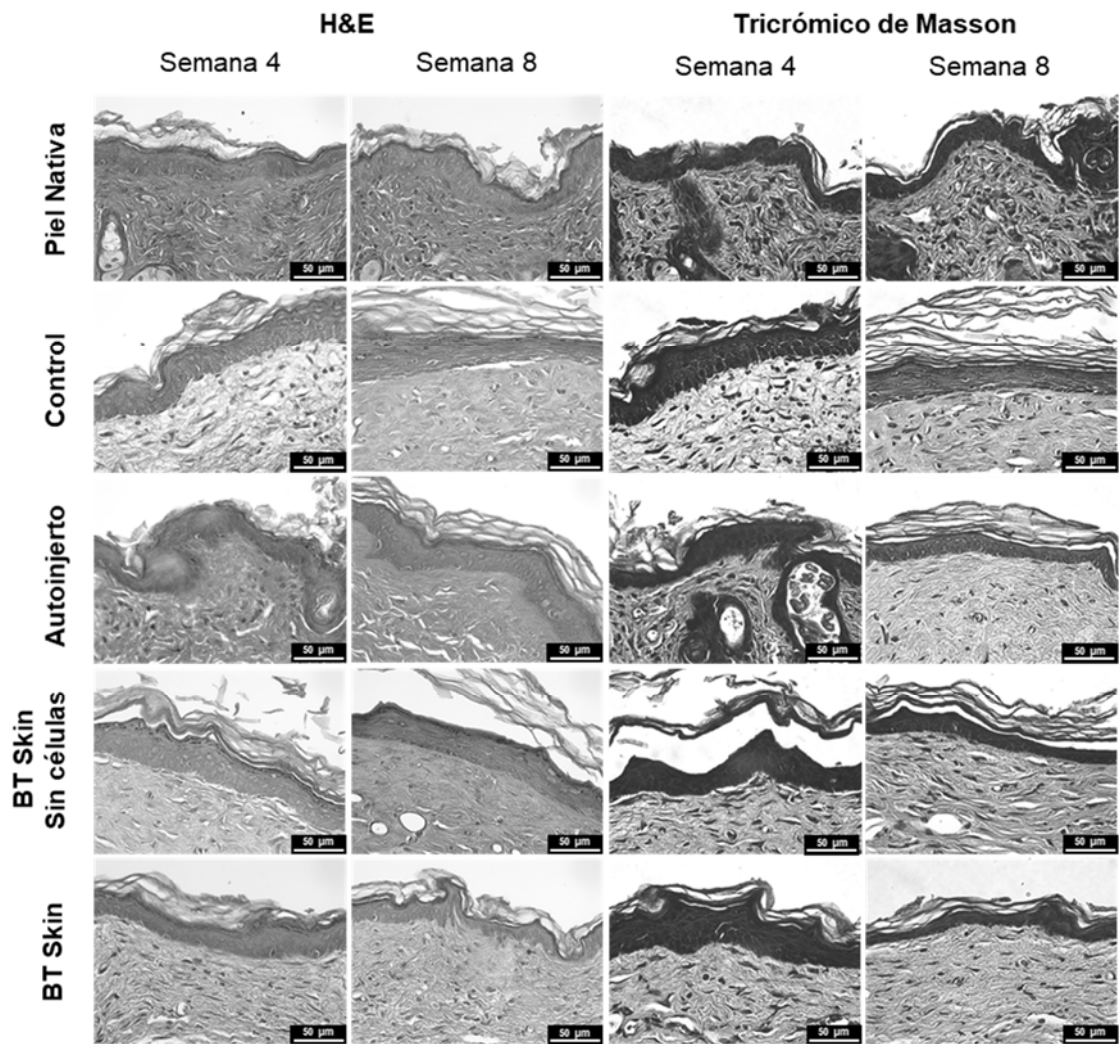


Fig. 7

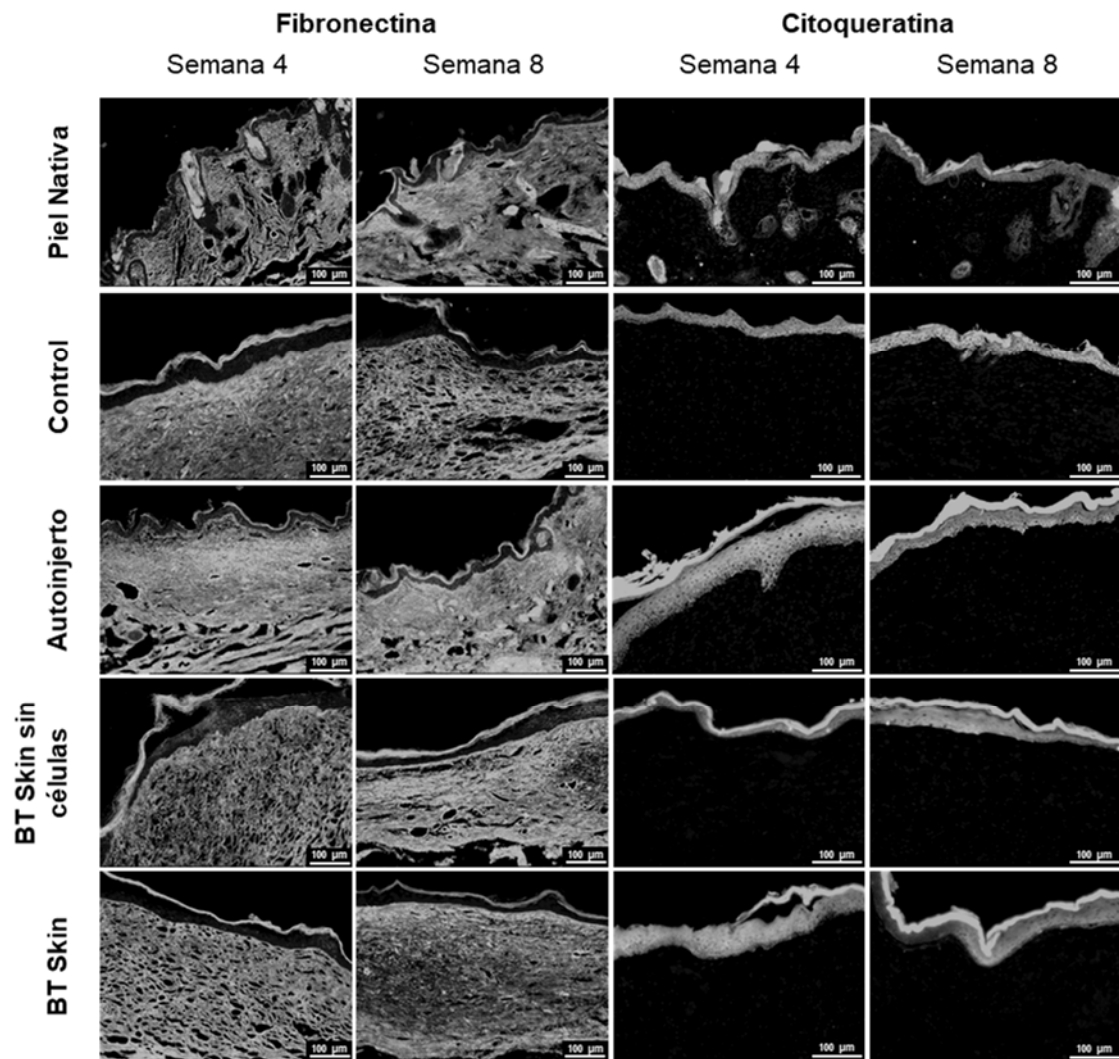


Fig. 8

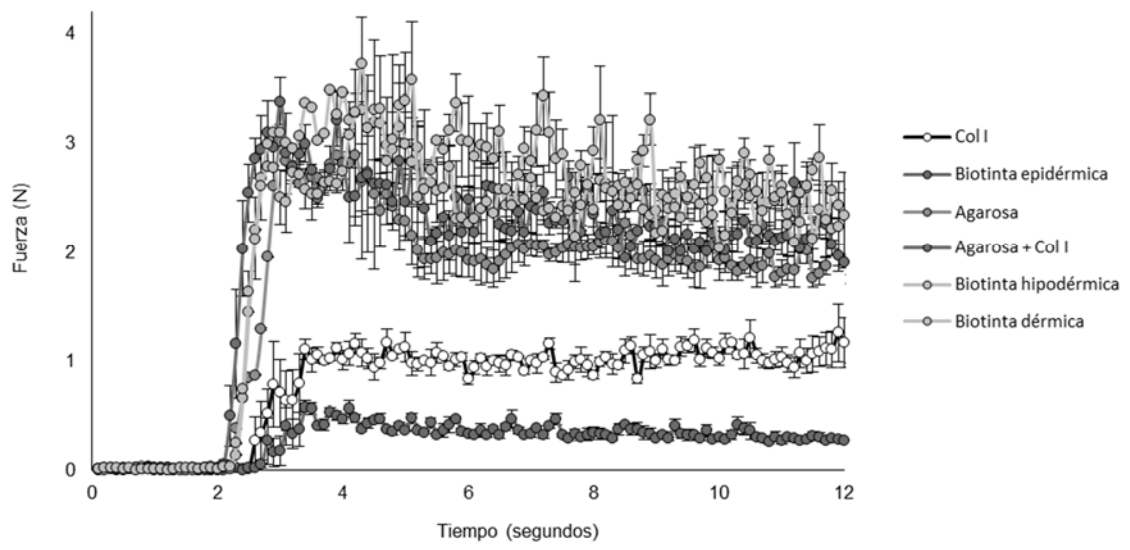


Fig. 9

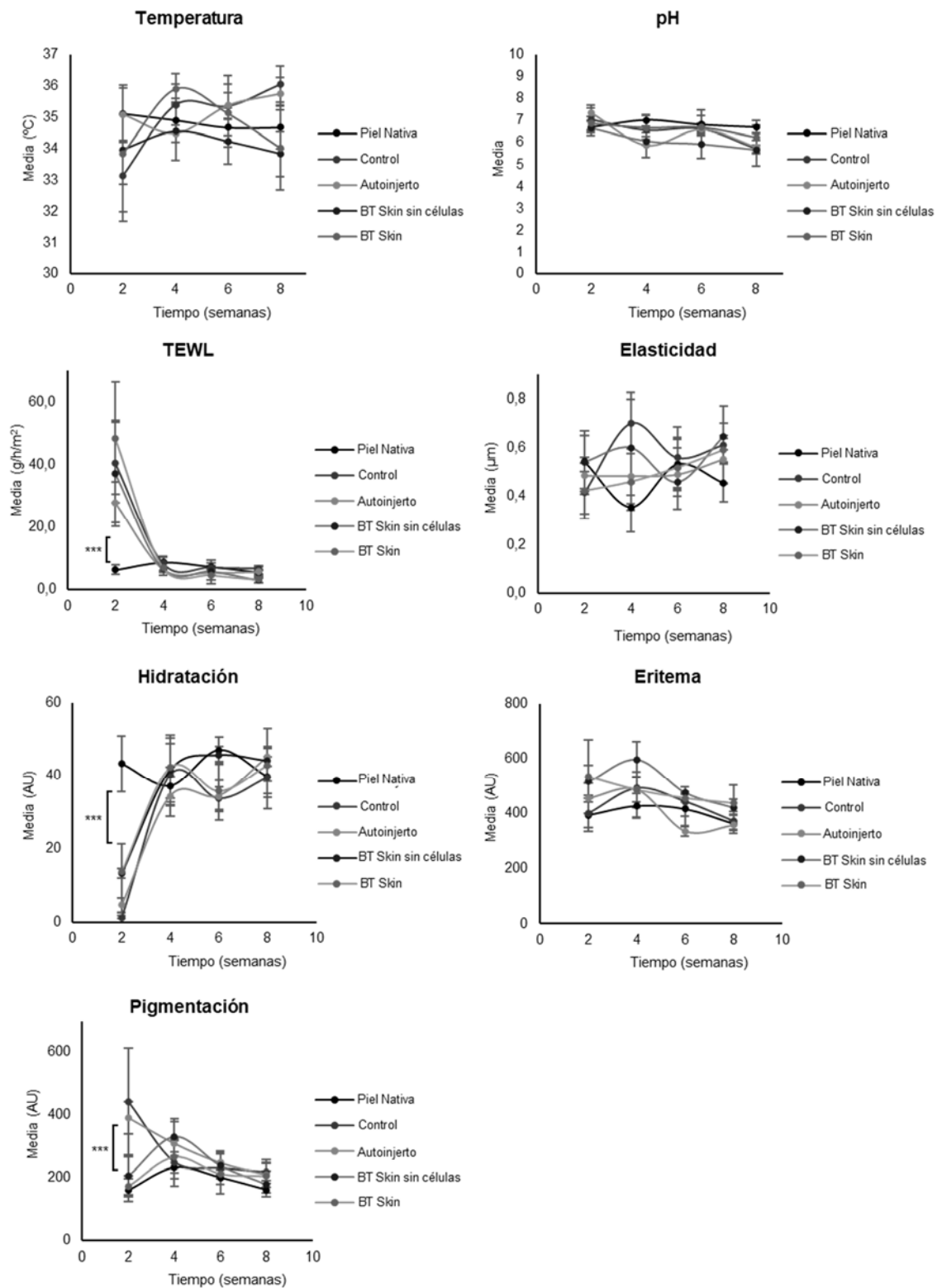


Fig. 10

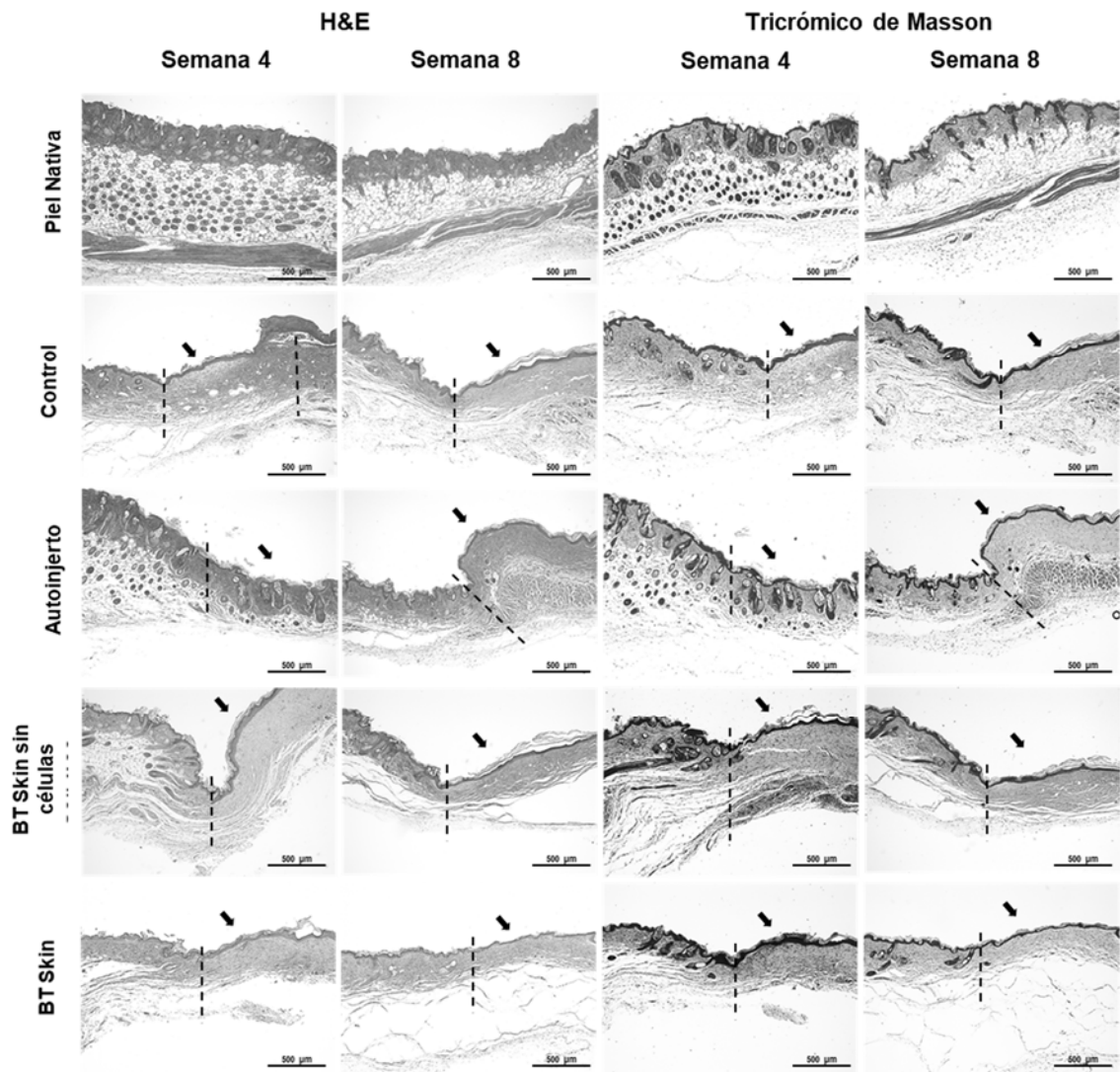


Fig. 11

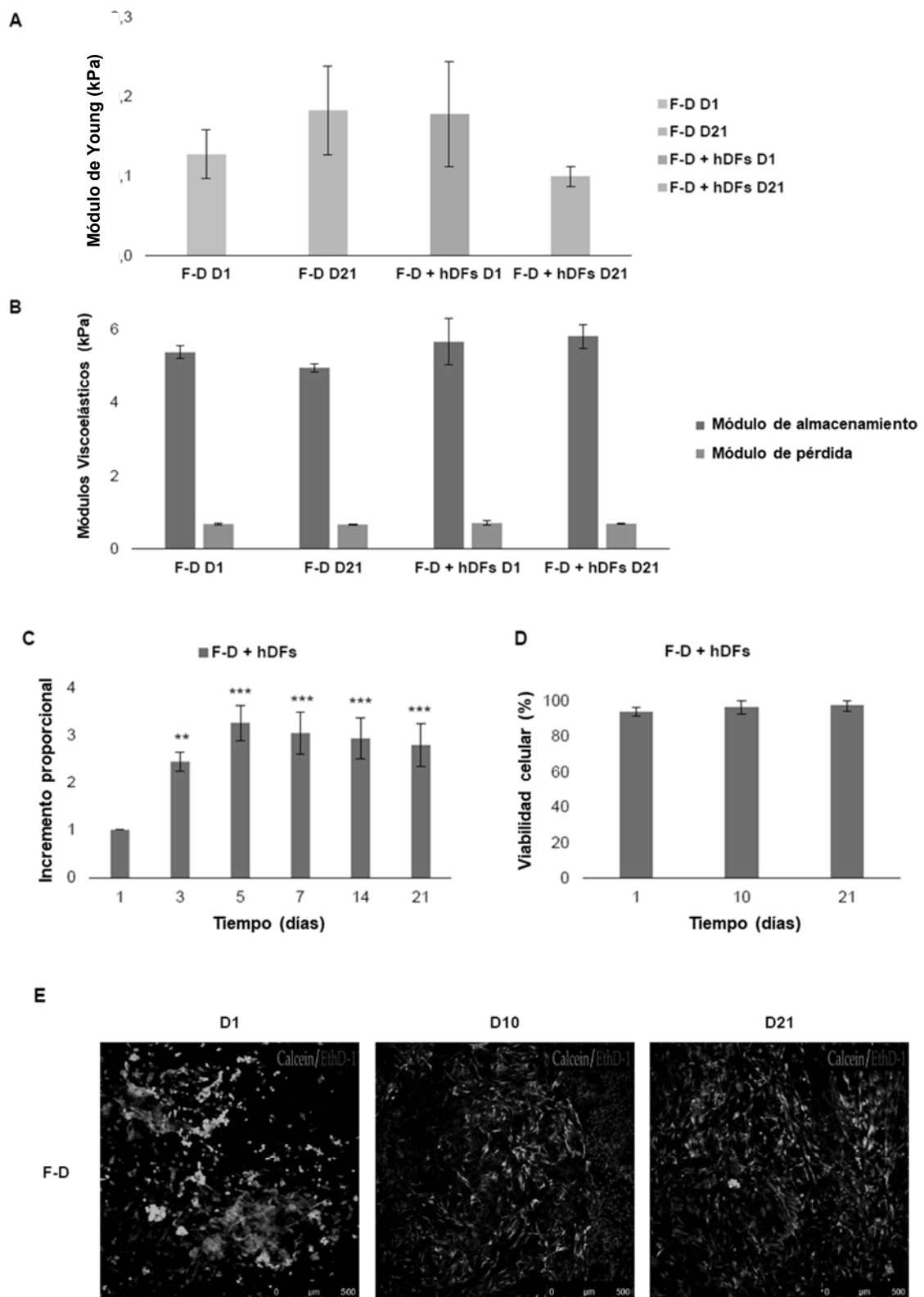


Fig. 12

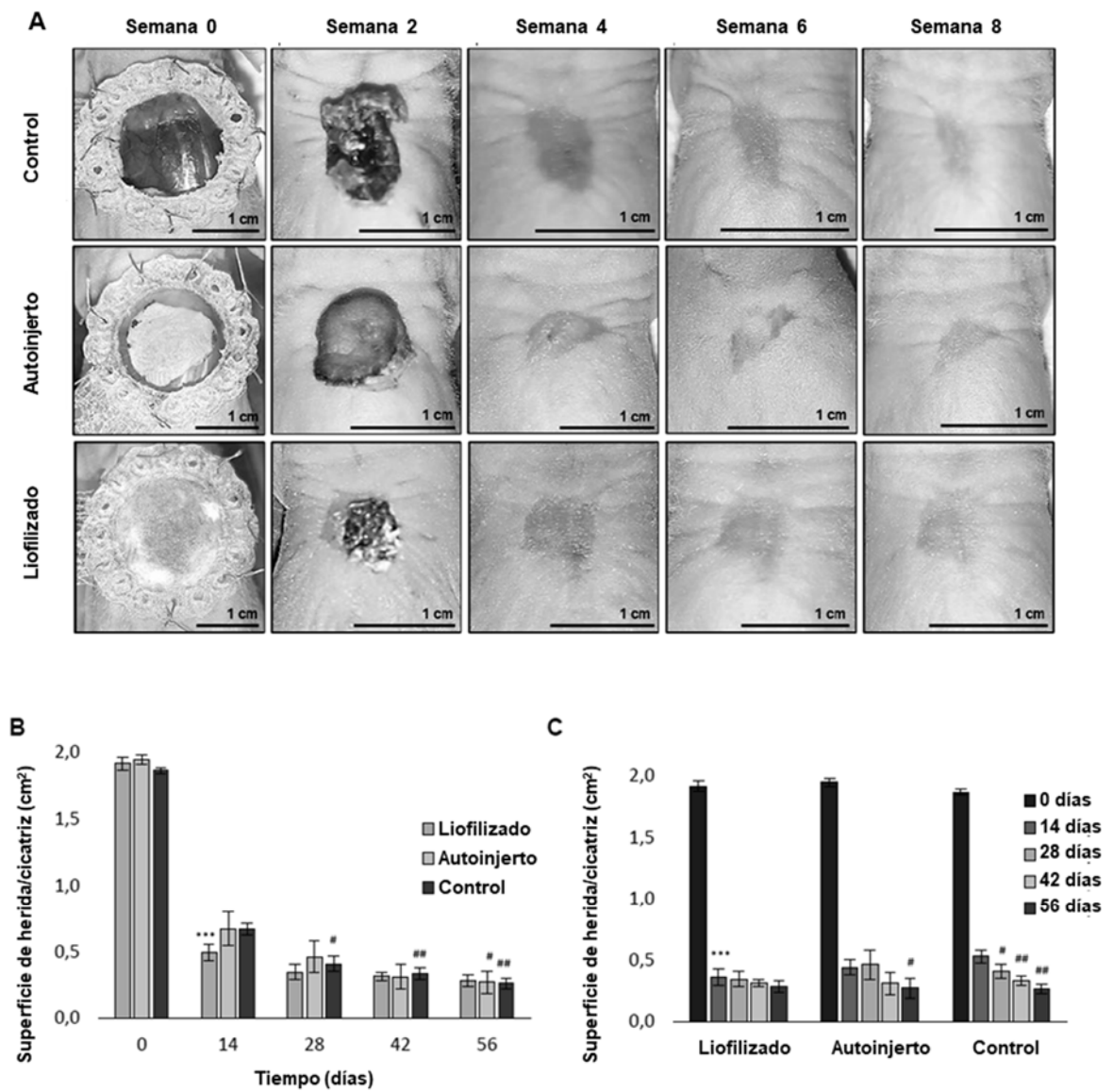
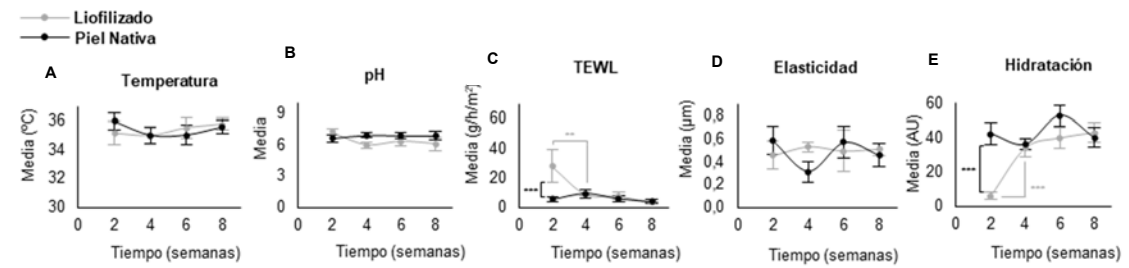
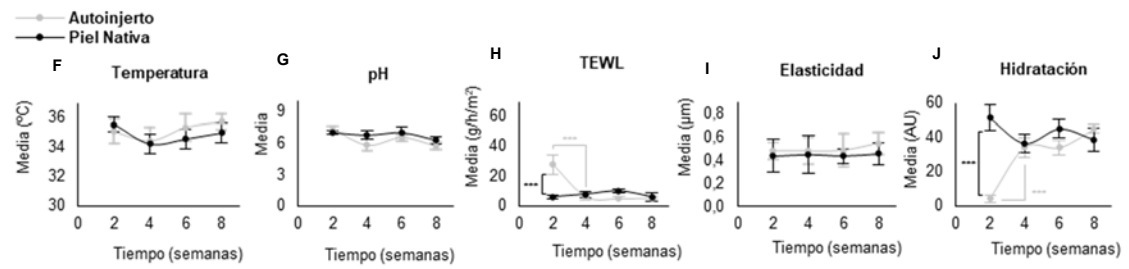


Fig. 13

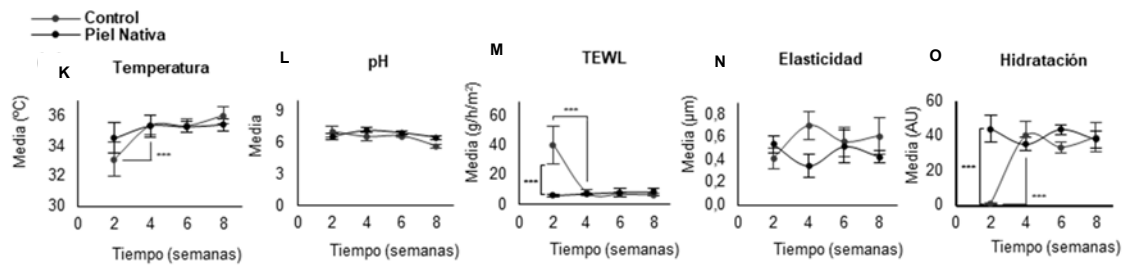
Liofilizado



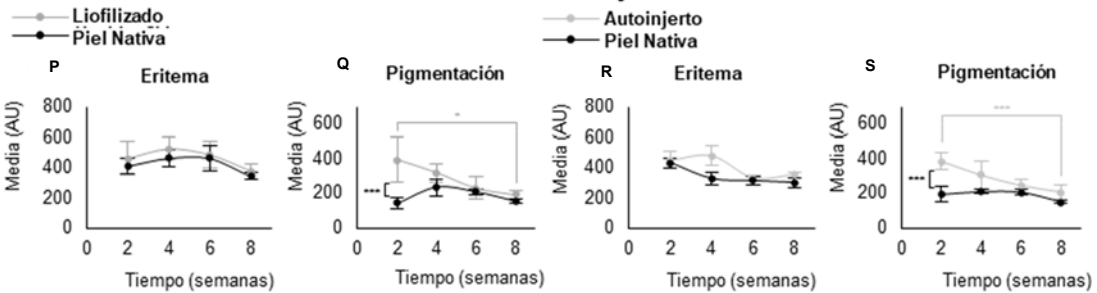
Autoinjerto



Control



Liofilizado



Control

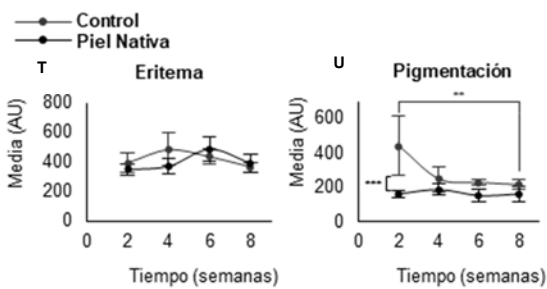


Fig. 14

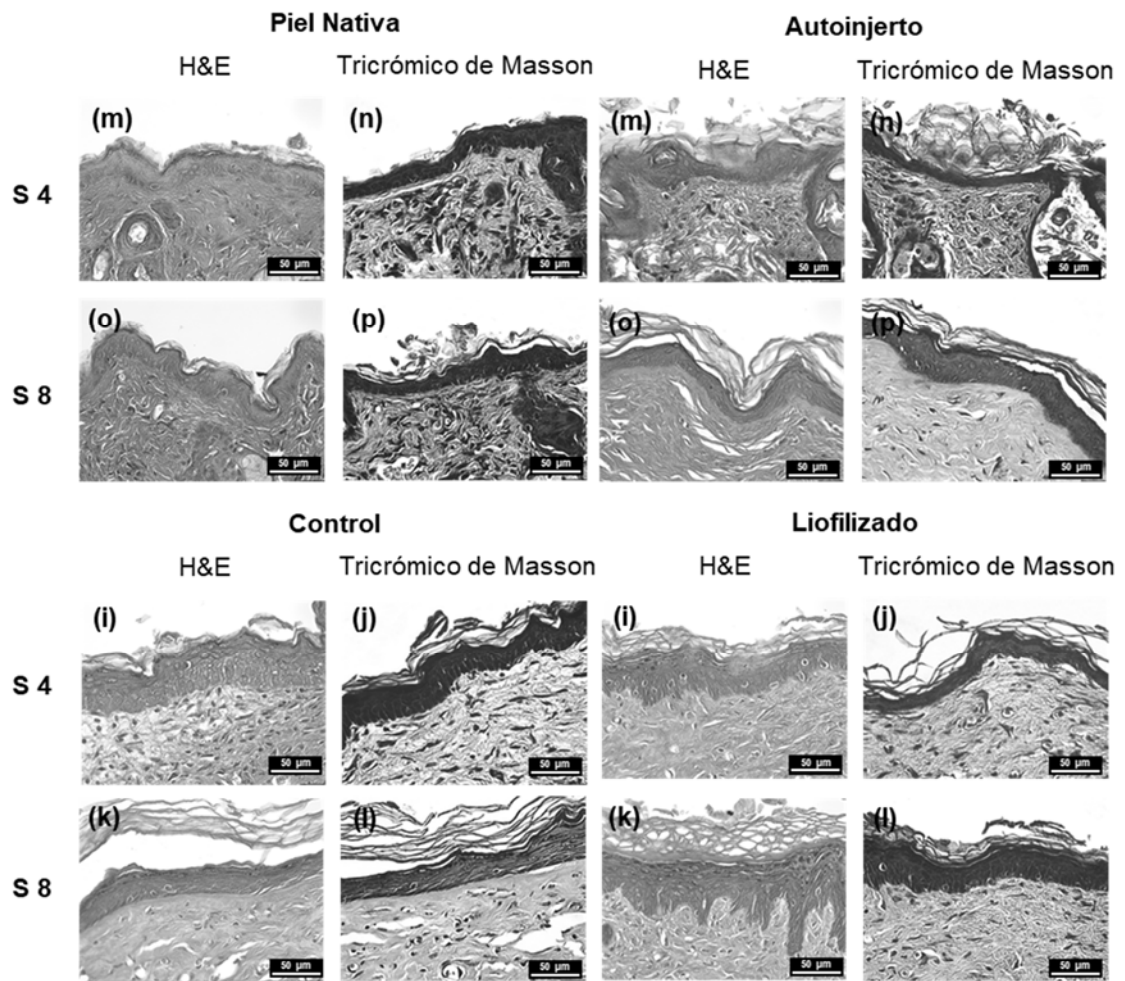


Fig. 15

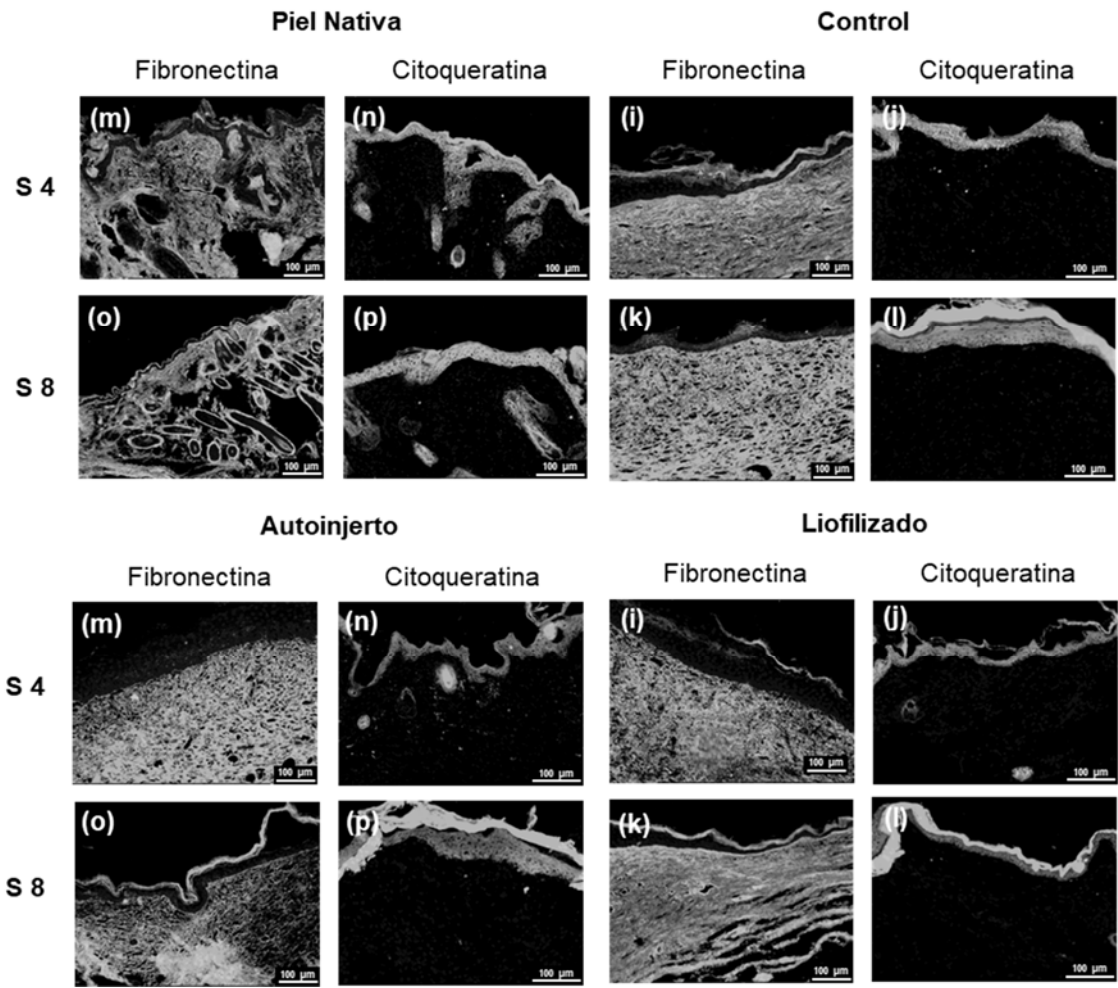


Fig. 16

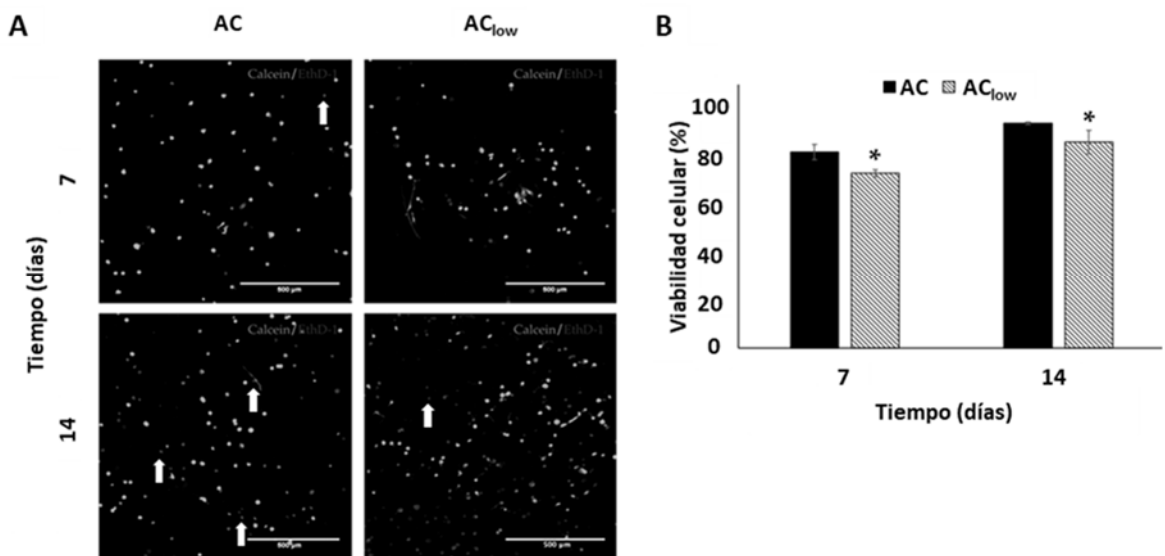


Fig. 17

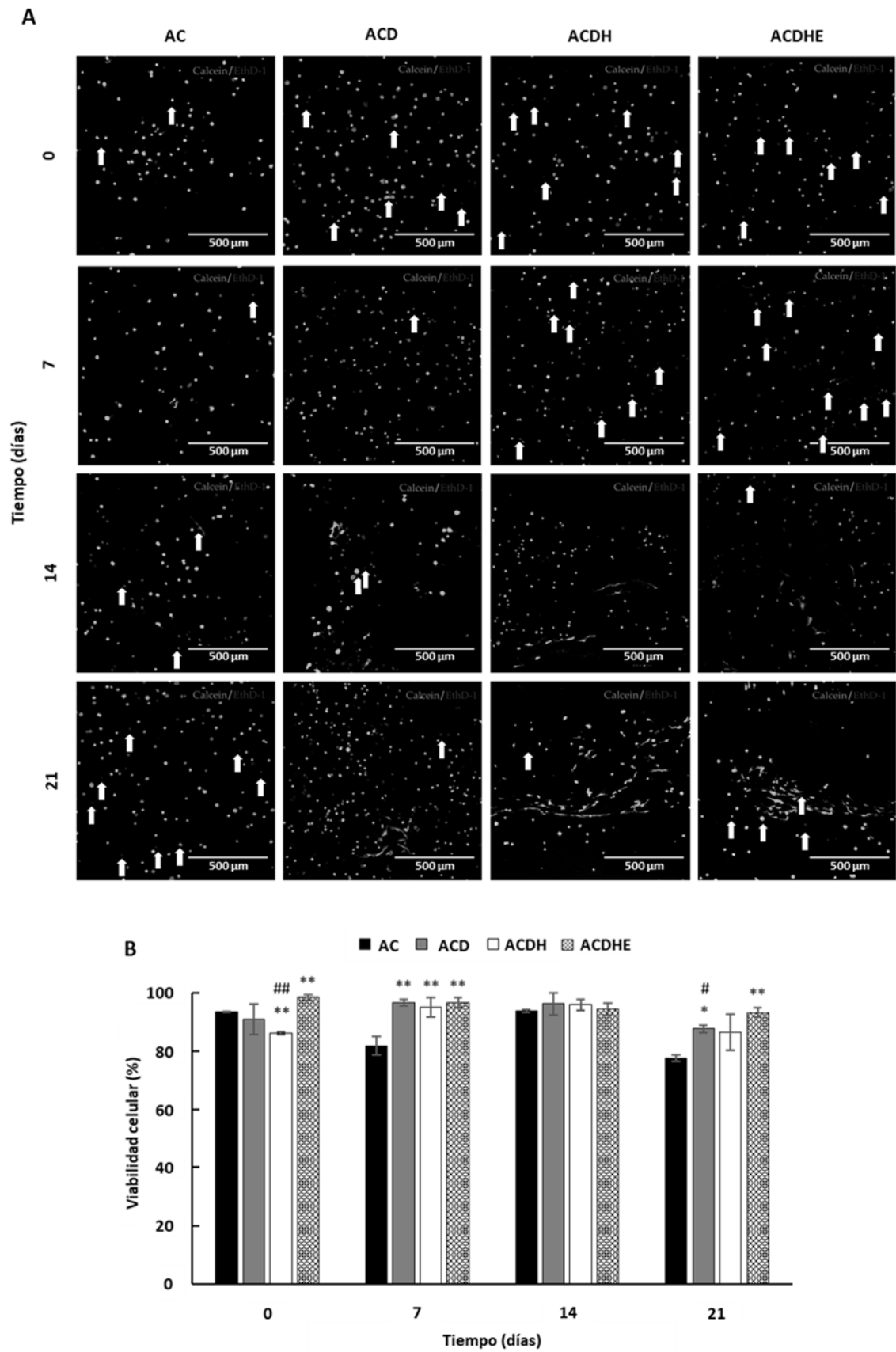


Fig. 18

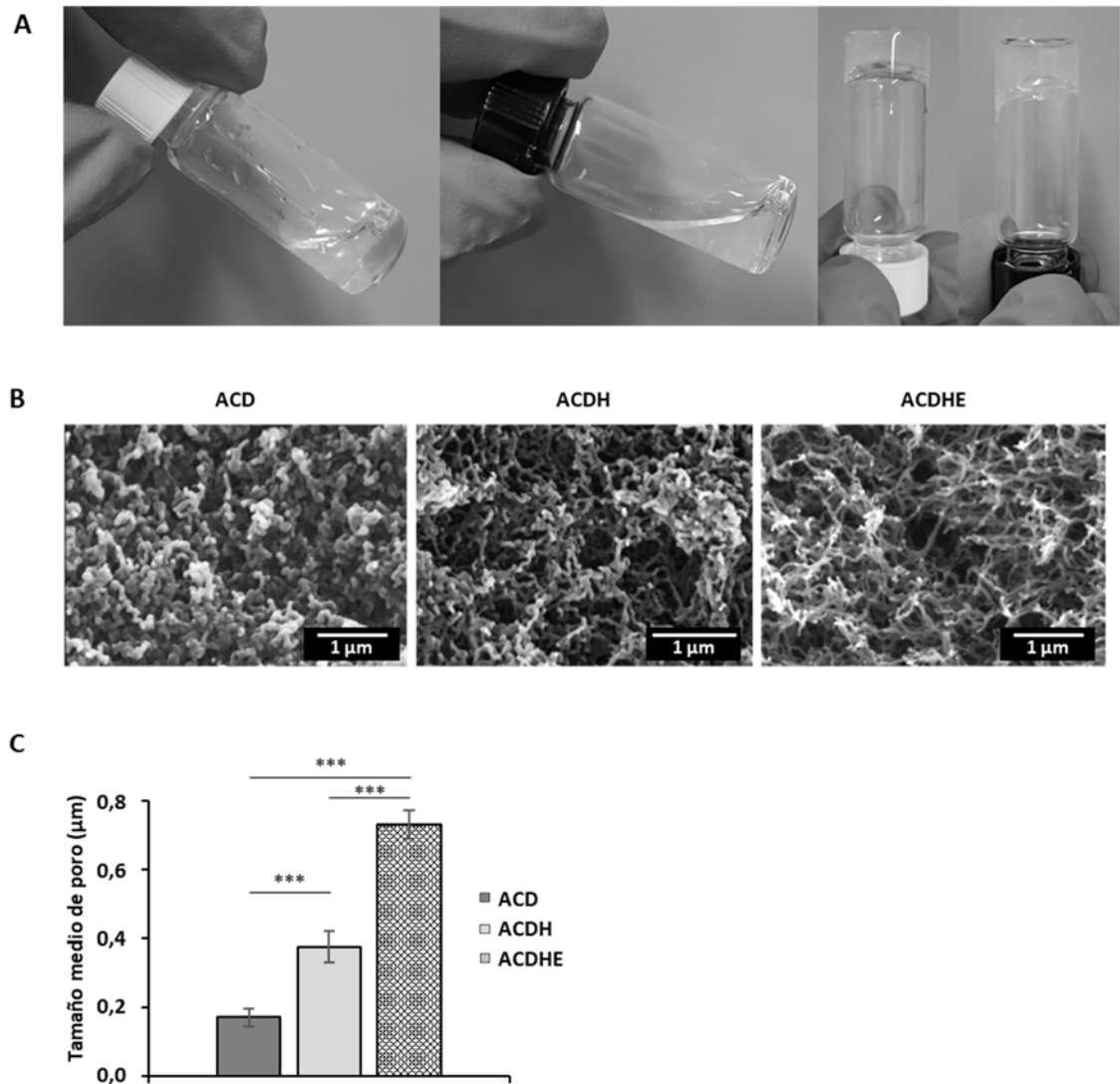


Fig. 19

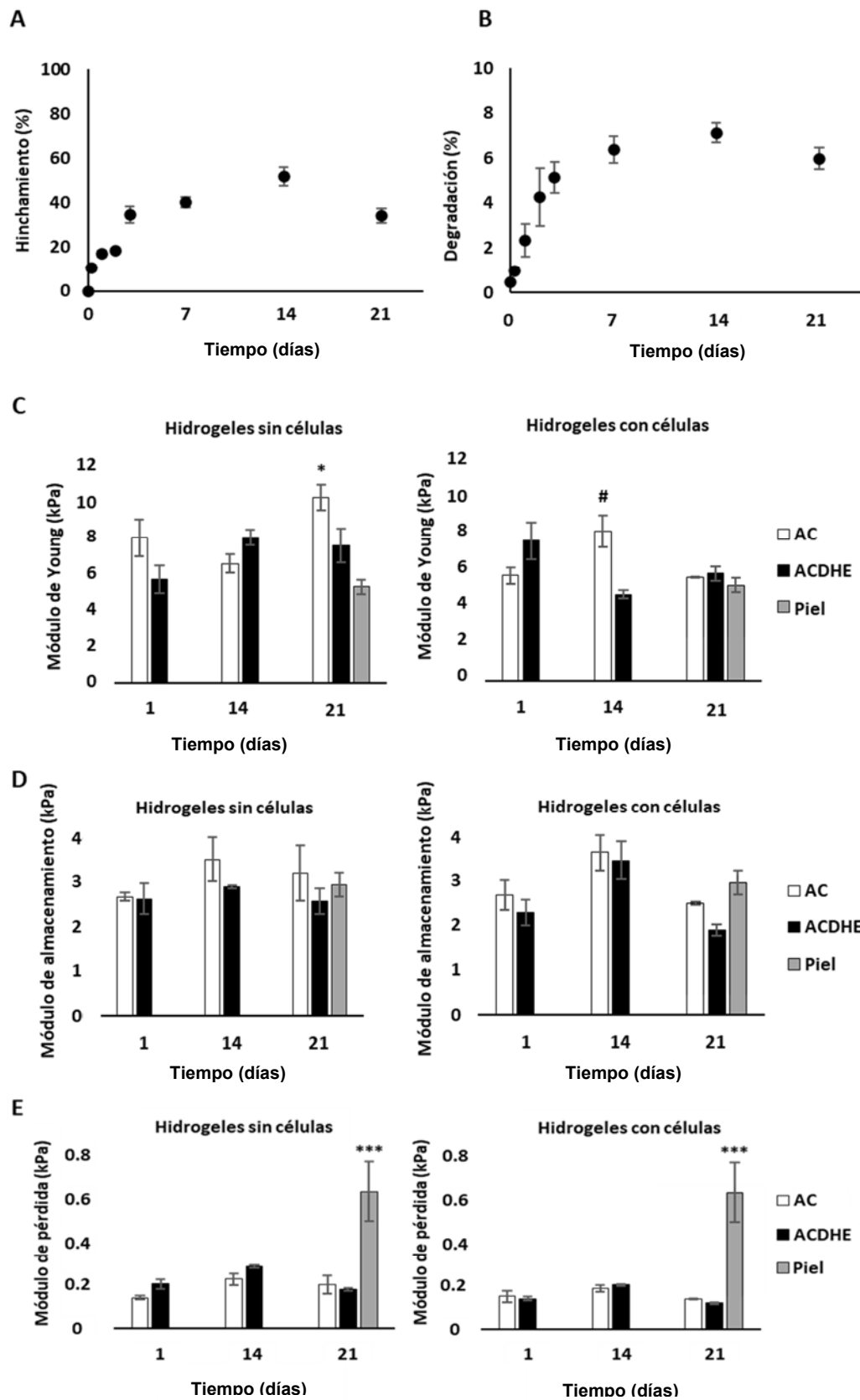


Fig. 20

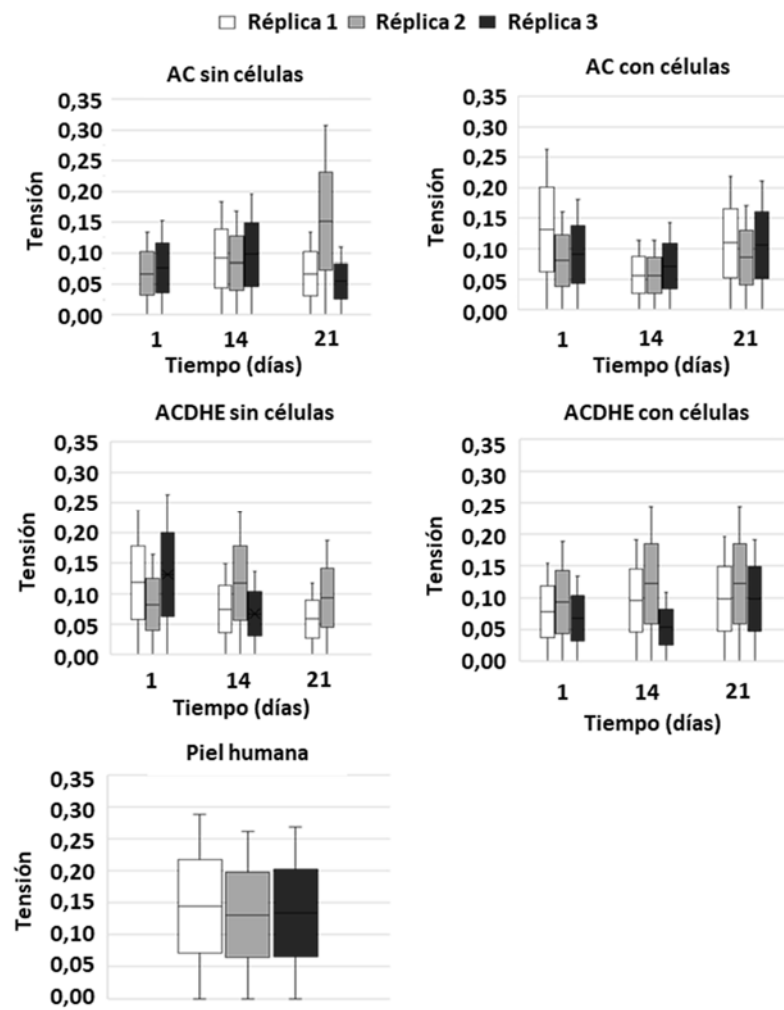


Fig. 21

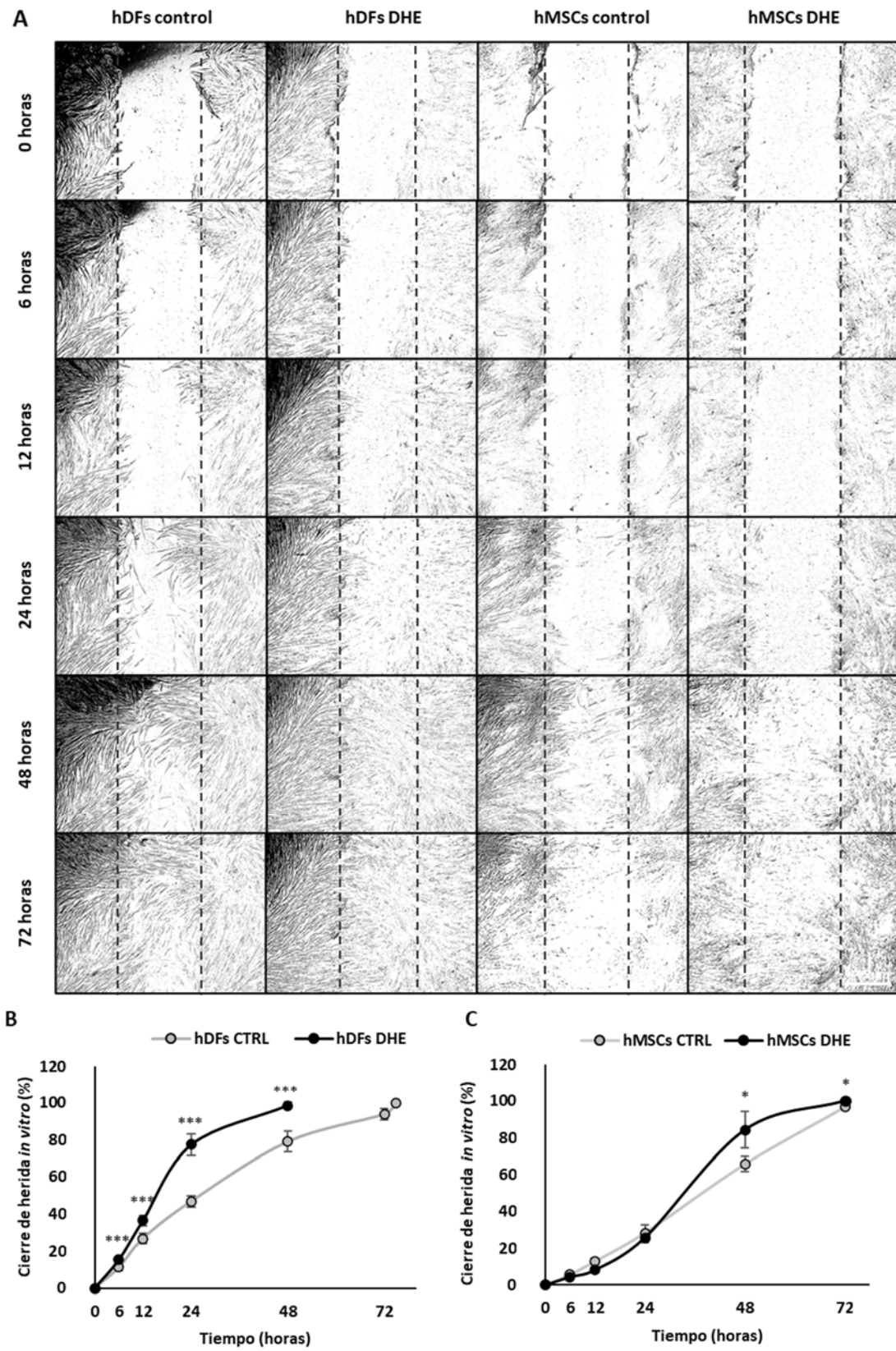


Fig. 22

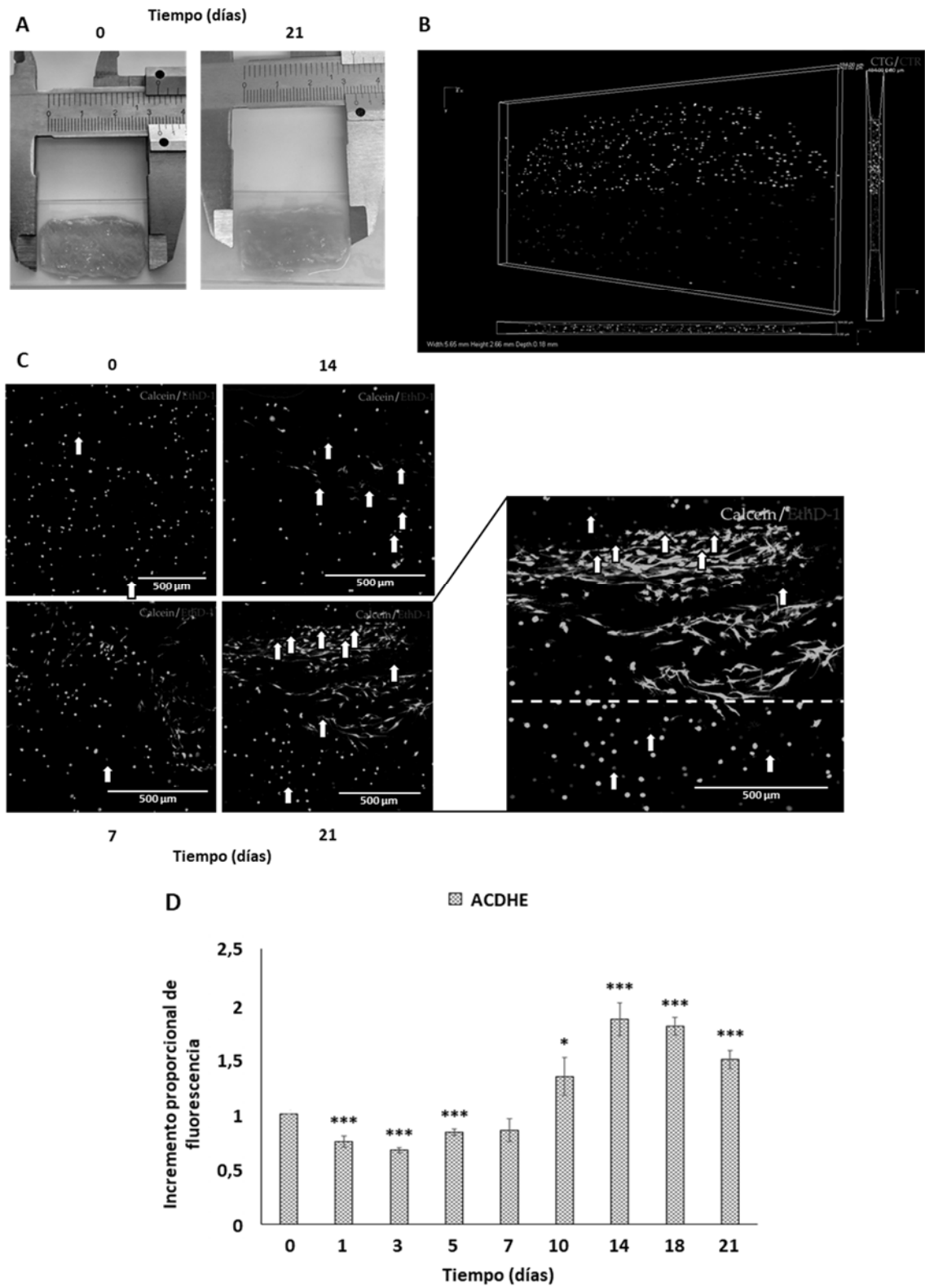


Fig. 23

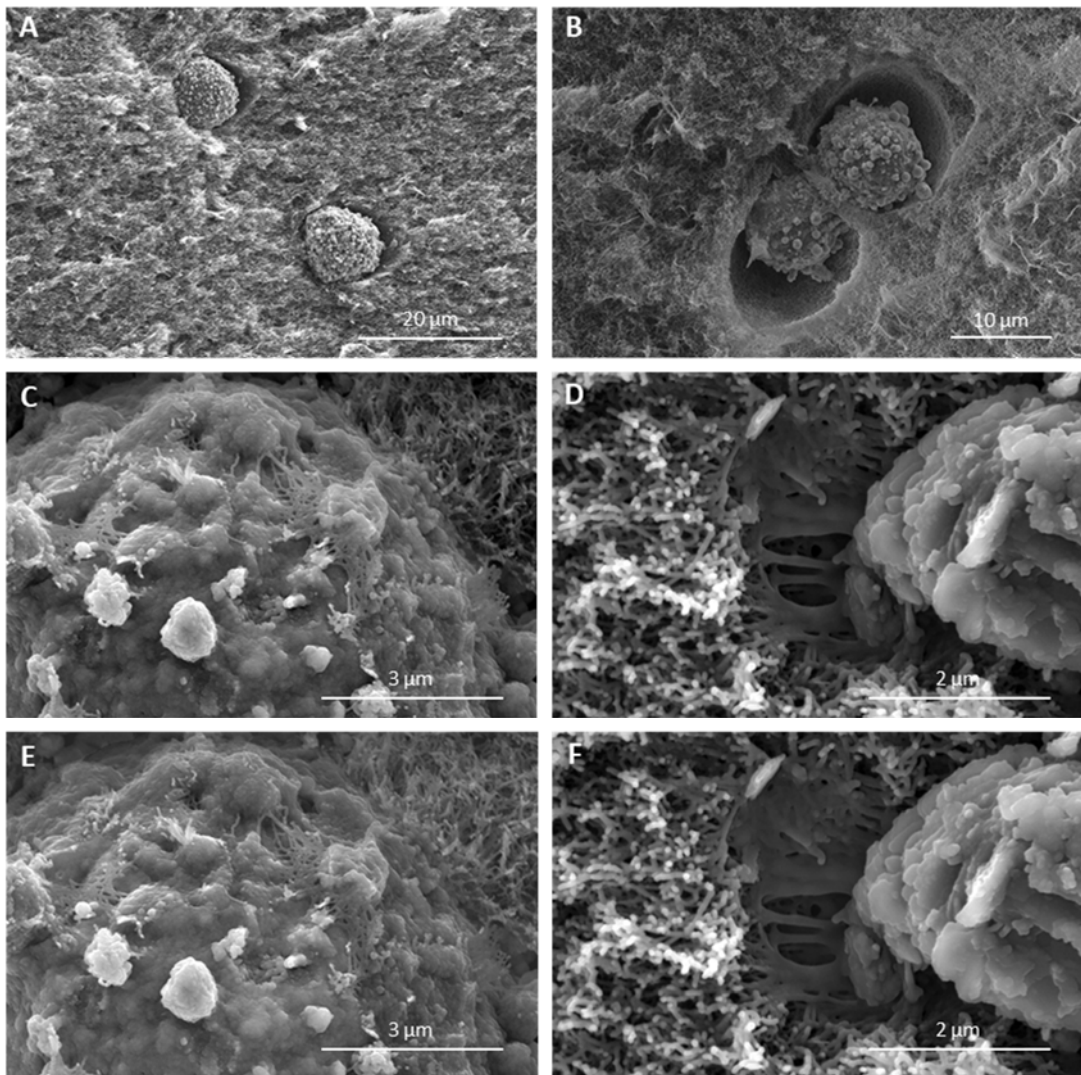


Fig. 24



- ②① N.º solicitud: 202230432
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2022
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NILLESEN S T M <i>et al.</i> Design and <i>in vivo</i> evaluation of a molecularly defined acellular skin construct: Reduction of early contraction and increase in early blood vessel formation. Acta Biomaterialia, 20101012 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Kilian Kristopher; Moghe Prabhas, 12/10/2010, Vol. 7, N° 3, Páginas 1063 - 1071, ISSN 1742-7061, <DOI: doi: 10.1016/j.actbio.2010.10.011>. página 1064, columna izquierda, tercer y segundo párrafos; figura 1.	1-41
A	KUROYANAGI M <i>et al.</i> Development of cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen spongy sheet containing fibroblasts and epidermal growth factor. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2014 Taylor & Francis UK, 30/11/2013, Vol. 25, N° 11, Páginas 1133 - 1143, ISSN 0920-5063 (print), <DOI: doi:10.1080/09205063.2014.920171>. resumen; página 1135, segundo y tercer párrafos.	1-41
A	ALESSANDRA QUARTA <i>et al.</i> Agarose-collagen I hydrogels: impact of the matrix stiffness on the growth of breast cancer cell lines spheroids and on drug penetration. CNR, Nanotec, Institute of Nanotechnology, University Salento, 2021, Páginas 1-22 Recuperado de Internet <URL: https://www.researchgate.net/publication/349872881_Agarose-collagen_I_hydrogels_impact_of_the_matrix_stiffness_on_the_growth_of_breast_cancer_cell_lines_spheroids_and_on_drug_penetration > resumen; página 2, cuarto y quinto párrafos.	1-41
A	LEE W <i>et al.</i> Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. Biomaterials, 20090301 Elsevier, AMSTERDAM, NL. Goodman Stua Ouyang Hong-Wei, 01/03/2009, Vol. 30, N° 8, Páginas 1587 - 1595, ISSN 0142-9612, <DOI: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.009>. página 1589, columna derecha, segundo párrafo; página 1590, columna izquierda, segundo párrafo y figuras 2 y 3.	1-41

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.04.2023

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/52 (2006.01)

A61L27/24 (2006.01)

A61K38/39 (2006.01)

A61K31/728 (2006.01)

A61K31/737 (2006.01)

A61K31/729 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, COMPDX, INSPEC, PUBCOMP, PUBSUBS, NPL, INTERNET.