



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología, Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado 3139 (Medicina)

# **ESTUDIO CLÍNICO PARA COMPARAR LA EFICACIA Y TOLERABILIDAD DE LA UTILIZACIÓN DE VELOS ELECTROHILADOS PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES QUEMADOS**

## **TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**María Dolores Pérez del Caz**

Dirigida por:

**Dr. Eduardo García-Granero Ximénez**

**Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis**

**Dr. Rafael Botella Estrada**

Tutor: **Dr. Luis Sabater Ortí**

Valencia, 18 enero 2023



**D. EDUARDO GARCÍA-GRANERO XIMÉNEZ**, Doctor en Medicina, Catedrático de Cirugía. Profesor Honorario del Departamento de Cirugía. Universidad de Valencia.

Dña. **PILAR SEPULVEDA SANCHIS**, Doctora en Ciencias Químicas, Investigadora Principal de la Unidad de Regeneración y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe.

**D. RAFAEL BOTELLA ESTRADA**, Doctor en Medicina, Catedrático de Dermatología. Jefe de Servicio de Dermatología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**D. LUIS SABATER ORTÍ**, Doctor en Medicina, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. Jefe de Sección del Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### **CERTIFICAN**

Que la licenciada en Medicina y Cirugía **MARÍA DOLORES PÉREZ DEL CAZ** ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia, el trabajo titulado: “ESTUDIO CLÍNICO PARA COMPARAR LA EFICACIA Y TOLERABILIDAD DE LA UTILIZACIÓN DE VELOS ELECTROHILADOS PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES QUEMADOS” que se presenta en esta memoria para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste, firmamos la presente en Valencia 18 enero 2023

E. García-Granero Ximénez

P. Sepúlveda Sanchís

R. Botella Estrada.

L. Sabater Ortí





## AGRADECIMIENTOS

Han pasado muchos años desde que empecé el trabajo de investigación, en el que se ha basado mi tesis doctoral. La dedicación y esfuerzo necesarios para llevarlo a cabo ha tenido la motivación especial de contribuir a progresar en el tratamiento de mis pacientes. Por ello, mi más sincero agradecimiento a todas las personas que lo han hecho posible.

A mis directores de tesis y tutor:

Gracias Dra. Pilar Sepúlveda, tantos años trabajando conjuntamente, impulsora principal para que empezara mi tesis. Sin tu entusiasmo y perseverancia además de tu apoyo todos estos años, no lo hubiera conseguido. Gracias Dr. Eduardo García-Granero, por sus directrices y tu confianza desde el primer momento llegando, más allá de tu jubilación, hasta el final del camino conmigo. Gracias Dr. Rafael Botella, por tus aportaciones y disposición que ha facilitado el desarrollo de este trabajo. Gracias Dr. Luis Sabater, por esa ayuda final tan necesaria y valiosa.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Plástica y de la Unidad de Quemados del Hospital La Fe, sin ellos hubiera sido del todo imposible. Gracias por su apoyo, su paciencia y amistad. Carmen, Arancha, Álvaro, Pilar, William, los médicos residentes, compañeros adjuntos, enfermería, auxiliares, celadores y el personal del IIS La Fe. Mi “otra familia” con la que comparto vocación y amistad.

A mis pacientes, que de manera voluntaria y desinteresada aceptaron participar, con el expreso deseo de contribuir en mejorar el tratamiento de otros pacientes como ellos.

A Delia, María y Bruno que han recorrido conmigo estos años de investigación. Gracias.

A mi familia, dándome ánimos y ayudándome en los momentos finales cuando más lo he necesitado. Gracias por la confianza depositada en mí y por ser parte del motor que me ha impulsado a lograr este manuscrito, con el cual culmina uno de mis mayores logros profesionales y sirve de inicio a quien sabe cuántos nuevos retos...

A Carlos, siempre presente en todo lo que intento hacer para ayudar a los demás. Donde quiera que estés, gracias.

A Bea, compañera de muchos trabajos juntas, tantas horas sacrificando su propio tiempo para ayudarme en todos mis proyectos. Mi niña, incansable trabajadora con un talento único, necesitaría varias vidas para agradecerte todo lo que has hecho.

A mi chico, por su infinita paciencia y apoyo incondicional. Gracias por estar, por acompañarme y por entenderme. Cuando estuve a punto de claudicar, tu animo fue decisivo y sin tu ayuda no lo hubiera logrado.

Y, por último, gracias a mis padres, que siempre han estado ahí, impulsando, ayudándome y con esa fe ciega en mí... sin su aliento y empeño nunca hubiera podido llegar donde estoy.

Gracias, papá, sobre todo va por ti.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS .....	III
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....	IV
Lista de tablas.....	IV
Lista de figuras.....	IV
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	5
3. INTRODUCCIÓN .....	9
3.1 Antecedentes.....	11
3.2 El biovelo SKINHEALTEX PLGA .....	14
3.3 Justificación del estudio.....	22
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	23
4.1 Hipótesis de trabajo .....	25
4.2 Objetivo principal.....	25
4.3 Objetivos secundarios .....	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
5.1 Principios éticos y autorización .....	29
5.2 Participantes .....	29
5.3 Aleatorización y enmascaramiento.....	31
5.4 Descripción de la intervención .....	32
5.5 Variables y fuentes de datos.....	35
5.5.1 Criterios de valoración principal .....	35
5.5.2 Criterios de valoración secundarios.....	35
5.6 Tamaño muestral y métodos estadísticos.....	40
5.7 Otros aspectos éticos.....	41
5.7.1 Consentimientos informados.....	41
5.7.2 Acontecimientos adversos.....	41
6. RESULTADOS.....	43
6.1 Efectividad del tratamiento.....	46
6.2 Eventos adversos .....	56
6.3 Evolución analítica.....	57
6.4 Calidad de la cicatriz .....	59
7. DISCUSIÓN .....	71
7.1 Efectividad y tolerancia del tratamiento.....	74

7.2 Calidad de la cicatriz .....	76
7.3 Perspectivas de futuro .....	78
7.4 Limitaciones del estudio .....	80
8. CONCLUSIONES.....	81
9. BIBLIOGRAFÍA.....	85
10. ANEXOS .....	93

# LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>AITEX</b>	Asociación de Investigación de la Industria Textil
<b>DL-PLGA</b>	50:50 poli (D, L-láctico-co-glicólico) terminado en éster
<b>dt</b>	Desviación típica
<b>FDA</b>	<i>United States Food and Drug Administration</i>
<b>GMP</b>	<i>Good Manufacturing Practices</i>
<b>IIS La Fe</b>	Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitari i Politècnic La Fe
<b>INR</b>	<i>International Normalized Ratio</i>
<b>IPEC-PQG</b>	<i>International Pharmaceutical Excipients Council- Pharmaceutical Quality Group</i>
<b>PLGA</b>	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
<b>POSAS</b>	<i>Patient and Observer Scar Assessment Scale</i>
<b>RETRACAR</b>	Grupo de investigación “Regeneración y Trasplante Cardíaco” del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitari i Politècnic La Fe
<b>VSS</b>	<i>Vancouver Scar Scale</i>

# LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

## Lista de tablas

**Tabla 1.** La escala de Vancouver para cicatrices.

**Tabla 2.** Escala POSAS.

**Tabla 3.** Cronograma del estudio.

**Tabla 4.** Características de los pacientes de la muestra.

**Tabla 5.** Mecanismos de quemadura en la muestra estudiada.

**Tabla 6.** Evolución del prendimiento de autoinjertos de piel parcial durante los primeros 15 días (periodo de curas), por grupos de estudio.

**Tabla 7.** Modelo de supervivencia para el análisis del tiempo hasta el prendimiento completo.

**Tabla 8.** Valores analíticos de los pacientes en la visita preoperatoria y al mes tras la intervención.

**Tabla 9.** Evolución de la calidad de la cicatriz medida a través de las escalas de Vancouver y POSAS a lo largo de los 12 meses de seguimiento.

**Tabla 10.** Modelo mixto de regresión de percentiles para la evolución de las escalas de Vancouver y POSAS a lo largo de los 12 meses de seguimiento y según grupos de estudio.

## Lista de figuras

**Figura 1.** SKINHEALTEX PLGA en microscopio electrónico de barrido.

**Figura 2.** Aspecto macroscópico del biovelo SKINHEALTEX PLGA.

**Figura 3.** Localización del biovelo nanofibrilar como capa intermedia entre el lecho y el injerto.

**Figura 4.** Esquema de la fabricación mediante electrohilatura.

**Figura 5.** La geometría nanofibrilar de SKINHEALTEX PLGA permite una mejor adhesión celular que la obtenida mediante andamios microporosos.

**Figura 6.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la biodegradabilidad en agua y solución salina fisiológica (PBS) del PLGA a diferentes tiempos.

**Figura 7.** Reepitelización de ratones NOD/SCID sometidos a una lesión transcutánea y tratados con un cultivo de piel expandida humana sobre una malla de colágeno o sobre un biovelo de PLGA.

**Figura 8.** Biovelo de SKINHEALTEX PLGA.

**Figura 9.** Varón de 24 años con quemadura por llama en pierna izquierda. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 10.** Cutometer® Dual MPA 580 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Colonia, Alemania).

**Figura 11.** Varón de 49 años con quemadura por llama en la pierna izquierda. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 12.** Varón de 43 años con quemadura por llama en el abdomen. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 13.** Mujer de 53 años con quemadura por escaldadura en el antebrazo izquierdo. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las área de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 14.** Varón de 44 años con quemadura por llama en el muslo derecho. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 15.** Varón de 45 años con quemadura por llama en la pierna derecha. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 16.** Varón de 63 años con quemadura por llama en la pierna derecha. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

**Figura 17.** Varón de 24 años con quemadura por llama en la pierna izquierda. Aspecto de las áreas del estudio el día de la cirugía y en la cura el día 2, en el cual el prendimiento fue completo.

**Figura 18.** Mujer de 66 años con quemadura química en antebrazo derecho. Aspecto de las áreas de estudio el día de la cirugía y en las curas del día 2, día 6 y 10, en el cual el prendimiento fue completo.

**Figura 19.** Aspecto de las áreas de estudio del paciente de la figura 11 el día de la cirugía y en las curas del día 2 y día 6, en el cual el prendimiento fue completo.

**Figura 20.** Aspecto de las áreas de estudio del paciente de la figura 14 el día de la cirugía y en las curas del día 2 y día 6, en el cual el prendimiento fue completo.

**Figura 21.** Mujer de 31 años con quemadura por llama en antebrazo izquierdo. Aspecto de las áreas de estudio el día de la cirugía y en las curas del día 2, día 6 y 10, en el cual el prendimiento fue completo.

**Figura 22.** Aspecto de las áreas de estudio del paciente de la figura 16 el día de la cirugía y en las curas del día 2 y día 6, en el cual el prendimiento fue completo.

**Figura 23.** Evolución del prendimiento a lo largo de los primeros 15 días.

**Figura 24.** Gráfica de eventos acumulados para el prendimiento completo durante los primeros 15 días.

**Figura 25.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 11 a lo largo de 12 meses.

**Figura 26.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 12 a lo largo de 12 meses.

**Figura 27.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 13 a lo largo de 12 meses.

**Figura 28.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 14 a lo largo de 12 meses.

**Figura 29.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 15 a lo largo de 12 meses.

**Figura 30.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 16 a lo largo de 12 meses.

**Figura 31.** Evolución de los valores de la escala de Vancouver en cada grupo de estudio a lo largo de 12 meses.

**Figura 32.** Evolución de los valores de la escala POSAS en los grupos de estudio a lo largo de 12 meses.



**Figura 33.** Evolución de los valores de las subescalas de la escala de Vancouver en las zonas control (rojo) y en las zonas tratamiento (azul), durante los 12 meses de seguimiento.

**Figura 34.** Evolución de la cicatriz valorada a través de la escala POSAS, según el observador médico (izquierda) y según el/la paciente (derecha), por grupos, durante 12 meses.

**Figura 35.** Evolución de los milímetros de deformidad a la presión negativa durante 12 meses de seguimiento.

**Figura 36.** Evolución de la elasticidad de las cicatrices en los 13 pacientes en los que se tomaron medidas mediante Cutometer® Dual MPA 580.



# RESUMEN



# 1. RESUMEN

**Introducción:** El *gold standard* del tratamiento quirúrgico de las quemaduras son los autoinjertos de piel parcial. En estudios preclínicos, el uso de un biovelo de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) electrohilado, colocado entre los autoinjertos y su lecho, ha demostrado su potencial para estimular la regeneración dérmica, aumentando el prendimiento y mejorando la calidad de la cicatriz. Adicionalmente, la estructura tridimensional del biovelo y su biodegradabilidad, le confieren un potencial uso como vía de administración de terapias locales. Estas propiedades no han sido todavía evaluadas en ensayos clínicos en humanos.

**Objetivo:** El objetivo principal de este estudio fue comparar intra-individualmente la efectividad y tolerancia del biovelo SKINHEALTEX PLGA utilizado junto con autoinjertos de piel parcial para el tratamiento de quemaduras desbridadas frente a autoinjertos de piel parcial solos.

**Materiales y métodos:** Se realizó un ensayo clínico aleatorizado y controlado a doble ciego incluyendo pacientes adultos con quemaduras que requerían tratamiento quirúrgico, durante 4 años (noviembre de 2018 a septiembre de 2022). Cada paciente actuó como su propio control, realizando un seguimiento durante 12 meses. En la zona control se aplicó el autoinjerto, mientras que en la zona tratamiento se interpuso un biovelo de PLGA bajo el autoinjerto. Se midió el porcentaje de injerto prendido de forma clínica, la calidad de la cicatriz utilizando las escalas de Vancouver y de Evaluación de Cicatrices del Paciente y del Observador, y su elasticidad mediante un instrumento basado en la aplicación de presión negativa. También se midió la evolución analítica de los pacientes preoperatoriamente y al mes de la cirugía. Se recogieron los eventos adversos (ensayo clínico fase I-II, seguridad y efectividad).

**Resultados:** El biovelo fue bien tolerado en los 26 pacientes reclutados, no se observaron eventos adversos relacionados con el mismo, ni alteraciones analíticas sugestivas de efectos sistémicos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el prendimiento de los autoinjertos de piel parcial. Tampoco en la calidad de las cicatrices posteriores, entre el grupo control (autoinjertos de piel parcial solos) y el grupo con autoinjertos y biovelo SKINHEALTEX PLGA. Los resultados sugieren el potencial del biovelo como posible forma de administración de terapias locales, encaminadas a

aumentar el prendimiento de los autoinjertos o mejorar la calidad de las cicatrices resultantes en pacientes con quemaduras.

Conclusión: Este es el primer ensayo clínico en el que se investiga la aplicación de un biomaterial electrohilado en el tratamiento de las quemaduras mediante autoinjertos de piel. SKINHEALTEX PLGA es un producto biocompatible y seguro que puede aplicarse como interfaz entre los autoinjertos y el lecho desbridado de una quemadura, sin disminuir el prendimiento de estos.

# ABSTRACT





## 2. ABSTRACT

**Introduction:** Split-thickness skin autografts are the gold standard for surgical treatment of burns. In preclinical studies, the use of an electrospun poly(lactic-co-glycolide) acid (PLGA) bioveil, placed between autografts and their bed, has shown potential to stimulate dermal regeneration, increase graft take and improve scar quality. This bioveil also has potential as a drug delivery scaffold due to its three-dimensional structure and biodegradability. These properties have not yet been evaluated in human clinical trials.

**Objective:** The primary goal of this study was to compare intra-individually the effectiveness and tolerability of the SKINHEALTEX PLGA bioveil used in conjunction with partial skin autografts for the treatment of debrided burns, compared to partial skin autografts alone.

**Materials and methods:** A double-blind randomized controlled clinical trial was conducted with adult patients with burns that required surgical treatment, for 4 years (November 2018 to September 2022). Each patient acted as their own control, and they were followed for 12 months. In the control area an autograft was applied, while in the treatment area the PLGA bioveil was interposed between the autograft and the bed. The outcome variables were the percentage of graft take, evaluated clinically, the scar quality measured using the Vancouver Scar Scale and the Patient and Observer Scar Assessment Scale, and scar elasticity using a device based on the deformation after applying negative pressure. Blood test variables preoperatively and one month after surgery were also collected, as well as adverse events (phase I-II clinical trial, safety and effectiveness).

**Results:** The bioveil was well tolerated in the 26 patients that were recruited. No adverse events related to the bioveil or laboratory changes suggestive of systemic effects were observed. No statistically significant differences were observed in partial skin autograft take and subsequent scar quality between the control group (partial skin autografts alone) and the autograft and SKINHEALTEX PLGA bioveil group. The results suggest potential of the PLGA bioveil as a possible route of administration for local therapies that increase graft take of autografts and/or improve the quality of the resulting scars in burn patients.

**Conclusion:** This is the first clinical trial investigating the application of an electrospun biomaterial in the treatment of burns using skin autografts. SKINHEALTEX PLGA is a

biocompatible and safe product that can be applied as an interface between autografts and the debrided bed of a burn, without reducing graft take.

# INTRODUCCIÓN



## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Antecedentes

Las quemaduras son lesiones causadas por energía, que puede presentarse en forma térmica (calor, frío), cinética (fricción), eléctrica, química o radioactiva (1). Estas agresiones producen una destrucción celular de la piel y sus anejos, que es más profunda y extensa cuanto más grave es la quemadura.

La mayoría de las quemaduras afectan solo a la epidermis o se extienden hasta la dermis papilar; por ejemplo, tras una exposición a líquidos calientes. Estas quemaduras epitelizan de forma espontánea a partir de los anejos no lesionados dejando unas secuelas mínimas o sin secuelas (2). Sin embargo, en las quemaduras que afectan a la dermis reticular o hipodermis (quemaduras profundas) la dermis sana que queda es escasa por lo que el proceso de epitelización es mucho más lento. Ello conlleva un mayor riesgo de infección y una alta tasa de cicatrización anómala (3), como la cicatrización hipertrófica, cuyo riesgo se estima alrededor del 70% (4). Para prevenir estos problemas y acelerar la curación de las heridas en las quemaduras profundas, el *gold standard* actual es el tratamiento quirúrgico mediante la escisión de todo el tejido desvitalizado y la cobertura del lecho con autoinjertos de piel (5).

Los autoinjertos de piel son tejido cutáneo no quemado del paciente, que es transferido de una parte del cuerpo (zona donante) a otra (zona lesionada), restituyendo la barrera cutánea y aportando dermis sana que acelera el proceso de epitelización (6). Pueden ser totales (epidermis y toda la dermis), pero habitualmente son parciales. Los autoinjertos de piel parcial tienen epidermis y una porción variable de dermis, de forma que en la zona donante permanece la otra parte de la dermis y los anejos cutáneos, a partir de los cuales epitelizará en dos o tres semanas. La dermis proporciona resistencia y viscoelasticidad a la piel por lo que, a mayor espesor de injerto (mayor cantidad de dermis), mejor calidad de la cicatriz en la zona receptora, pero mayor morbilidad en la donante (5,6). Los injertos finos (0,15–0,30 mm) son apropiados para zonas con escasa demanda funcional, con las ventajas de que su prendimiento será más rápido y que las zonas donantes epitelizarán más rápido. Los autoinjertos gruesos (0,4 –0,60 mm) son más apropiados para las zonas con altas exigencias funcionales y/o estéticas, como las manos y la cara, presentando el

inconveniente de que tardan más tiempo en prender en el lecho receptor y que sus zonas donantes también tardarán más en epitelizar al quedar menos dermis sana subyacente. Por último, los autoinjertos intermedios (0,30–0,45 mm) son los más apropiados para zonas de demanda intermedia.

El prendimiento del autoinjerto sobre el lecho desbridado se desarrolla en las siguientes fases (5,6):

1. Imbibición: Tiene lugar inmediatamente después de la colocación del autoinjerto. Este sobrevive gracias a la difusión pasiva de nutrientes y oxígeno del lecho de la herida. En esta fase el injerto tiene un aspecto pálido, pues no tiene vascularización propia. Puede tolerar este estado hasta 4 días, manteniendo su viabilidad.
2. Inoculación: Se produce aproximadamente tras 48 horas desde su colocación. En esta fase se establece una conexión vascular entre los vasos del injerto y los capilares del lecho de la herida, restableciendo parcialmente el riego sanguíneo al injerto. El injerto se vuelve rosado debido a esta microcirculación sanguínea.
3. Revascularización: Trascurridos varios días desde la cirugía, se crean nuevos vasos sanguíneos desde el lecho de la herida al injerto, bien por neoangiogénesis o bien a través de la proliferación de células endoteliales en el lecho y su posterior migración al injerto siguiendo la lámina basal preexistente.

Una vez superadas las tres fases anteriormente mencionadas, el injerto se estabiliza e inicia su fase de maduración, que puede tardar un año o más en completarse. Este proceso comporta cambios en la pigmentación, el aplanamiento y el ablandamiento de la piel cicatricial hasta lograr su resultado final.

Los autoinjertos de piel parcial suelen ser obtenidos de ubicaciones con superficies amplias lo más planas posibles, que facilitan su extracción y que ordinariamente no son visibles, pues dichas zonas posteriormente no tendrán un aspecto normal (5). Frecuentemente se extraen de los muslos. Hay zonas de tal importancia funcional o estética que no son candidatas a la extracción, como por ejemplo la cara, el cuello, las manos o las flexuras, y zonas donde la configuración anatómica dificulta la extracción eficiente de buenos autoinjertos de piel parcial. Ello supone que en pacientes con mucha

superficie corporal quemada es habitual que exista una menor superficie donante que superficie quemada, escasez que impide tratar todas las quemaduras de forma óptima y simultánea, pues se ha de esperar a que las zonas donantes disponibles epitelicen para volverse a extraer autoinjertos.

Los autoinjertos de piel son una cobertura definitiva y de primera elección para prácticamente todas aquellas quemaduras profundas que precisan de tratamiento quirúrgico (5,7). Ello es debido a que logran resultados aceptables en cuanto a función y calidad de la cicatriz, con limitada morbilidad en la zona donante. Las otras coberturas definitivas son los colgajos, que al tener mayor morbilidad solo se usan en caso de exposición de estructuras nobles, y los cultivos de piel expandida basados en matrices tridimensionales de queratinocitos y fibroblastos del propio paciente. Estos cultivos presentan diversos problemas (8):

- Tardan semanas en obtenerse, demorando el tiempo hasta el tratamiento definitivo del paciente con el consecuente aumento del riesgo de infección, sepsis y alteraciones de la cicatrización.
- Desde 2014, son catalogados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) como medicamentos de terapia avanzada (producto de ingeniería tisular). Solo se pueden realizar en instalaciones con Sala Blanca, garantizando el cumplimiento de las Normas de Correcta Fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practices*), lo cual dificulta el suministro y encarece el producto.
- Su uso tiene una larga curva de aprendizaje, pues es un producto frágil y difícil de manejar.
- Su aplicación restaura la función barrera de la piel, necesaria para la supervivencia de pacientes con quemaduras extensas, pero, al carecer de dermis, la calidad de la cicatriz resultante es baja, con una alta tasa de secuelas cicatriciales.

Por todo ello, y tras la aparición de métodos avanzados de aprovechamiento de autoinjertos (por ejemplo la técnica Meek), el uso del cultivo de queratinocitos se ha reducido considerablemente y es una terapia que en el momento actual se aplica solo en casos seleccionados (9,10).

El resto de las coberturas son temporales, y se emplean cuando no hay disponibilidad de autoinjertos de piel parcial para cubrir todos los lechos (pacientes con mucha superficie corporal quemada), hasta que las zonas donantes hayan epitelizado y se puedan volver a extraer los autoinjertos.

Las principales coberturas temporales utilizadas en la actualidad son:

- Biológicas: aloinjertos, membrana amniótica.
- Semisintéticas: matrices celulares (p.ej. Dermagraft®) o acelulares (p.ej. Integra®, Matriderm®).
- Sintéticas: mallas de nylon (p.ej. Biobrane®), acrilamina (p.ej. Omiderm®, Exskin®), poliuretano (p.ej. Opsite®), entre otras.

Estas coberturas también pueden utilizarse como adyuvantes a los autoinjertos (entre el autoinjerto y el lecho) para favorecer la regeneración dérmica y así aumentar la calidad de la cicatriz, a costa de una tasa de prendimiento algo menor y un elevado coste económico. Ello hace que su uso quede reservado para las quemaduras de espesor total con exposición de estructuras injertables (p.ej. paratenon) (9,10).

Se ha investigado la aplicación de diversos materiales para mejorar la calidad de la cicatriz sin una disminución de la tasa de prendimiento de autoinjertos. Uno de los formatos han sido los biovelos, por ser láminas extremadamente finas, porosas y biocompatibles con diversas aplicaciones clínicas (11). Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado un producto que logre mejorar la calidad cicatricial sin disminuir el prendimiento de los injertos.

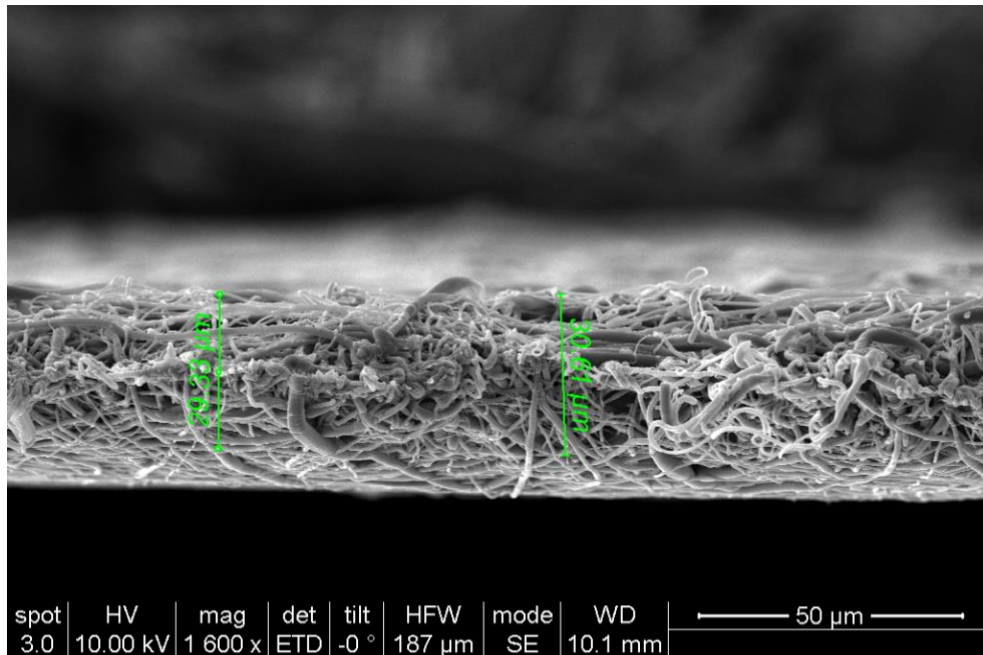
### 3.2 El biovelo **SKINHEALTEX PLGA**

El 50:50 poli(D,L-láctico-co-glicólico) terminado en éster (DL-PLGA) es un copolímero tipo poliéster alifático biodegradable con una alta biocompatibilidad (12). Se ha estudiado su potencial aplicación médica a nivel preclínico en ámbitos como el cáncer, la regeneración ósea y el tratamiento de heridas (12,13). Ello llevó al grupo “Regeneración y Trasplante Cardíaco” (RETRACAR) del IIS La Fe a desarrollar un biovelo a partir de

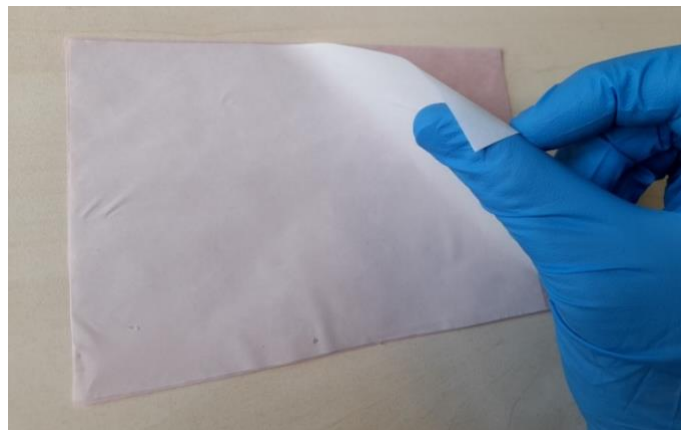


este material en colaboración con el Centro de Investigación e Innovación AITEX (Asociación de Investigación de la Industria Textil) e iniciar estudios preclínicos con él.

SKINHEALTEX PLGA (AITEX, Alcoy, España) es un biovelo milimétrico registrado como producto sanitario de utilidad clínica compuesto por nanofibras de DL-PLGA electrohiladas (Figs. 1 y 2).

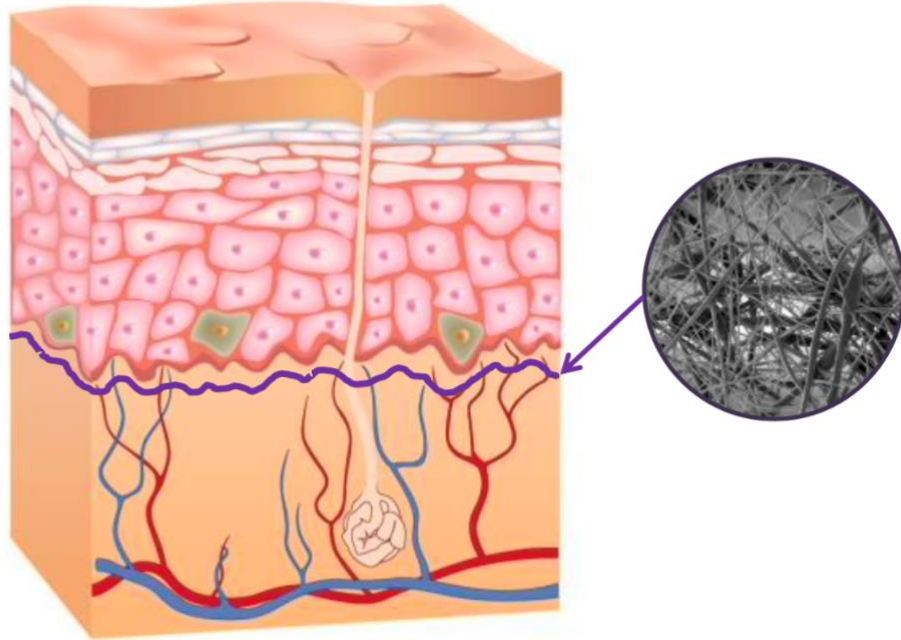


**Figura 1.** SKINHEALTEX PLGA en microscopio electrónico de barrido. El biovelo consiste en una lámina de espesor micrométrico, compuesta de hilos nanométricos, que tiene carácter biocompatible. Fuente: Centro de Investigación e Innovación AITEX.



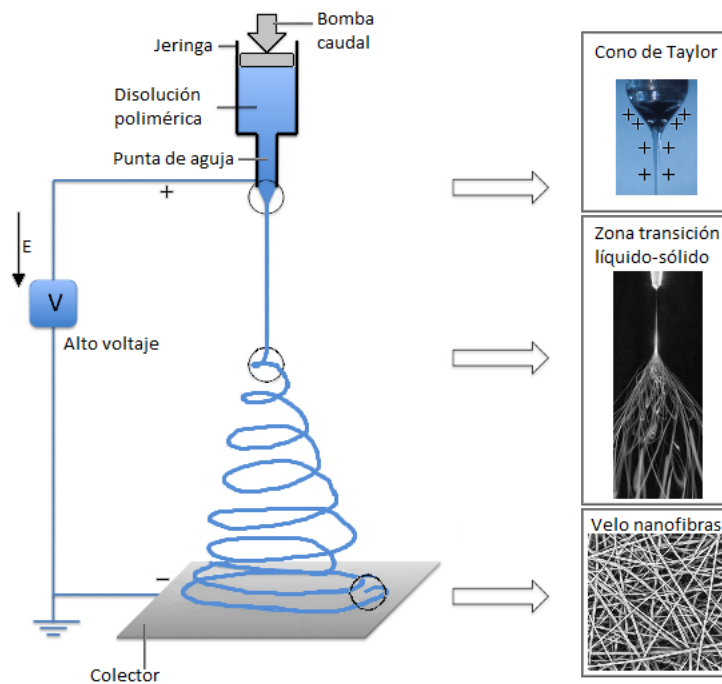
**Figura 2.** Aspecto macroscópico del biovelo SKINHEALTEX PLGA. Fuente: propia

Este biovelo fue creado para ser colocado entre el lecho y el autoinjerto de piel para facilitar su prendimiento y mejorar la calidad de la cicatriz posterior (Fig. 3).



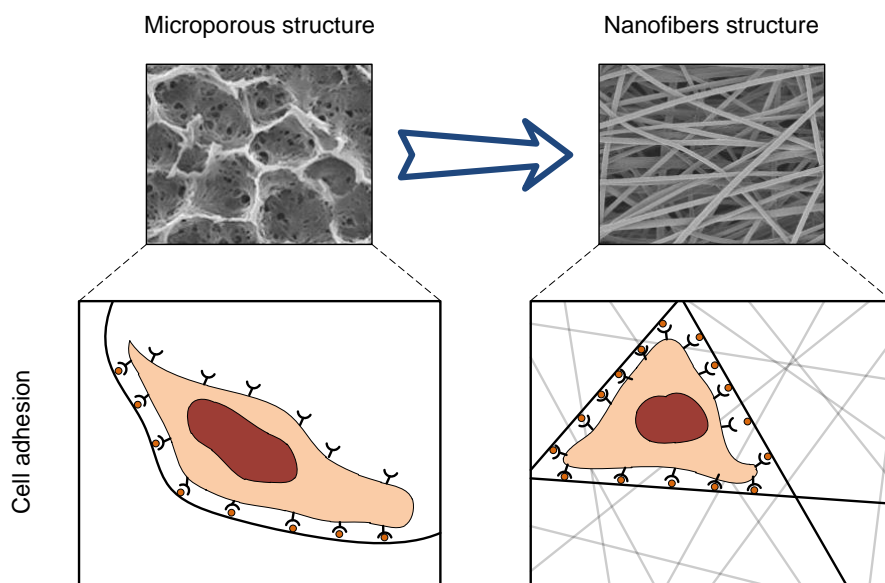
**Figura 3.** Localización del biovelo de electrohilatura, como capa intermedia entre el lecho y el injerto. El biovelo actúa a nivel de la dermis para mejorar el prendimiento del injerto y la calidad de la cicatriz. Fuente: propia.

La electrohilatura es una técnica de fabricación en la que se aplica un alto potencial eléctrico a una disolución de polímero, generando cargas en dicha disolución. En caso de SKINHEALTEX PLGA, el polímero es DL-PLGA y está disuelto en N,N-dimetilformamida de grado biotecnológico  $\geq 99,9$  (Sigma-Aldrich®, San Luis, Estados Unidos). La disolución se encuentra dentro de una jeringa con aguja invertida, y también se genera un campo electrostático entre un electrodo que está en contacto con la disolución y un segundo electrodo en forma de plancha opuesto a la jeringa y a cierta distancia (electrodo colector). Cuando las cargas alcanzan una cantidad crítica, emana un chorro de disolución desde el primer electrodo a través de la aguja (*cono de Taylor*) hasta el segundo, donde se coleccionan las nanofibras, que se han ido solidificando a lo largo de su trayectoria entre electrodos (Fig. 4).



**Figura 4.** Esquema de la fabricación mediante electrohilatura. Fuente: Centro de Investigación e Innovación AITEX.

Se eligió la tecnología de la electrohilatura para la fabricación del SKINHEALTEX PLGA porque es una técnica que permite imitar la matriz extracelular de la dermis, ya que genera una lámina muy porosa de nanofibras de unos 550 nm de diámetro dispuestas aleatoriamente y de unos 30  $\mu\text{m}$  de espesor. Esta estructura tridimensional reproduce las microfibrillas de proteínas de la dermis. Las nanofibras, tras generarse en el colector, se secan en condiciones de vacío para asegurar que cualquier traza de disolvente residual es eliminada del biovelo, y estas se tratan con plasma de baja presión para mejorar su carácter hidrofílico, lo cual permite una mejor interacción con el lecho de la herida y mejora la adhesión celular. Este tratamiento, unido a las características biomiméticas de SKINHEALTEX PLGA (isotropía, resistencia, estructura nanofibrilar aleatoria), permiten una excelente adhesión celular (Fig. 5) (12).



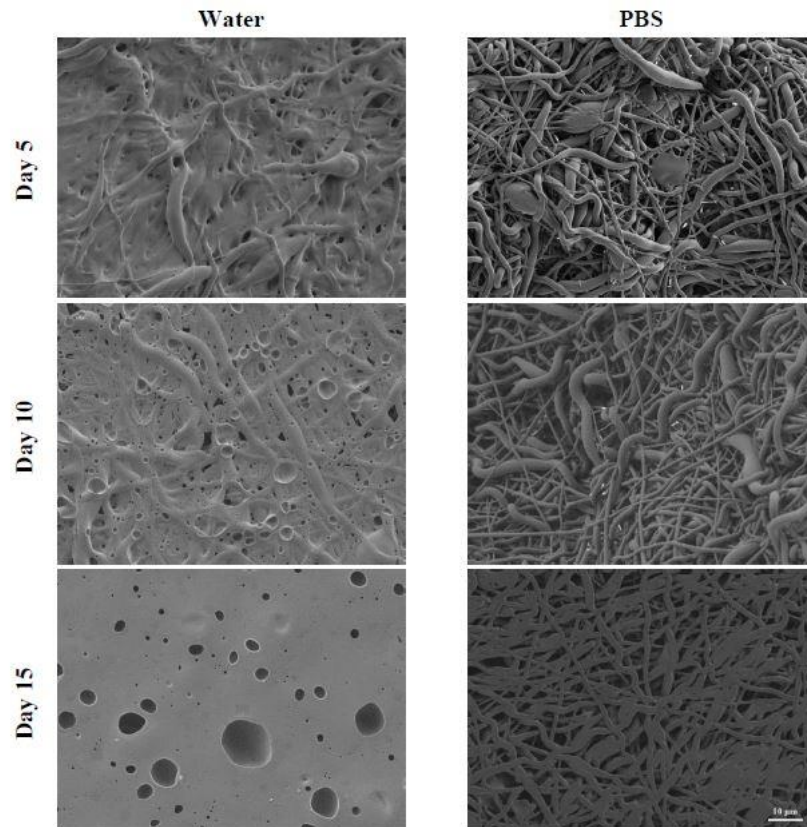
**Figura 5.** La geometría nanofibrilar de SKINHEALTEX PLGA permite una mejor adhesión celular que la obtenida mediante andamios microporosos. Fuente: Centro de Investigación e Innovación AITEX.

Adicionalmente, la electrohilatura permite incorporar fármacos a este biovelo durante su fabricación. Los fármacos serán liberados en el lecho de forma retardada a medida que se va degradando el biovelo durante las semanas siguientes a su aplicación, por lo que SKINHEALTEX PLGA podría servir para administrar fármacos localmente de forma controlada (dosis homogéneas, al contrario que la vía tópica con pomadas o cremas) y prolongada (a lo largo de las varias semanas durante las que se va degradando el biovelo).

El grupo RETRACAR ha realizado diversos estudios preclínicos con SKINHEALTEX PLGA para investigar su propiedades e interacción con las células (14,15).

*In vitro*, este grupo evaluó la cinética de biodegradación del biovelo sumergiéndolo en agua y tampón fosfato salino (Fig. 6). En agua, los investigadores observaron una disminución lineal en la cinética de degradación medida mediante cromatografía de exclusión por tamaño, no detectándose DL-PLGA transcurridos 20 días (14). En tampón fosfato salino, los autores observaron una disminución lineal de SKINHEALTEX PLGA hasta los 30 días, ralentizándose su degradación después. Esta rápida biodegradabilidad (inferior a un mes) fue una de las propiedades más valoradas para la elección del polímero DL-PLGA frente a otros polímeros con mayor resistencia a la degradación, como la

fibrina de la seda o la policaprolactona, ya que estos últimos permanecían sin degradarse en periodos hasta un año, y en estudios *in vivo* generaron reacciones a cuerpo extraño en animales tras su implante (16).



**Figura 6.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la biodegradabilidad en agua y solución salina fisiológica (PBS) del PLGA a diferentes tiempos. Fuente: Gil-Castell, et al. *Polymer Testing*. 2018 (14).

Para analizar la biocompatibilidad, el grupo RETRACAR sembró fibroblastos humanos sobre el SKINHEALTEX PLGA, observando que crecían y proliferaban, así como una alta viabilidad celular tras 4 días (14). Los investigadores compararon la biocompatibilidad de SKINHEALTEX PLGA con otros 16 biovelos electrohilados diferentes, sembrando 40.000 células/cm<sup>2</sup> y cultivándolas 48 horas (15). Descartaron los biovelos en los que se observó células muertas en su superficie, así como los que presentaron comportamiento hidrófobo y los que fueron inconsistentes o quebradizos por dificultar su manipulación. Quedaron los biovelos a base de poli( $\epsilon$ -caprolactona), ácido poli-láctico, poli(3-hidroxibutirato), PLGA, poliamida, y seda. En estos seis biovelos, al sembrar células de pulpa dentaria y cultivarlas 96 horas las células proliferaron (15).

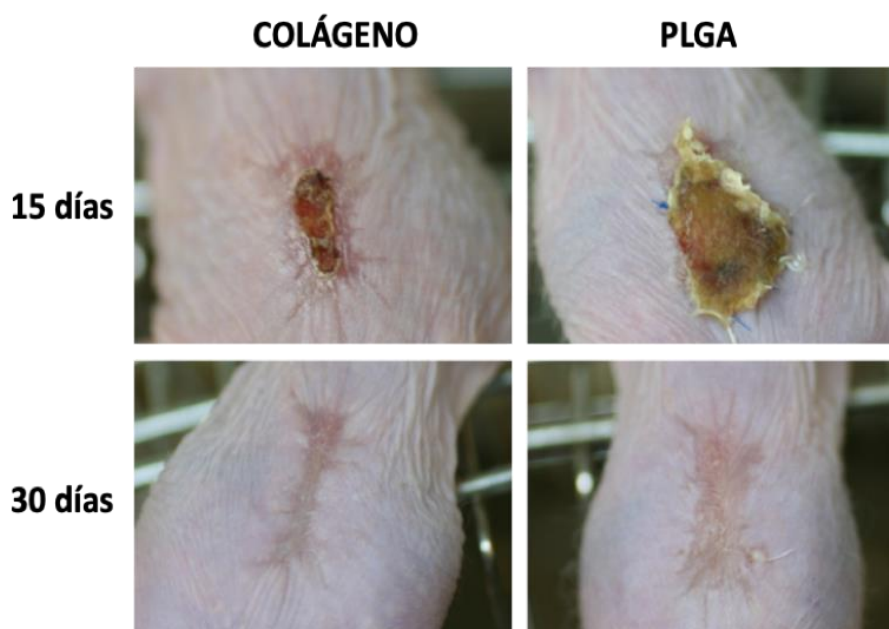
Para evaluar las propiedades pro- o antiinflamatorias de los biovelos, el mismo grupo investigador cultivó leucocitos humanos sobre ellos durante 5 horas y evaluó la expresión de citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (pro-inflamatorias, es el test inflamatorio recomendado por la FDA), e IL-10 (anti-inflamatoria). Los biovelos de PLGA, poli( $\epsilon$ -caprolactona), ácido poli-láctico y poliamida, mostraron un nivel más bajo de citoquinas pro-inflamatorias, y niveles de IL-10 similares al resto de biovelos, excepto el poli(3-hidroxibutirato) que se correlacionó con niveles de IL-10 mayores (15).

*In vivo*, los biovelos de PLGA y poli(3-hidroxibutirato) mostraron mayor biodegradabilidad y ausencia de encapsulamiento tras 2 semanas de su implantación en 10 ratas Wistar sanas, así como una mayor densidad vascular comparados con el resto de biovelos (15). Se observó por histología la degradación completa de SKINHEALTEX PLGA tras 30 días, y la ausencia de macrófagos con SKINHEALTEX PLGA, presentes en las ratas con poli(3-hidroxibutirato). Un análisis cuantitativo de los macrófagos M1 y M2 en el tejido dérmico de las ratas reveló que el implante de los biovelos de PLGA y poli(3-hidroxibutirato) desencadenó una respuesta anti-inflamatoria, es decir, indujeron un remodelado constructivo *in vivo* (15).

Tras realizar estudios de biocompatibilidad en ratones orientados hacia la reparación *cardíaca*, y obtener buenos resultados con los biovelos de poli(3-hidroxibutirato) y poli( $\epsilon$ -caprolactona), el grupo RETRACAR comparó biovelos de estos biomateriales con PLGA y colágeno para la regeneración *dérmica*. Se aislaron fibroblastos y queratinocitos de una biopsia de piel de individuos sanos y se cultivaron para formar un equivalente dérmico, al que se ponía el biovelo como base. En ensayos de viabilidad celular por Kit-8 de Conteo Celular se observó una alta viabilidad celular con PLGA y poli(3-hidroxibutirato) (15). Estos biovelos también permitieron un crecimiento fibroblástico óptimo y una correcta estratificación en la capa dérmica y epidérmica. Todo ello coincide con un estudio previo sobre un biovelo de PLGA- poli( $\epsilon$ -caprolactona) electrohilado que encontró mayor viabilidad celular, así como mayor proliferación y adherencia de células L-929 (fibroblastos murinos) cuanto mayor proporción de PLGA había en el biovelo (17). En estudios con otros biomateriales electrohilados también se ha observado un mantenimiento correcto de la estratificación de las células cultivadas en los biovelos (18,19).



Para investigar el comportamiento de SKINHEALTEX PLGA en quemaduras, se produjo un modelo realizando una lesión dérmica susceptible de injerto en 15 ratones inmunodeprimidos NOD/SCID (5 animales en el grupo control, 5 en el grupo con malla de colágeno, y 5 en el grupo SKINHEALTEX PLGA), bajo procedimiento anestésico siguiendo las normas básicas para el no sufrimiento de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Se xenotrasplantaron equivalentes dérmicos (cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos) sobre los biovelos de PLGA y poli(3-hidroxibutirato) a las lesiones de los ratones, observándose un buen prendimiento de los injertos con ambos biovelos. Un mes tras el xenotrasplante, el grupo de ratones con SKINHEALTEX PLGA presentaba crestas dermo-epidérmicas en formación, es decir, la cicatriz había madurado más rápido, y una densidad de vasos sanguíneos superior con SKINHEALTEX PLGA y biovelos de poli(3-hidroxibutirato) comparados con el grupo control (sin biovelo) y el de malla de colágeno, mostrando mayor capacidad angiogénica en los grupos de tratamiento (15). Adicionalmente, las cicatrices en el grupo con SKINHEALTEX PLGA eran más maduras y estaban menos retraídas que la del resto de grupos (Fig. 7).



**Figura 7.** Reepitelización de ratones NOD/SCID sometidos a una lesión transcutánea y tratados con un cultivo de piel expandida humana sobre una malla de colágeno o sobre un biovelo de PLGA. Fuente: Castellano Izquierdo D et al., 2018 (15).

Otros grupos investigadores han estudiado el uso de matrices a partir de los biomateriales descritos para la regeneración dérmica. Por ejemplo, en un estudio en un modelo murino se objetivó una mejora en el prendimiento de queratinocitos cultivados sobre una matriz de ácido poliglicólico, respecto al grupo sin matriz (20). Otro grupo investigador aplicó en otro modelo murino una matriz porosa de colágeno-quitosano con fibroblastos humanos, con curación de los defectos de espesor total (21). También se han obtenido resultados prometedores utilizando matrices electrohiladas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) con células dérmicas de rata (22). Sin embargo, los resultados descritos obtenidos por el grupo RETRACAR (alto grado de biocompatibilidad y capacidad de favorecer el prendimiento del injerto de piel cultivada por parte de los biovelos de SKINHEALTEX PLGA), la valoración macroscópica de las cicatrices resultantes y un análisis morfométrico utilizando la transformada de Fourier para analizar la orientación de las fibras de colágeno en los xenoinjertos, hizo que dicho grupo investigador concluyera que SKINHEALTEX PLGA era el mejor biovelo para la reconstrucción de piel de entre los estudiados. Ello motivó al grupo de investigación a explorar el comportamiento del biovelo SKINHEALTEX PLGA en un entorno clínico.

### 3.3 Justificación del estudio

Los autoinjertos de piel parcial son la principal cobertura para los pacientes con quemaduras, siendo un recurso de particular escasez cuando presentan quemaduras en altos porcentajes de su superficie corporal. Ello hace especialmente importante la utilización de métodos de aprovechamiento de los autoinjertos. Además, los autoinjertos dejan secuelas, mayores cuanto más dermis está dañada en la zona quemada y cuanto más fino sea el injerto aplicado, por lo que también es deseable investigar adyuvantes que actúen a nivel dérmico para mejorar dichas secuelas tanto funcionales como estéticas.

A nivel preclínico, el uso del biovelo SKINHEALTEX PLGA ha mostrado presentar potencial para estimular la regeneración dérmica a través del aumento del prendimiento de los injertos, disminución de la inflamación local, la inducción de la angiogénesis y la mejora en la calidad de la cicatriz. Por ello, es deseable investigar su desarrollo a nivel clínico y verificar su aplicabilidad en la práctica clínica.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 Hipótesis de trabajo**

Se postula que el uso del biovelo SKINHEALTEX PLGA será bien tolerado y mejorará el prendimiento de los autoinjertos de piel parcial, y la calidad de la cicatriz resultante de las quemaduras tratadas quirúrgicamente, en comparación con la técnica convencional (solo autoinjerto de piel parcial).

### **4.2 Objetivo principal**

El objetivo principal de este estudio fue comparar intra-individualmente la efectividad y tolerancia del biovelo SKINHEALTEX PLGA, utilizado junto con autoinjertos de piel parcial para el tratamiento de quemaduras desbridadas frente a autoinjertos de piel parcial solos.

### **4.3 Objetivos secundarios**

1. Comparar la calidad de la cicatriz tras tratamiento con SKINGEALTEX PLGA asociado a los autoinjertos de piel parcial, con los autoinjertos de piel parcial solos.
2. Caracterización del patrón de evolución del prendimiento de los autoinjertos de piel parcial con y sin SKINGEALTEX PLGA.



# MATERIAL Y MÉTODOS



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un ensayo clínico randomizado y controlado a doble ciego fase I-II en el que cada paciente actuaba como su propio control en la Unidad de Quemados del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia. El estudio se llevó a cabo entre noviembre de 2018 y septiembre de 2022.

### 5.1 Principios éticos y autorización

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, el 28 de marzo de 2018 (acta número 433). Se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre principios éticos para la investigación médica en sujetos humanos adoptada por la Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (1964), y complementarias. También en conformidad con la Directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20-10-99), Código de Ética y Deontología médicas vigente, y buenas prácticas clínicas según las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización. Su desarrollo como ensayo clínico ha sido autorizado por la AEMPS, y se cumplieron todos los requisitos normativos para las instituciones participantes.

El DL-PLGA en SKINHEALTEX PLGA es LACTEL® (Evonik Industries AG, Essen, Alemania), que tiene la aprobación de la FDA (*United States Food and Drug Administration*) y el certificado de análisis y la declaración firmada de fabricación bajo el cumplimiento del IPEC-PQG (*International Pharmaceutical Excipients Council-Pharmaceutical Quality Group*).

### 5.2 Participantes

Se realizó el reclutamiento y la selección de una muestra consecutiva de pacientes entre noviembre de 2018 y septiembre de 2021 (34 meses en total).

Los **criterios de inclusión** para entrar en el estudio eran:

1. Edad comprendida entre los 18 y los 70 años, en el momento de la firma del consentimiento.
2. Presencia de una quemadura profunda de espesor parcial (afectación de la dermis reticular pero no la hipodermis) susceptible de recibir tratamiento quirúrgico mediante un autoinjerto de piel parcial, con un tamaño mínimo de 50 cm<sup>2</sup> o dos zonas de iguales características de 25cm<sup>2</sup> cada una.
3. Superficie corporal total quemada comprendida entre un 1% y un 50%.
4. Firma voluntaria de los consentimientos informados por parte del paciente o a través de sus familiares, custodios o, cuando fuere necesario, representantes legales.
5. Disponibilidad por parte del paciente a acudir a visitas médicas los días señalados en el estudio para las curas, seguimiento a los 3, 6 y 12 meses, y recogida de documentación hasta la regeneración total de la quemadura.

Los pacientes, además, no podían ser incluidos en el estudio si se cumplían cualquiera de los siguientes **criterios de exclusión**:

1. Lesión cutánea por quemadura localizada en zonas de flexura, cara, cuello, manos o pies.
2. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
3. Presencia de una enfermedad cutánea crónica, activa o no, que podría afectar de forma negativa a la regeneración dérmica.
4. Presencia de cualquier enfermedad infecciosa aguda.
5. Presencia de cualquier enfermedad sistémica que pudiera empeorar el pronóstico si se produce algún efecto adverso; por ejemplo, pacientes con hipertensión severa, enfermedad grave, o diabetes mal controlada que presenten retinopatía o vasculopatía periférica. Las descompensaciones puntuales de la diabetes ligada al estrés inducido por la lesión o la cirugía no se consideraron criterio de exclusión.
6. Ser parte del equipo investigador: los investigadores, los colaboradores, el personal de enfermería, los trabajadores de la institución sanitaria, o cualquier otra persona directamente relacionada con el desarrollo del protocolo.



Los **criterios de retirada** de los pacientes del estudio fueron los siguientes:

1. Necesidad de segunda intervención por ausencia de prendimiento transcurridos 15 días ( $\pm 3$  días) tras la intervención.
2. Retirada de consentimiento por parte del paciente para su participación.

Se consideraron fracasos de selección los pacientes que fueron incluidos de forma inadecuada o que, tras haber firmado el consentimiento informado, abandonaron o fueron retirados antes de la intervención.

### **5.3 Aleatorización y enmascaramiento**

La elección de las zonas de estudio fue responsabilidad de la investigadora principal, en base a criterios de similar lecho, tamaño mínimo ( $50\text{cm}^2$  para una única zona o de  $25\text{cm}^2$  para dos zonas separadas), apariencia y profundidad tras haber desbridado la herida, con el fin de que fueran comparables. No era necesario que ambas zonas estuvieran una al lado de la otra, ya que no se han observado diferencias en el prendimiento estadísticamente significativas en ubicaciones diferentes (23). Sin embargo, con el fin de minimizar posibles sesgos en relación con las diferentes características anatómicas regionales, en la mayoría de los pacientes reclutados se seleccionaron las zonas adyacentes.

Tras la selección del área de estudio, se definió en cada paciente cuál era la zona A y cuál la zona B, identificándolas mediante rotulación en zona adyacente y documentándolo en el gráfico anatómico de registro. A continuación, se asignó el tratamiento a cada zona de forma aleatoria mediante una secuencia de aleatorización oculta y custodiada por el personal del Promotor (IIS La Fe). El día de la intervención de cada paciente, la investigadora principal se puso en contacto con el Promotor para asignar el tratamiento de cada zona de ese paciente. La zona asignada al grupo control fue tratada mediante el autoinjerto de piel parcial únicamente, mientras que la zona asignada al grupo tratamiento recibió el autoinjerto de piel parcial y SKINHEALTEX PLGA.

La asignación de tratamiento fue desconocida para los pacientes, los evaluadores y el resto del personal del estudio durante toda la duración de este, a excepción de la

investigadora principal y un investigador colaborador, quienes llevaron a cabo la intervención quirúrgica de los autoinjertos con y sin SKINHEALTEX PLGA. Para garantizar una evaluación imparcial con respecto al tipo de régimen terapéutico, la investigadora principal y el investigador colaborador que habían participado en la intervención, no realizaron ninguna evaluación postquirúrgica. Estas evaluaciones fueron realizadas por el resto de los investigadores colaboradores, desconocedores de la asignación de zonas.

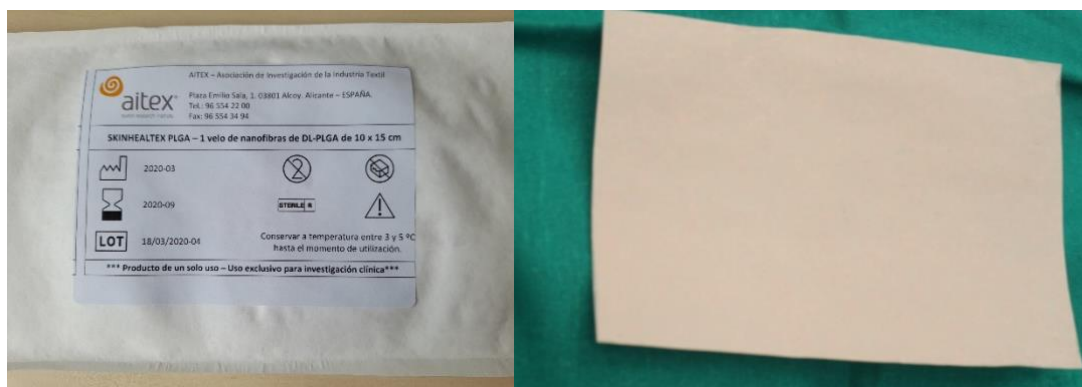
## **5.4 Descripción de la intervención**

El día en el que se realizó la indicación quirúrgica, el paciente recibió la visita de selección. En ella, se valoró su elegibilidad y se obtuvieron los consentimientos informados.

El día de la cirugía el paciente era sometido a intervención quirúrgica programada bajo anestesia general o locorregional, siguiendo el procedimiento habitual en cuanto a limpieza y desinfección del lecho quirúrgico y preparación de la zona donante. En la zona donante se extrajeron autoinjertos de piel parcial de 0,30mm (0,012 pulgadas) de grosor con dermatomo eléctrico, y se cubrió con un apósito estéril según el protocolo habitual. En la quemadura se realizó el desbridamiento, la hemostasia y la selección de las zonas de estudio bajo los criterios ya descritos (comparabilidad, superficie mínima, localizaciones permitidas). Tras la aleatorización de las áreas, se les asignó el tratamiento. Las áreas desbridadas que estaban fuera del estudio se trataron según el protocolo habitual.

En la zona control, el autoinjerto de piel fue extendido sobre el lecho asegurando el contacto íntimo entre el autoinjerto y la superficie desbridada, y fijado por medio de agrafes o de sutura trenzada reabsorbible.

Para la zona de tratamiento, AITEX suministró biovelos de SKINHEALTEX PLGA en un formato de  $7,0 \text{ g/m}^2 \pm 0,5$  y superficie de  $300 \text{ cm}^2$  (15 x 20 cm) (Fig. 8).

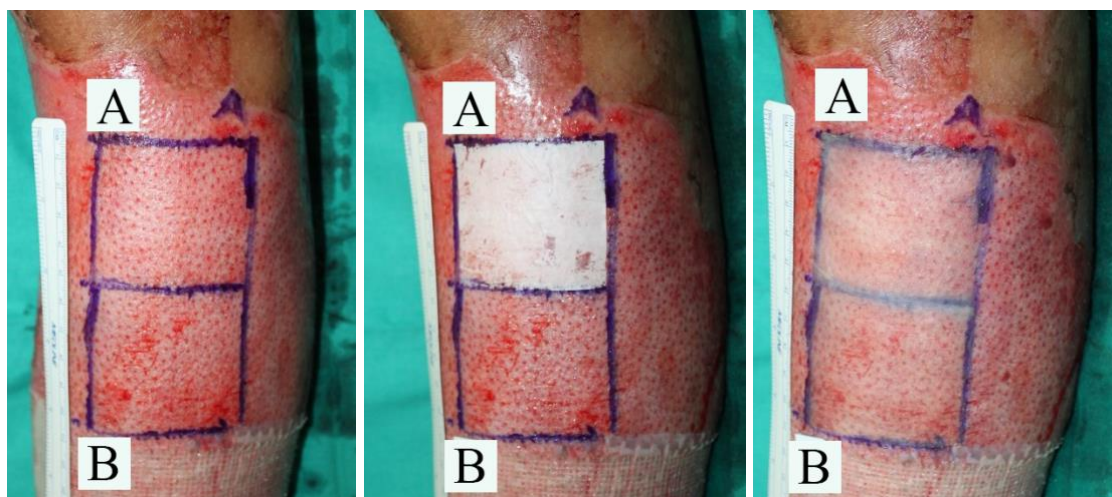


**Figura 8.** Biovelo de SKINHEALTEX PLGA. Fuente propia.

Los biovelos fueron extraídos de su bolsa hermética y cortado con tijeras bajo condiciones de esterilidad para adaptar su forma a la geometría de la lesión a tratar. A continuación, fueron separados del soporte de celulosa encerada para ser dispuestos sobre el lecho desbridado en contacto íntimo evitando las arrugas, los atrapamientos de aire o las dobleces del biovelo. Finalmente, se colocó el autoinjerto de piel de la misma forma que para la zona control.

Todos los biovelos se conservaron a baja temperatura (entre 2-6°C) y durante un periodo inferior a 6 meses para evitar la degradación prematura del material y conservar sus propiedades inalteradas hasta el momento de su utilización en el paciente.

Para comprobar que las zonas eran comparables, se tomaron fotografías del área quemada después del desbridamiento, tras el tratamiento con el biovelo (sobre las zonas a las que les correspondiera) y después del autoinjerto (Fig. 9).



**Figura 9.** Varón de 24 años con quemadura por llama en pierna izquierda. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

Finalmente, a todos los pacientes se les realizó la cura con apósito de gasa parafinada (Jelonet®, Smith+Nephew, Hull, Reino Unido) más gasas húmedas con suero fisiológico, y fueron vendados con compresas y crepé.

Durante el periodo de curas (días 2, 6, 10, 15  $\pm$  3 días; por motivos prácticos y para permitir evaluaciones adicionales se aceptó un período de ventana de 3 días), los investigadores del ensayo desconocedores de la asignación de tratamiento evaluaron el prendimiento de los autoinjertos. Los autoinjertos se curaron siempre mediante el procedimiento habitual con Jelonet® y Betadine® gel (Viatris, Canonsburg, Estados Unidos).

Los mismos investigadores evaluaron la calidad de la cicatriz 1, 3, 6 y 12 meses tras la intervención. Por razones prácticas para la programación de estas visitas, se consideró aceptable un período ventana de 14 días en los meses 3, 6 y 12, y una ventana de 3 días para la evaluación realizada al mes de la intervención.

En todas las visitas de seguimiento se realizaron fotografías de las dos zonas. Se evaluó la evolución de la cicatriz y la seguridad del tratamiento (aparición de eventos adversos).

Se realizaron revisiones trimestrales para examinar posibles desviaciones en el protocolo u otras incidencias.

## 5.5 Variables y fuentes de datos

### 5.5.1 Criterios de valoración principal

La efectividad del tratamiento se midió a través del porcentaje de autoinjerto prendido, con y sin SKINHEALTEX PLGA, por parte de un evaluador con soporte fotográfico. Estas evaluaciones comenzaron el día 0 (día de la cirugía) y continuaron durante el periodo de curas los días 2, 6, 10 y 15.

Se evaluó la tolerancia y la seguridad mediante la recogida de acontecimientos adversos en cada visita posterior a la aplicación del biovelo.

### 5.5.2 Criterios de valoración secundarios

Se recogieron los datos demográficos, incluido su fototipo según la clasificación de Fitzpatrick (24), los antecedentes médicos y la medicación de los pacientes.

Se evaluó la evolución de su estado general y el estado inflamatorio, el día de ingreso y un mes tras la cirugía, a través de datos analíticos en unidades internacionales:

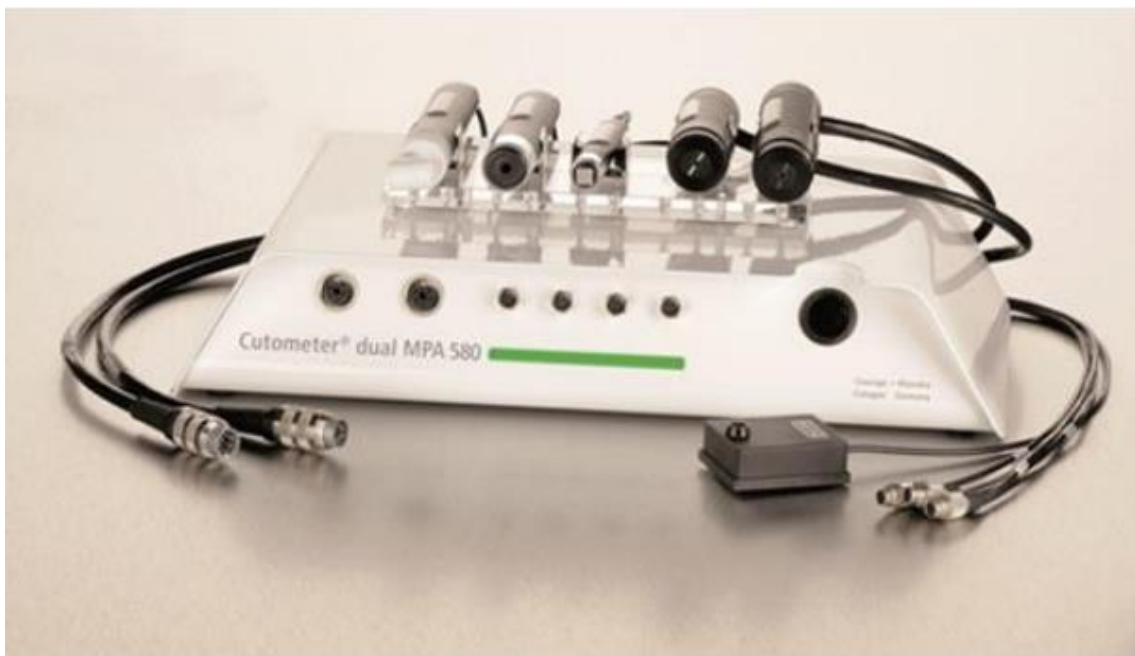
- Hemograma: hematíes, hemoglobina, hematocrito, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, plaquetas.
- Bioquímica: glucosa, urea, creatinina, filtrado glomerular, colesterol total, triglicéridos, bilirrubina total, AST/GOT, ALT/GPT, proteínas totales, albúmina, prealbúmina, transferrina, proteína C reactiva, hierro, cloro, sodio, potasio.
- Hemostasia: tiempo protrombina, índice de Quick, INR, tiempo tromboplastina parcial activada, fibrinógeno derivado.
- Serología infecciosa: hepatitis B y C, virus de la inmunodeficiencia humana.
- Test de embarazo en mujeres en edad fértil.

La calidad de la cicatriz, es decir, el resultado estético y funcional de la intervención, fue evaluado al 1, 3, 6 y 12 meses de la cirugía mediante:

- Escala de Vancouver para cicatrices (25), con la que los investigadores cuantificaron la pigmentación, la vascularidad, la elasticidad y la altura/grosor de

la cicatriz. Una mayor puntuación refleja una cicatriz de peor calidad, siendo 0 el mínimo y 18 el máximo (tabla 1).

- Escala del Observador y Paciente para Evaluación de Cicatrices (POSAS) (26), que combina dos escalas, una está realizada por los investigadores y la otra por parte de los pacientes. En ambas se valoran seis variables con una puntuación de 1 a 10. La valoración del paciente incluye: dolor, picor, color, rigidez, irregularidad y grosor. Una menor puntuación es indicativa de que la cicatriz es equivalente a la piel normal, mientras que una mayor puntuación refleja una cicatriz de peor calidad, siendo 12 el mínimo y 120 el máximo (tabla 2).
- Medida de la elasticidad mediante Cutometer® Dual MPA 580 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Colonia, Alemania) (Fig. 10). Este aparato mide la elasticidad cutánea midiendo el grado de deformación de la piel (cicatricial o normal) tras la aplicación de presión negativa. Se compara siempre la zona de estudio con una zona de piel normal o no afecta para cada paciente, que actúa como referencia, pues la piel normal de cada persona tiene un valor de elasticidad basal diferente, que además se ve afectado por factores como la edad o la etnia.



**Figura 10.** Cutometer® Dual MPA 580 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Colonia, Alemania). Fuente: Manual de instrucciones de Courage+Khazaka electronic GmbH.

Valor	Pigmentación
0	Color normal (parecido a piel cercana)
1	Hipopigmentada
2	Hiperpigmentada
Valor	Vascularidad
0	Normal
1	Rosa (flexible con mínima resistencia)
2	Roja (aumento significativo en el riego sanguíneo local)
3	Morada (excesivo riego sanguíneo local)
Valor	Elasticidad, bandas (bridas, no limitan grado de movimiento)
0	Normal
1	Flexible
2	Cede
3	Firme
4	Adherencia
5	Contractura
Valor	Altura/Grosor
0	Normal
1	<2 mm
2	2-5 mm
3	>5 mm

**Tabla 1.** La escala de Vancouver para cicatrices. El investigador adjudica una puntuación a cada una de las 4 variables y se suma la puntuación de los apartados, dando lugar a una puntuación total entre los 0 y los 18 puntos. A menor puntuación, mayor calidad de la cicatriz. Fuente: Sullivan et al., 1990 (25).

COMPONENTE PARA EL OBSERVADOR												
Piel normal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Peor cicatriz imaginable	
Vascularización												
Pigmentación												
Grosor												
Relieve												
Elasticidad												
Área de cicatriz vs. herida inicial												
COMPONENTE PARA EL PACIENTE												
No, sin síntomas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Peor síntoma posible	
¿La cicatriz duele?												
¿La cicatriz pica?												
No, como la piel normal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Sí, muy diferente	
¿Es el color de la cicatriz diferente?												
¿Es la cicatriz más rígida?												
¿Es el grosor de la cicatriz diferente?												
¿Es la cicatriz irregular?												

**Tabla 2.** Escala POSAS. El observador y el paciente adjudican cada uno una puntuación del 1 al 10, correspondiendo el 1 a las características iguales o casi a la piel normal y el 10 a la peor cicatriz imaginable (38). Se suman las puntuaciones de todos los apartados, dando lugar a una puntuación entre 12 (cicatriz de mayor calidad) a 120 (peor cicatriz). Fuente: van der Kar et al., 2005 (38).



La tabla 3 refleja el cronograma de la investigación, con las variables recogidas en cada momento.

CRONOGRAMA DEL ESTUDIO							
Procedimiento	Selección	Día 0	Días 2, 6, 10, 15	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Consentimientos informados	+						
Criterios de inclusión y exclusión	+	+					
Antecedentes médicos	+	+					
Medicación concomitante	+	+	+				
Datos demográficos	+						
Datos clínicos de la quemadura	+						
Análítica	+			+			
Test de embarazo	+						
Aleatorización		+					
Cirugía		+					
Fotografía		+	+				
Aplicación del tratamiento		+					
Evaluación de la eficacia			+				
Evaluación seguridad			+	+	+	+	+
Escala Vancouver				+	+	+	+
Escala POSAS				+	+	+	+
Medida elasticidad				+	+	+	+

**Tabla 3.** Cronograma del estudio. Fuente: propia.

## 5.6 Tamaño muestral y métodos estadísticos

Asumiendo una diferencia media a los 15 días en el porcentaje de prendimiento entre las zonas tratada y control de cada paciente del 5%, y estableciendo el nivel de significación en  $\alpha=0.05$ , se estimó que con 30 pacientes se obtendría una potencia estadística superior al 80%.

Los datos se resumieron mediante la media (y desviación típica) y mediana (y 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> cuartil) en el caso de variables continuas, y mediante frecuencias relativas y absolutas en el caso de variables categóricas.

Para evaluar la proporción de injertos que habían prendido en cada cura entre grupos (control y tratamiento) se construyó un modelo de supervivencia. Este modelo persigue estimar la probabilidad de que un injerto prenda al 100% en cada momento en el tiempo, y las compara entre los grupos de estudio para identificar posibles diferencias.

Para contrastar la eficacia de SKINHEALTEX PLGA respecto al tratamiento habitual, se ajustaron modelos mixtos de regresión de percentiles a la mediana mediante inferencia bayesiana. Estos modelos persiguen predecir la probabilidad de prendimiento de un injerto en cada cura según si se hubiera interpuesto SKINHEALTEX PLGA entre el autoinjerto y su lecho o no, y detectar si hay diferencias entre ambas probabilidades (es decir, si los injertos sobre SKINHEALTEX PLGA prendieron mejor, peor, o igual que los autoinjertos colocados directamente sobre el lecho). En todos los modelos se incluyeron *splines* lineales para mejorar su ajuste y permitir relaciones complejas. El término *spline* hace referencia a una amplia clase de funciones definidas a trozos mediante polinomios, que son utilizadas en aplicaciones que requieren la interpolación de datos o un suavizado de curvas (ajuste de curvas de formas complicadas). Es decir, se crea un polinomio diferente para cada porción de la curva y se combinan todos a través del *spline*, dando lugar a una función compleja que origine la curva compleja.

El contraste específico de la eficacia de SKINHEALTEX PLGA en cada modelo se realizó incluyendo una interacción entre la variable tiempo y la variable tratamiento, observando si la evolución a lo largo del tiempo era diferente en la zona control y la zona tratamiento de cada paciente. Es decir, se comparó la probabilidad de prendimiento de los injertos en cada momento del tiempo con o sin SKINHEALTEX PLGA, para observar si

había diferencias en el prendimiento de los injertos con SKINHEALTEX PLGA y los injertos colocados directamente sobre el lecho.

Todos los análisis se realizaron con el software R (versión 3.4.3, R Core Team, Auckland, Nueva Zelanda) y los paquetes de R brms (versión 2.17.0, R Core Team, Auckland, Nueva Zelanda) y clickR (versión 0.8.1, R Core Team, Auckland, Nueva Zelanda). Se consideraron estadísticamente significativos p valores  $< 0.05$ .

## **5.7 Otros aspectos éticos**

### *5.7.1 Consentimientos informados*

En la visita de selección se facilitó la información previa a los consentimientos informados, tanto el consentimiento informado para participar en el ensayo clínico como para la toma de fotografías, con la antelación suficiente para que el paciente tuviera tiempo para reflexionar, hacer todas las preguntas necesarias, resolver sus dudas y tomar una decisión. En ningún caso se dio información al paciente cuando estaba bajo los efectos de la sedación, ni con sus facultades mentales alteradas, ni tampoco cuando se encontraba ya dentro del quirófano. El paciente firmó un total de cuatro documentos. La investigadora principal proporcionó los dos formularios de consentimiento informado firmados a cada paciente, y se conservaron los otros dos, en el archivo del estudio.

### *5.7.2 Acontecimientos adversos*

Se recogieron todos los acontecimientos adversos, tanto relacionados como no relacionados con el producto, desde que el paciente otorgó su consentimiento para participar en el estudio hasta la finalización de su periodo de seguimiento a los 12 meses. Se consideró un acontecimiento adverso cualquier evento clínico que sufría un paciente. Todos los acontecimientos adversos fueron clasificados por un investigador del estudio en base a los siguientes criterios:

- Intensidad: leve, moderado, intenso.
- Causalidad/relación con el producto: relacionado, no relacionado o posiblemente relacionado con el producto. En caso de desconocer la causalidad, a efectos de

notificación el acontecimiento adverso se consideró relacionado con el producto en estudio.

- Gravedad: se consideró grave si el acontecimiento resultó en la muerte del paciente o un empeoramiento grave en el estado de salud de un sujeto que generó un deterioro permanente de una estructura o función corporales, o dio lugar a una intervención médica o quirúrgica para impedir dicho deterioro, o exigió la hospitalización del paciente o la prolongación de la hospitalización existente, o se produjo una amenaza para la vida (riesgo inminente de muerte).
- Esperabilidad: esperado o inesperado.

Los investigadores fueron los responsables de notificar la incidencia de cada evento adverso al Promotor para su análisis, en un plazo máximo de 24 horas a partir del conocimiento del incidente en caso de acontecimientos adversos graves, y mediante el Formulario de Notificación propio del Promotor según la legislación vigente. La Unidad de Farmacovigilancia del Promotor ha elaborado anualmente un informe de seguridad del ensayo que ha remitido a la AEMPS y al Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos.

Los investigadores fueron los responsables del seguimiento del acontecimiento adverso hasta la resolución del evento (normalización o estabilidad del cambio) y de todas las consultas relacionadas con dicho acontecimiento, notificando durante el transcurso al Promotor. Se registró y notificó cualquier tratamiento requerido y el desenlace, teniendo en cuenta las siguientes categorías:

- Recuperado sin secuelas: totalmente recuperado, hasta el nivel observado previo al acontecimiento.
- Recuperado con secuelas: el acontecimiento adverso causó al paciente una discapacidad y/o incapacidad persistente y significativa.
- Mejorado, pero aún no recuperado.
- Todavía en curso (no recuperado).
- Muerte.
- Desconocido.

El Promotor podía interrumpir el protocolo en cualquier momento, por motivos como una incidencia inaceptable de acontecimientos adversos.

# RESULTADOS



## 6. RESULTADOS

Ningún paciente del ensayo fue excluido, ni hubo fallos en la selección. Sin embargo, ante la situación epidemiológica creada por la pandemia del virus SARS-CoV-2, el número final de pacientes incluidos fue 26 (tabla 4). La mayoría (18/26, 69,2%) eran varones, siendo la edad media de 48,8 años. El 92% de los pacientes eran caucásicos (24/26, 92,31%), siendo únicamente dos (7,69%) de origen hispánico. Aproximadamente un tercio de los pacientes (8/26, 30,77%) eran fumadores.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES				
Variable	Media $\pm$ dt	Mediana (p25; p75)	Mín	Máx
Edad (años)	48,78 $\pm$ 15,40	47,93 (38,45; 62,62)	20,1	79,1
Peso (kilogramos)	74,27 $\pm$ 13,63	71,50 (65,00; 81,75)	50,0	106,0
Altura (cm)	171,04 $\pm$ 10,45	168,5 (165,50; 175,75)	156,0	201,0
Superficie corporal total (m <sup>2</sup> )	1,87 $\pm$ 0,20	1,86 (1,74; 1,95)	1,5	2,4
SCQ (%)	14,60 $\pm$ 10,38	12,00 (7,25; 20,75)	1,5	40,0

**Tabla 4.** Características de los pacientes de la muestra.

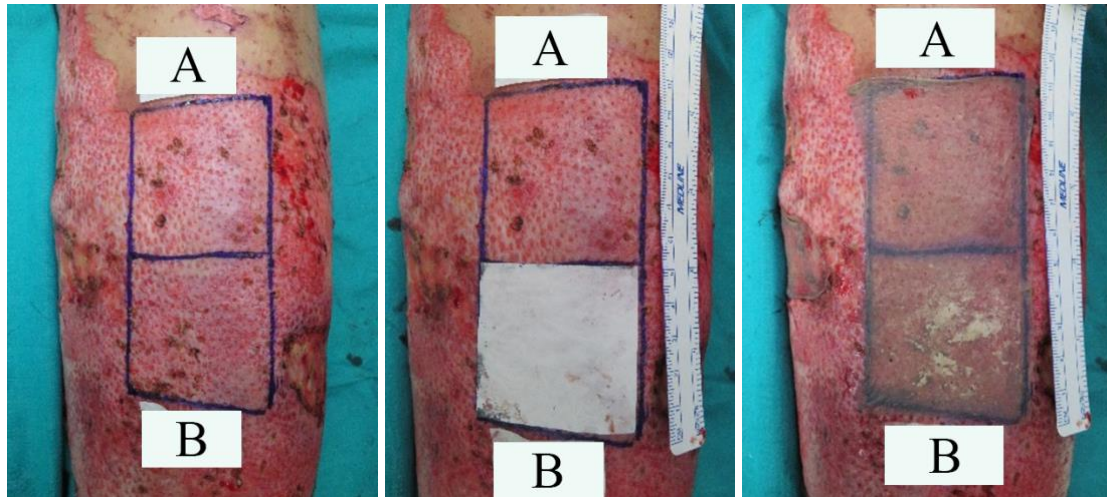
MECANISMOS DE QUEMADURA	
Mecanismo	n (%)
Llama	17 (65,4)
Escaldadura	4 (15,4)
Química	3 (11,5)
Contacto	1 (3,9)
Dermoabrasión	1 (3,9)

**Tabla 5.** Mecanismos de quemadura en la muestra estudiada.

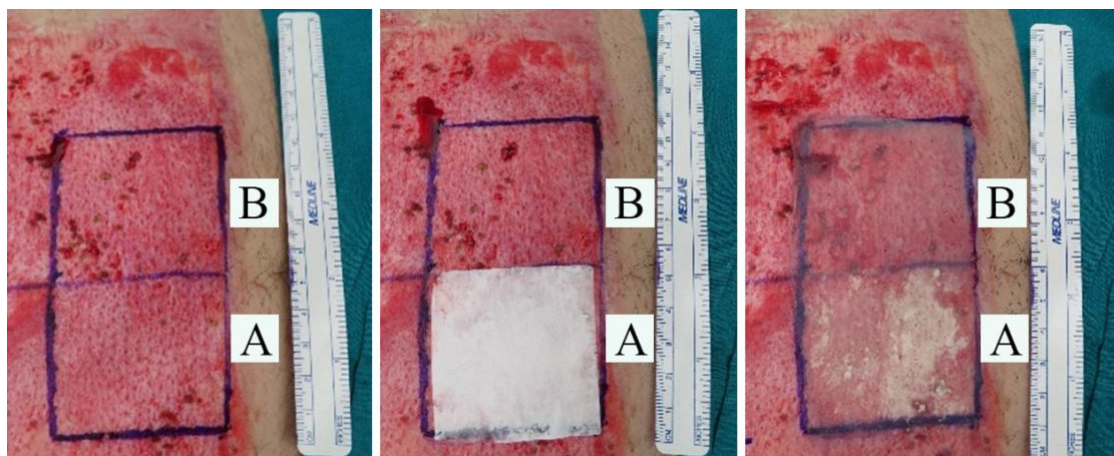
La mayoría de los pacientes presentaron pieles medias en la clasificación de Fitzpatrick: 3 pacientes (11,54%) tenían piel tipo II, 16 pacientes (61,54%) tenían piel tipo III, y 7 pacientes (26,92%) tenían piel de tipo IV. El mecanismo principal de la quemadura fue la llama (Tabla 5).

## 6.1 Efectividad del tratamiento

El día de la cirugía se aplicó el tratamiento aleatorizado según el protocolo descrito en el apartado 8.4 (Descripción de la intervención) (Figs. 11-16).

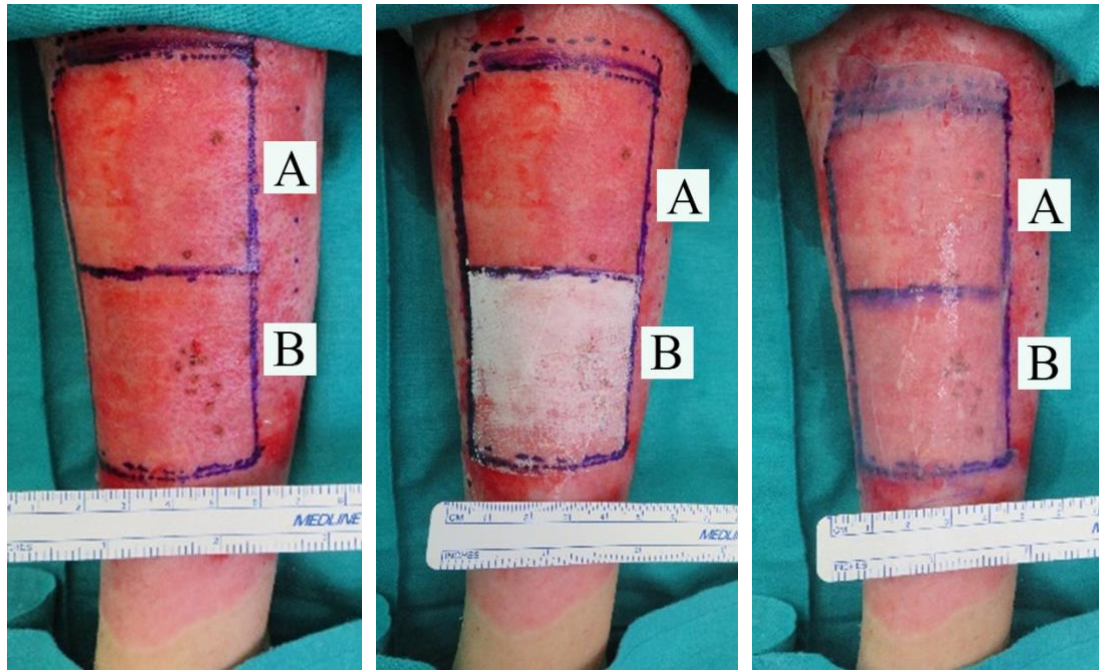


**Figura 11.** Varón de 49 años con quemadura por llama en la pierna izquierda. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

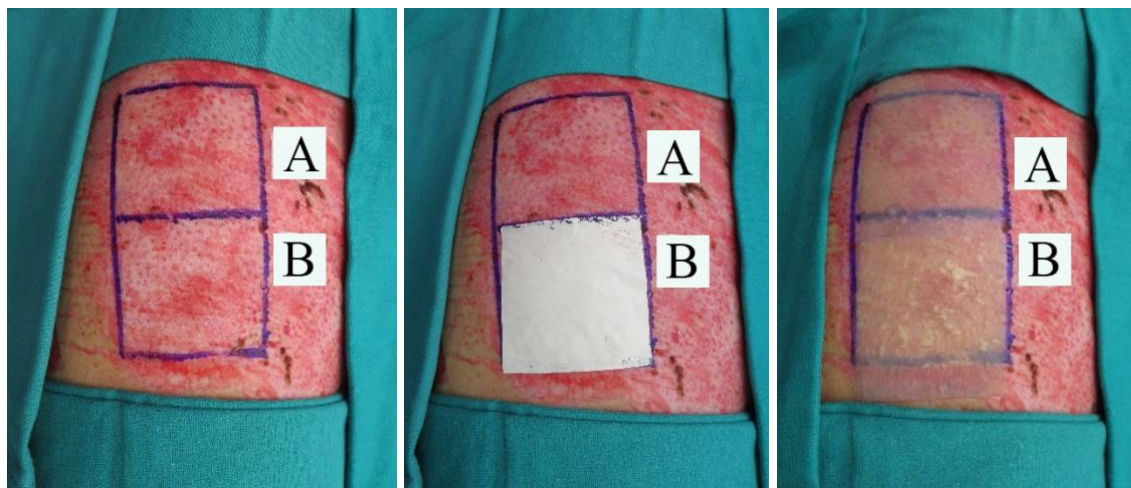


**Figura 12.** Varón de 43 años con quemadura por llama en el abdomen. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

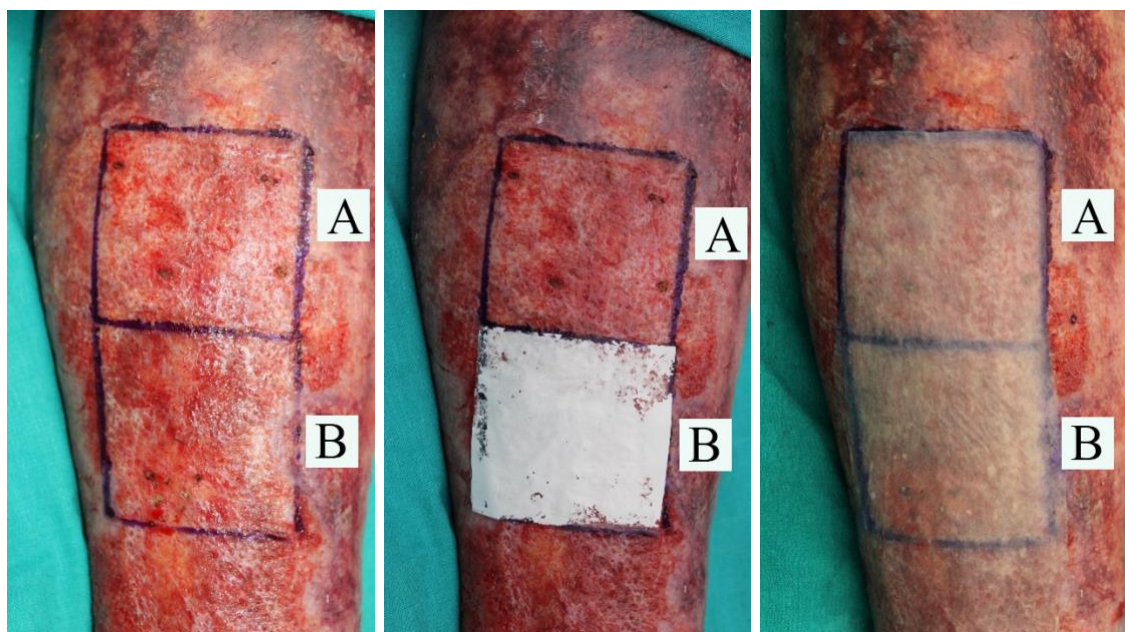




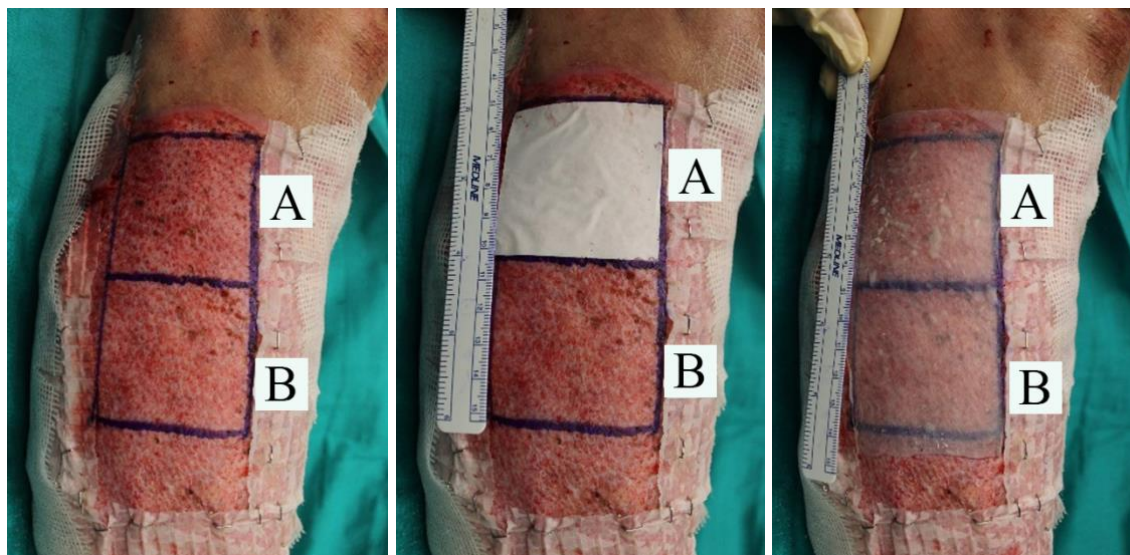
**Figura 13.** Mujer de 53 años con quemadura por escaldadura en el antebrazo izquierdo. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.



**Figura 14.** Varón de 44 años con quemadura por llama en el muslo derecho. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.



**Figura 15.** Varón de 45 años con quemadura por llama en la pierna derecha. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.



**Figura 16.** Varón de 63 años con quemadura por llama en la pierna derecha. Izquierda: aspecto del lecho tras el desbridamiento quirúrgico. Centro: aspecto de las áreas de estudio tras aleatorización. Derecha: áreas de estudio tras colocación de autoinjertos de piel parcial.

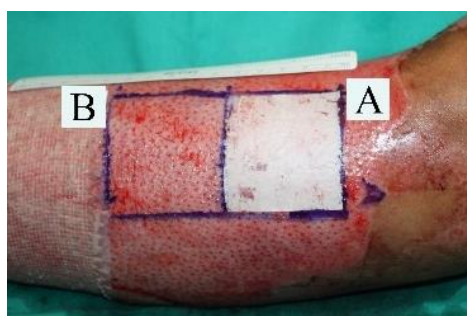


El prendimiento a lo largo de los primeros 15 días fue de entre el 90% y el 100% (Tabla 4, Figs. 17-22). En el grupo tratamiento el prendimiento fue ligeramente menor en la primera semana (días 2 y 6), ligeramente mayor en el día 10, e igual en el día 15. Todos los pacientes alcanzaron un prendimiento del 100% en sus dos zonas de estudio 15 días tras la cirugía.

EVOLUCIÓN DEL PRENDIMIENTO				
Injerto prendido durante el postoperatorio (media % $\pm$ dt)				
Grupo	Día 2	Día 6	Día 10	Día 15
Control	93,1 $\pm$ 11,8	97,2 $\pm$ 6,7	97,9 $\pm$ 7,0	100,0 $\pm$ 0,0
Tratamiento	89,2 $\pm$ 18,7	96,3 $\pm$ 6,7	99,0 $\pm$ 2,5	100,0 $\pm$ 0,0

**Tabla 6.** Evolución del prendimiento de autoinjertos de piel parcial durante los primeros 15 días (periodo de curas), por grupos de estudio.

Día 0  
(cirugía)

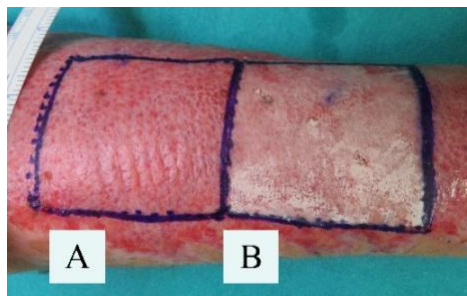


Día 2

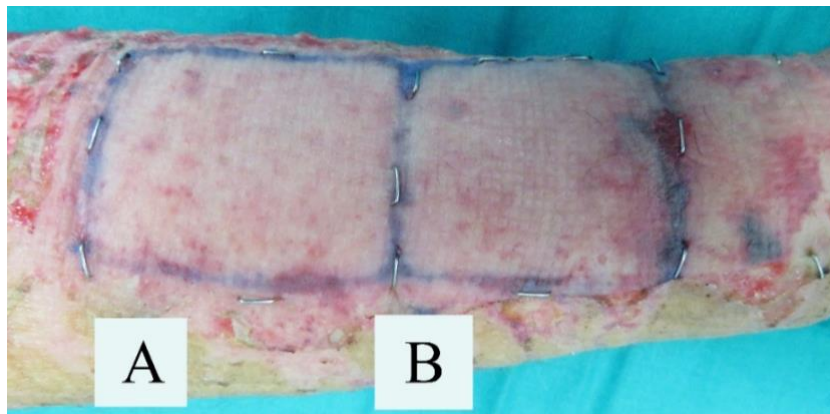


**Figura 17.** Varón de 24 años con quemadura por llama en la pierna izquierda. Aspecto de las áreas del estudio el día de la cirugía y en la cura el día 2, en el cual el prendimiento fue completo.

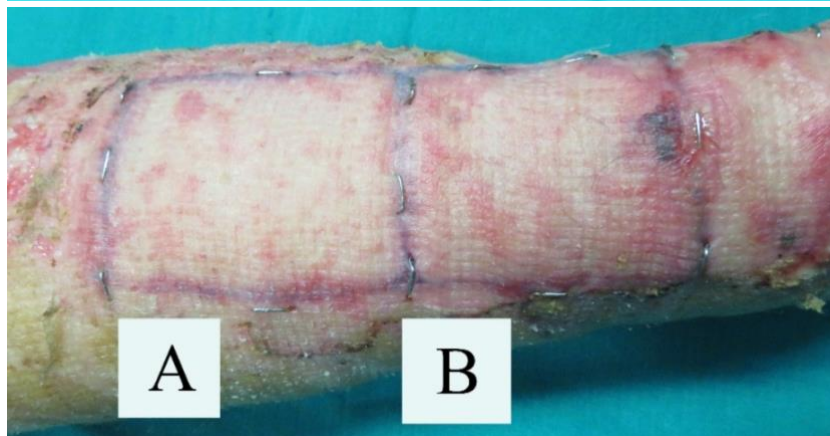
*Día 0  
(cirugía)*



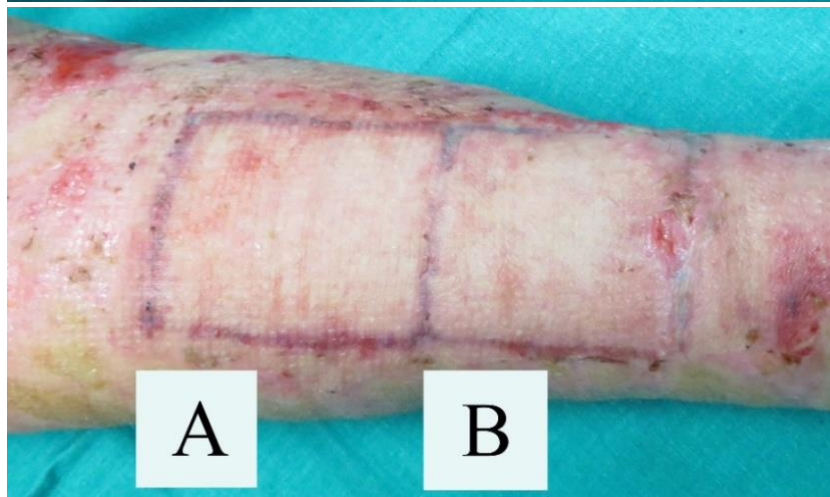
*Día 2*



*Día 6*



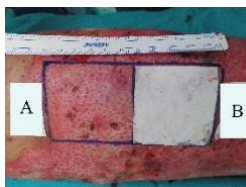
*Día 10*



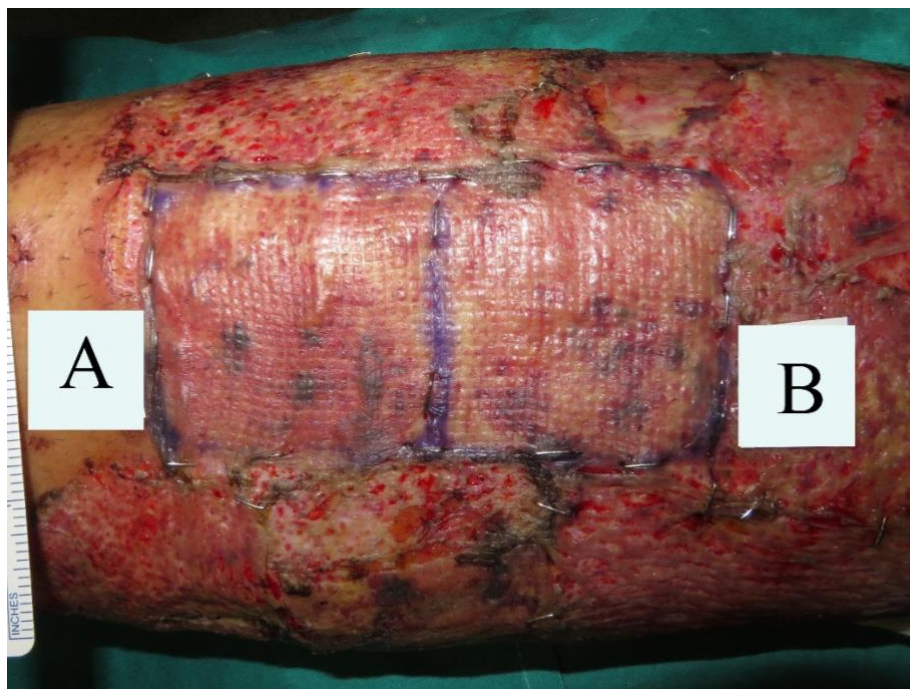
**Figura 18.** Mujer de 66 años con quemadura química en antebrazo derecho. Aspecto de las áreas de estudio el día de la cirugía y en las curas del día 2, día 6 y 10, en el cual el prendimiento fue completo.



*Día 0  
(cirugía)*



*Día 2*

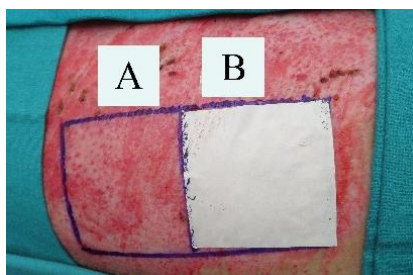


*Día 6*

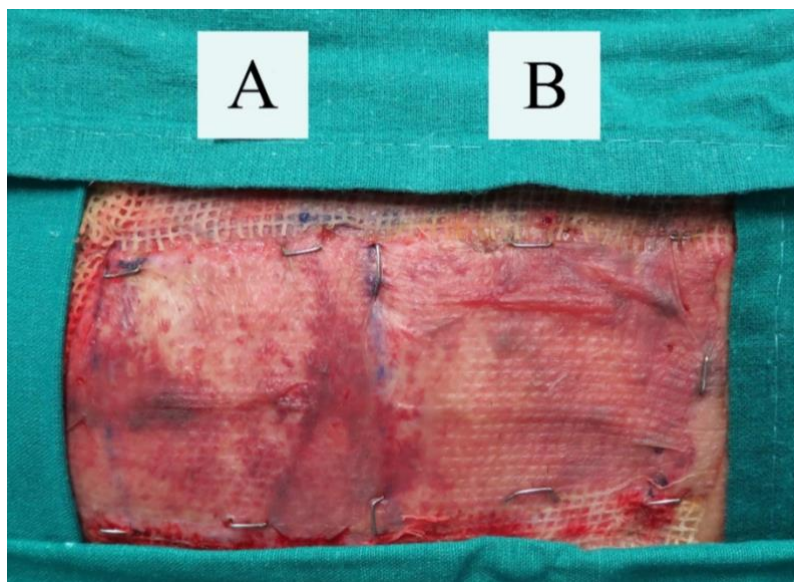


**Figura 19.** Aspecto de las áreas de estudio del paciente de la figura 11 el día de la cirugía y en las curas del día 2 y día 6, en el cual el prendimiento fue completo.

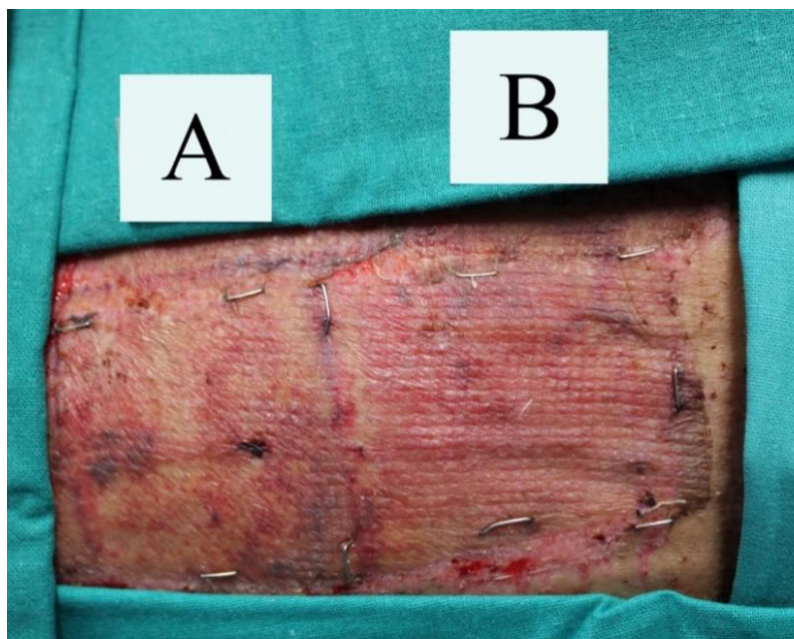
*Día 0  
(cirugía)*



*Día 2*



*Día 6*



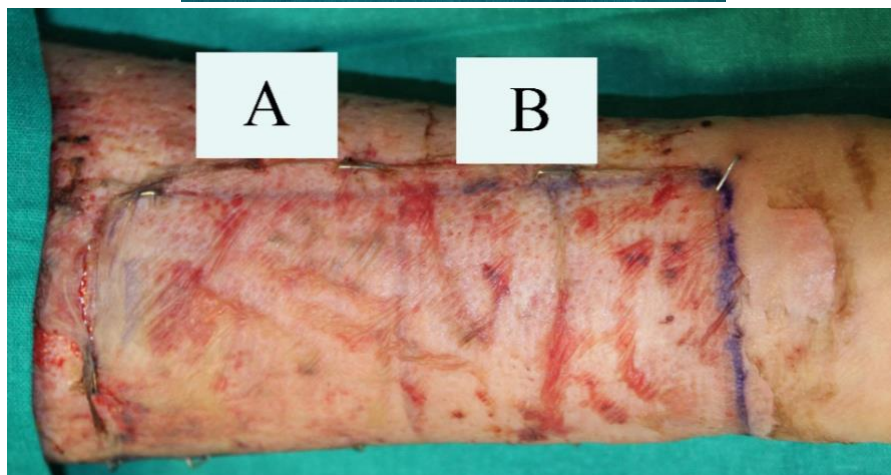
**Figura 20.** Aspecto de las áreas de estudio del paciente de la figura 14 el día de la cirugía y en las curas del día 2 y día 6, en el cual el prendimiento fue completo.



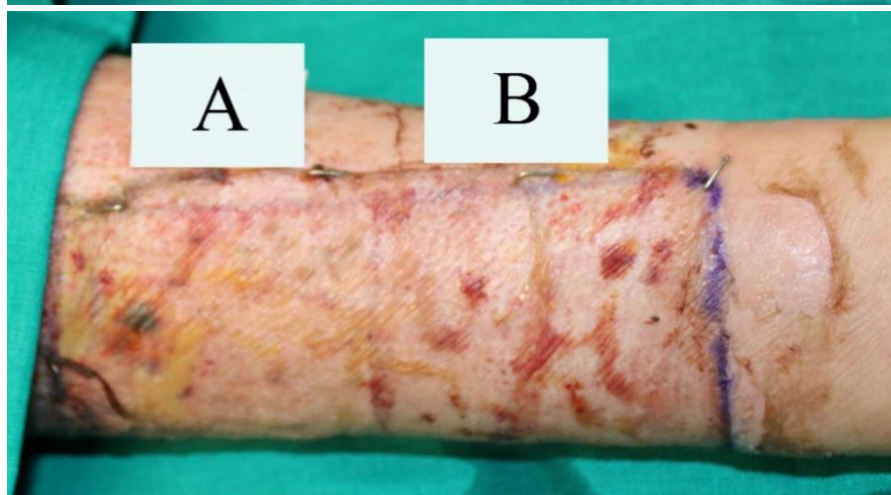
*Día 0  
(cirugía)*



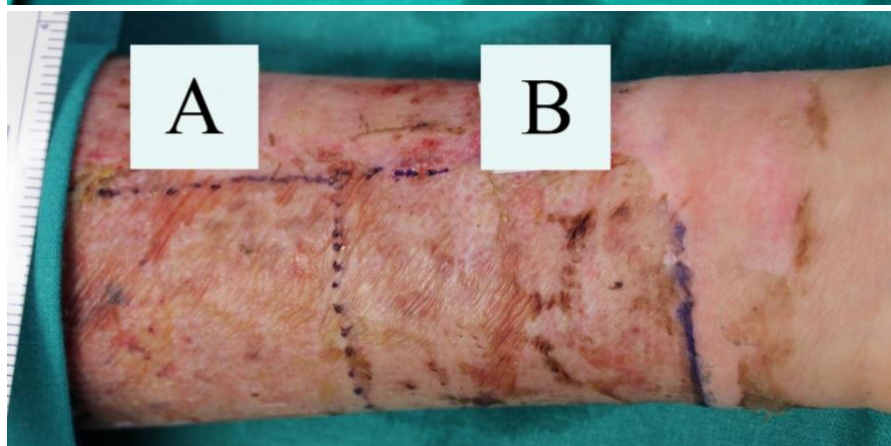
*Día 2*



*Día 6*

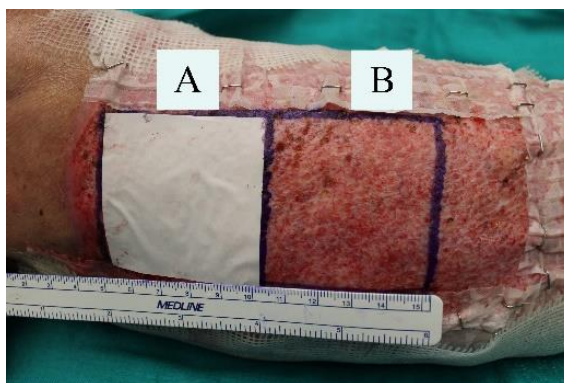


*Día 10*

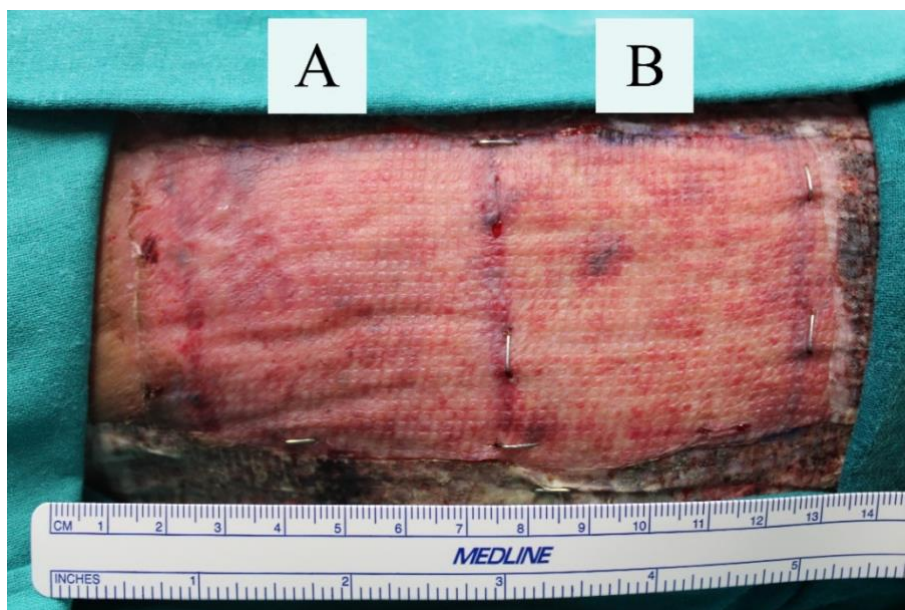


**Figura 21.** Mujer de 31 años con quemadura por llama en antebrazo izquierdo. Aspecto de las áreas de estudio el día de la cirugía y en las curas del día 2, día 6 y 10, en el cual el prendimiento fue completo.

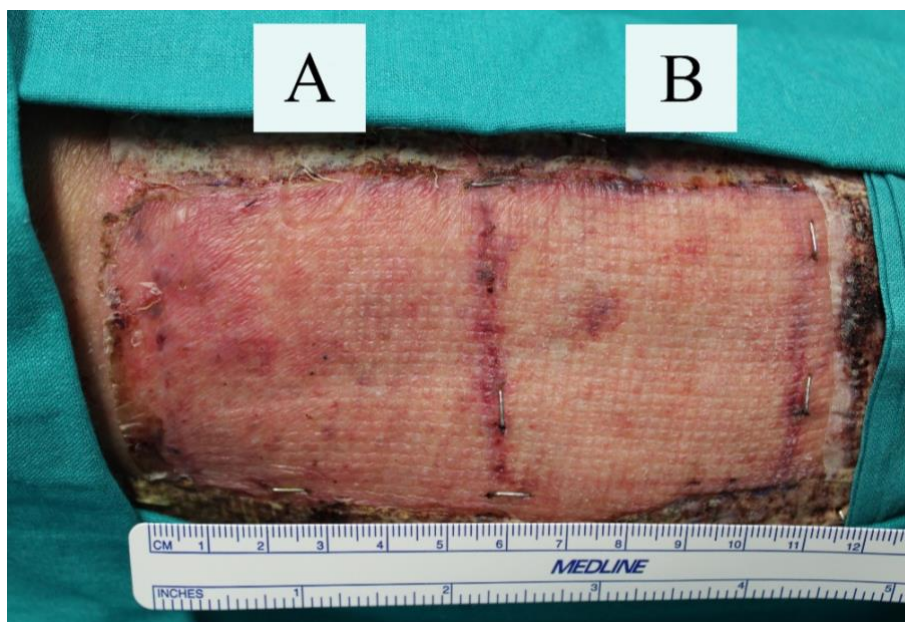
*Día 0  
(cirugía)*



*Día 2*



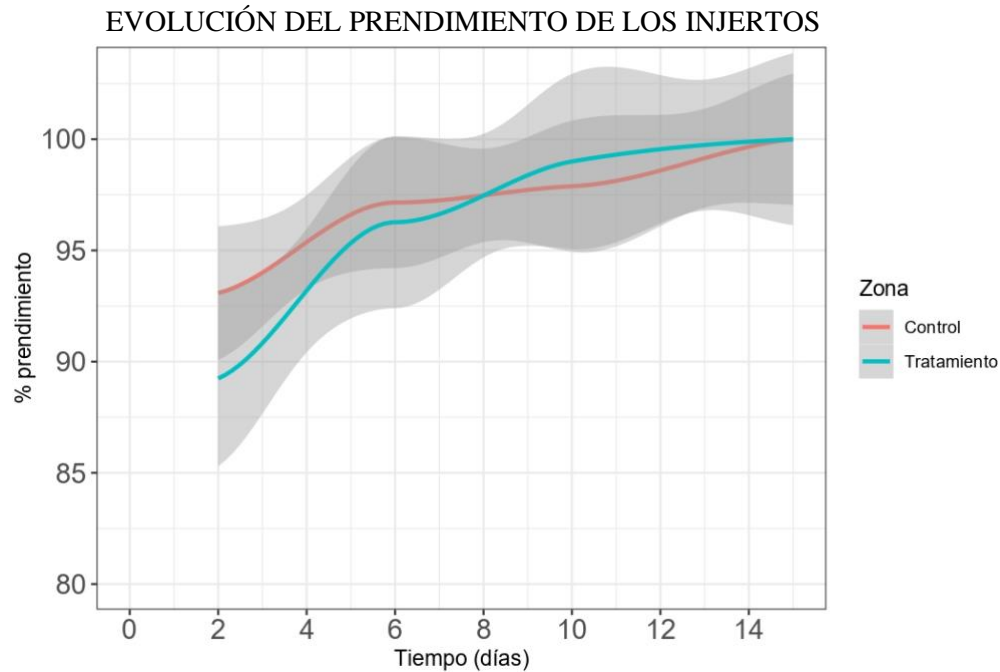
*Día 6*



**Figura 22.** Aspecto de las áreas de estudio del paciente de la figura 16 el día de la cirugía y en las curas del día 2 y día 6, en el cual el prendimiento fue completo.

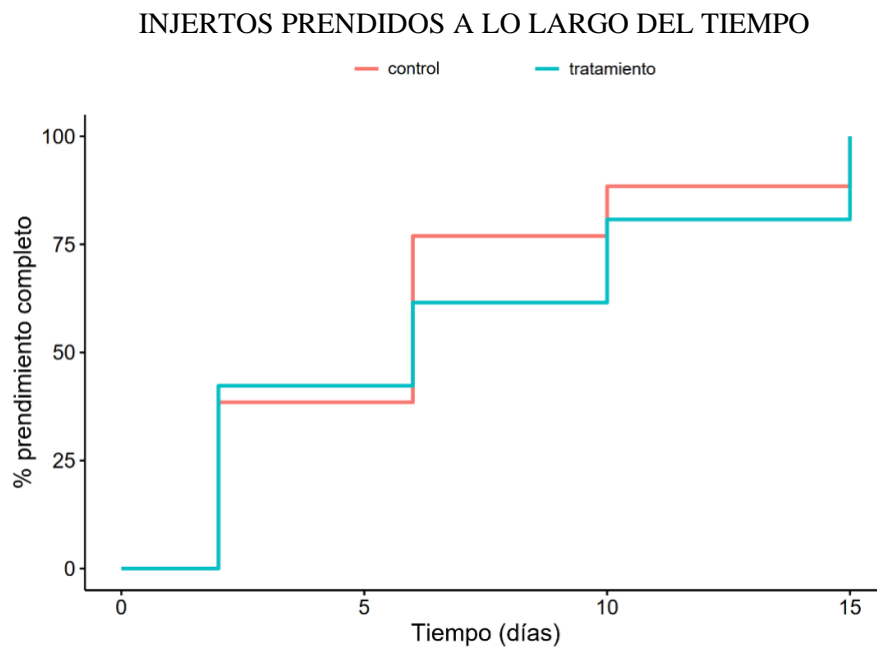


No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evolución del prendimiento de los autoinjertos entre grupos (Fig. 23).



**Figura 23.** Evolución del prendimiento a lo largo de los primeros 15 días. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo de confianza al 95%.

Se construyó un modelo de supervivencia ajustado para evaluar la proporción de los injertos que habían prendido en cada momento de la evaluación (Fig. 24).



**Figura 24.** Gráfica de eventos acumulados para el prendimiento completo durante los primeros 15 días.

En ambos grupos el 50% de los autoinjertos había prendido a los 6 días y el 100% a los 15 días, habiendo un cociente de riesgo similar (0,80, IC 95% 0,44 – 1,46) (Tabla 7). Es decir, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que tardaron los injertos en prender totalmente entre los dos grupos de estudio.

<b>MODELO DE SUPERVIVENCIA (PRENDIMIENTO COMPLETO)</b>			
<b>Variab</b> les	<b>Valor ± error típico</b>	<b>Cociente de riesgo</b>	<b>IC 95%</b>
Intercepto	2,59 ± 0,55	13,31	4,86 – 41,01
Grupo tratamiento	-0,22 ± 0,31	0,80	0,44 – 1,46
Error típico identificación	1,65 ± 0,40	-	0,98 – 2,54
Criterio de información de Watanabe-Akaike	189,00 ± 17,26		

**Tabla 7.** Modelo de supervivencia para el análisis del tiempo hasta el prendimiento completo.

## 6.2 Eventos adversos

Ninguno de los 26 pacientes presentó acontecimientos adversos relacionados con el biovelo SKINHEALTEX PLGA.

Hubo cuatro pacientes que presentaron acontecimientos adversos no relacionados con el producto. En dos de ellos, se trató de acontecimientos adversos leves, con recuperación completa sin secuelas: dolor muscular glúteo y urticaria inespecífica idiopática no relacionada con el producto.

Los otros dos fueron acontecimientos adversos graves. En un caso, el paciente necesitó una reintervención de otras zonas de la quemadura ajenas al estudio, precisando para ello un nuevo ingreso hospitalario (evento adverso de intensidad moderada) pero recuperándose de forma completa y sin secuelas. El otro paciente presentó un acontecimiento adverso grave e intenso no relacionado con el biovelo al debutar con una hemorragia digestiva aguda alta e ingresar por ello en la Unidad de Cuidados Intensivos. También se recuperó completamente y sin secuelas.

## 6.3 Evolución analítica

Los pacientes tuvieron una buena evolución de su estado analítico (Tabla 8):

- Aumento la serie roja (hematíes, hematocrito, hemoglobina, hierro), recuperándose los pacientes que habían presentado anemia postoperatoria de la misma.
- Disminuyeron los parámetros inflamatorios (proteína C reactiva, plaquetas).
- Se mantuvo estable la función renal (filtrado glomerular, creatinina, urea) y hepática (transaminasas, bilirrubina).
- Los pacientes recuperaron los niveles de colesterol, disminuidos inicialmente por consumo (componente de la membrana plasmática) y se mantuvieron estables los triglicéridos (cuyo aumento está relacionado con el desarrollo de complicaciones).
- Se mantuvo el equilibrio hidroelectrolítico (iones) y hemostasia.
- Mejoraron los niveles de los marcadores nutricionales (prealbúmina, albúmina, proteínas totales).

EVOLUCIÓN VALORES ANALÍTICOS		
Variable	Ingreso (media $\pm$ dt)	Tras 1 mes (media $\pm$ dt)
Hematíes (millones/mm <sup>3</sup> )	4,50 $\pm$ 0,54	4,60 $\pm$ 0,50
Hemoglobina (g/dL)	13,54 $\pm$ 1,50	14,08 $\pm$ 1,24
Hematocrito (%)	40,37 $\pm$ 6,84	43,47 $\pm$ 3,31
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	9,43 $\pm$ 3,12	10,96 $\pm$ 15,45
Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> /μL)	8,85 $\pm$ 1,57	4,68 $\pm$ 2,27
Linfocitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	2,72 $\pm$ 4,17	7,70 $\pm$ 10,60
Plaquetas (nº/μL)	382,04 $\pm$ 174,83	262,61 $\pm$ 66,13
Glucosa (mg/dL)	94,36 $\pm$ 12,74	97,78 $\pm$ 17,00
Urea (mg/dL)	32,04 $\pm$ 9,08	29,50 $\pm$ 7,72
Creatinina (mg/dL)	0,80 $\pm$ 0,18	0,82 $\pm$ 0,12
Filtrado glomerular ( mL/min)	101,96 $\pm$ 18,54	101,50 $\pm$ 14,43

Colesterol total (mg/dL)	163,85 ± 31,43	202,29 ± 44,71
Triglicéridos (mg/dL)	156,38 ± 70,12	150,12 ± 96,10
Bilirrubina total (mg/dL)	0,39 ± 0,17	0,49 ± 0,27
AST/GOT (UI/L)	22,88 ± 12,37	21,23 ± 5,98
ALT/GPT (UI/L)	32,92 ± 23,71	28,17 ± 18,32
Proteínas totales (g/dL)	6,50 ± 0,79	7,41 ± 0,55
Albumina (g/dL)	3,84 ± 0,58	4,46 ± 0,35
Prealbumina (mg/dL)	24,69 ± 8,43	31,39 ± 7,91
Transferrina (mg/dL)	207,27 ± 44,39	267,12 ± 42,16
Proteína C reactiva (mg/L)	27,86 ± 26,89	2,73 ± 2,36
Hierro (µg/dL)	67,33 ± 41,10	78,40 ± 35,63
Cloro (mEq/L)	103,85 ± 2,88	104,33 ± 3,18
Sodio (mEq/L)	141,19 ± 2,43	141,86 ± 1,77
Potasio (mEq/L)	4,58 ± 0,23	4,58 ± 0,39
Tiempo protrombina (seg)	12,83 ± 0,69	12,69 ± 0,61
Índice de Quick (seg)	93,00 ± 20,16	97,82 ± 6,75
INR	1,02 ± 0,05	1,02 ± 0,05
Tiempo de tromboplastina parcial activada (seg)	30,57 ± 4,12	29,81 ± 3,96
Fibrinógeno derivado (mg/dL)	641,44 ± 82,06	441,86 ± 81,14

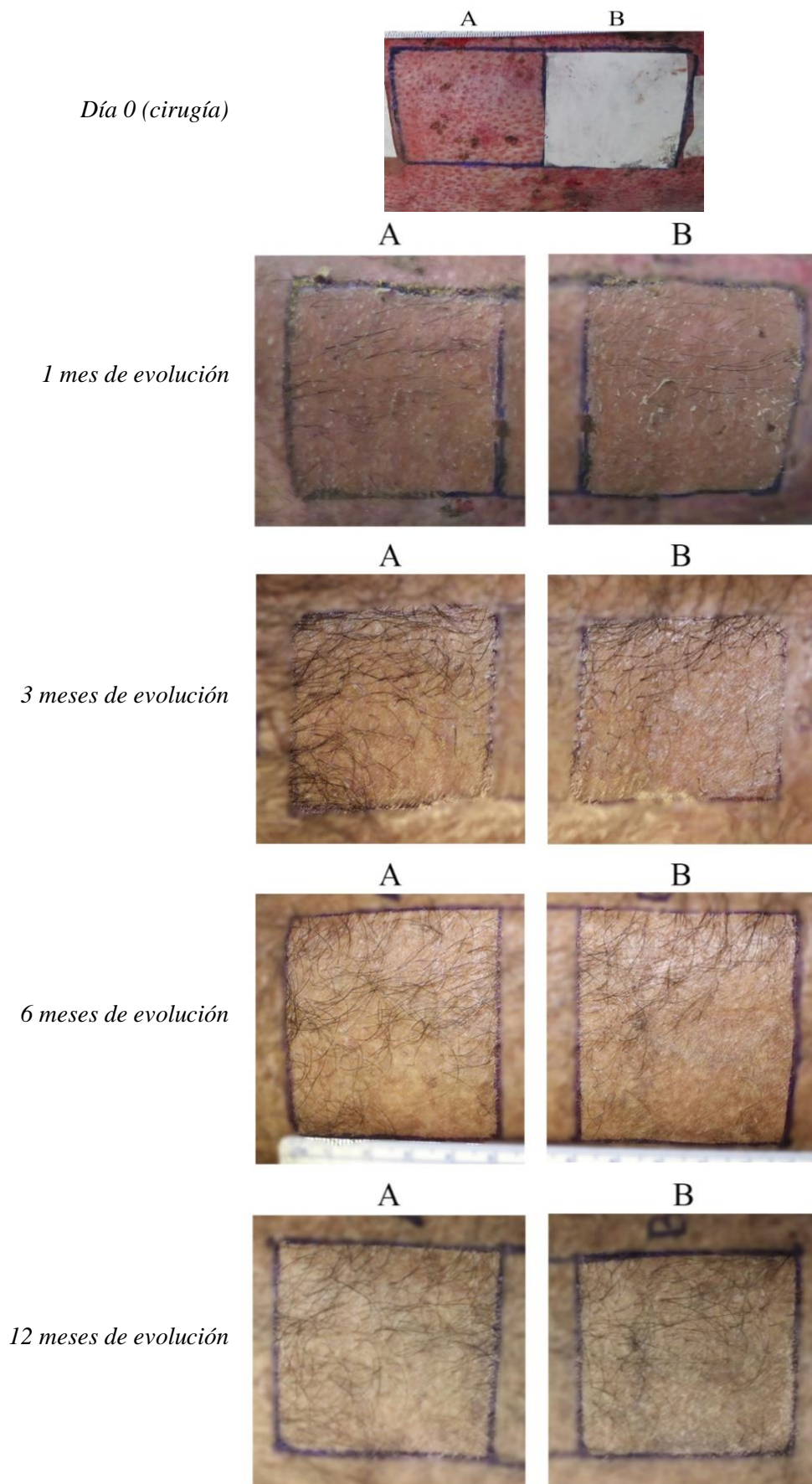
**Tabla 8.** Valores analíticos de los pacientes en la visita preoperatoria y al mes tras la intervención.

## 6.4 Calidad de la cicatriz

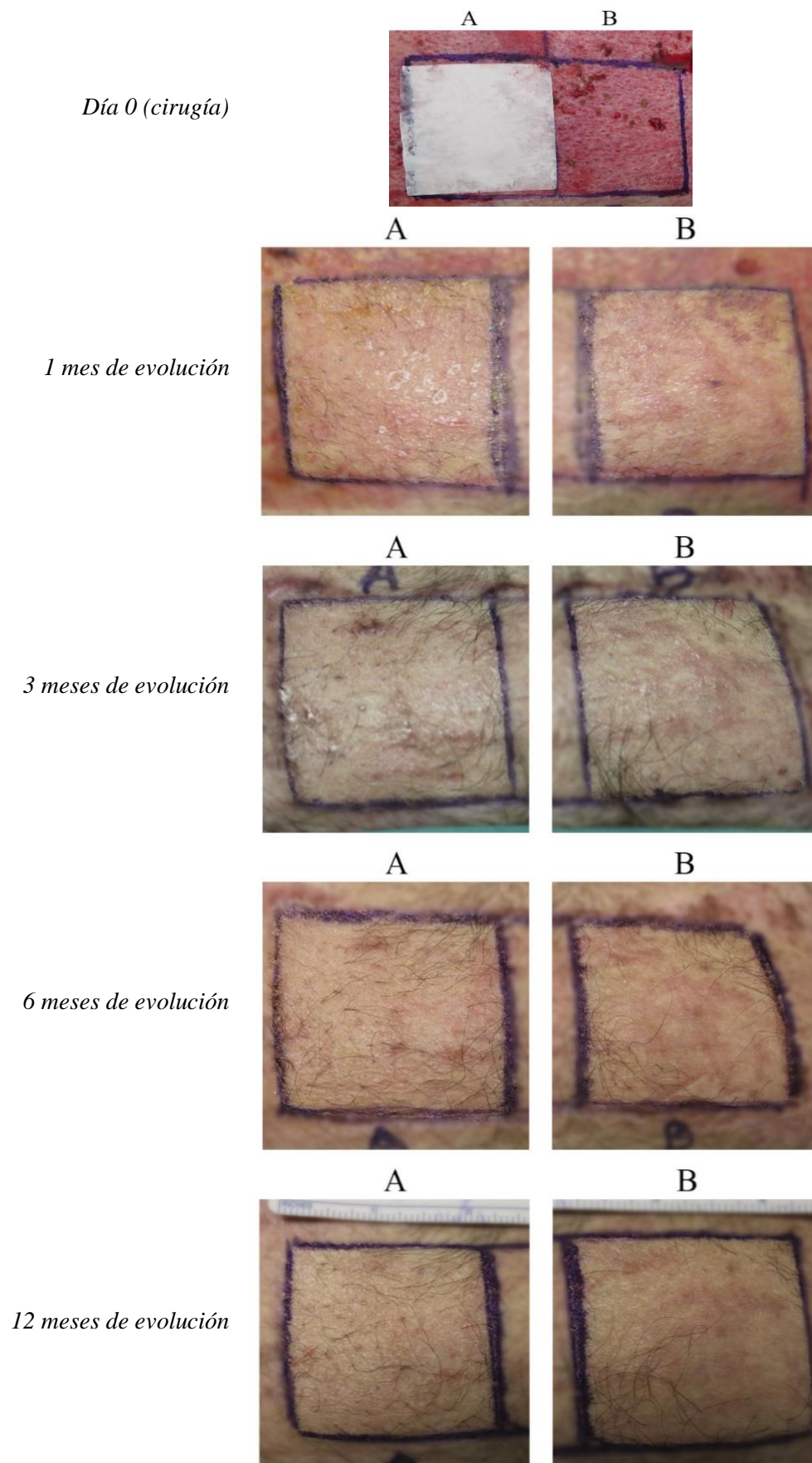
La calidad de las cicatrices fue similar entre los grupos (tabla 9, Figuras 25-30). Dicha calidad fue mejorando a lo largo del tiempo: al primer mes los pacientes presentaron una puntuación de 6/18 en la escala de Vancouver y de 36/120 en POSAS, mientras que a los 12 meses las puntuaciones eran de unos 2/18 en la escala de Vancouver y de 16/120 en POSAS.

EVOLUCIÓN DE LAS CICATRICES				
Escala	Tiempo	Mediana (1 <sup>er</sup> cuartil; 3 <sup>er</sup> cuartil)		
		GLOBAL	CONTROL	SKINHEALTEX
Vancouver	T1	6,0 (5,0; 7,0)	6,0 (5,0; 7,3)	6,0 (4,8; 7,0)
	T3	6,0 (3,8; 7,0)	6,0 (3,8; 6,8)	5,5 (4,0; 6,8)
	T6	3,5 (1,0; 5,0)	3,0 (1,3; 4,8)	4,0 (1,3; 5,8)
	T12	2,0 (0,0; 2,3)	2,0 (0,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,8)
POSAS	T1	35,5 (28,5; 40,3)	35,0 (26,8; 41,5)	37,0 (30,0; 40,0)
	T3	28,0 (23,0; 34,3)	27,0 (23,0; 33,0)	31,0 (25,5; 36,8)
	T6	23,0 (16,0; 31,0)	20,0 (14,5; 30,8)	23,5 (16,8; 30,8)
	T12	16,0 (14,0; 19,0)	15,0 (14,0; 17,8)	17,0 (14,0; 20,8)

**Tabla 9.** Evolución de la calidad de la cicatriz medida a través de las escalas de Vancouver (puntuación mínima de 0 y máxima de 18) y POSAS (puntuación mínima de 12 y máxima de 120) a lo largo de los 12 meses de seguimiento.

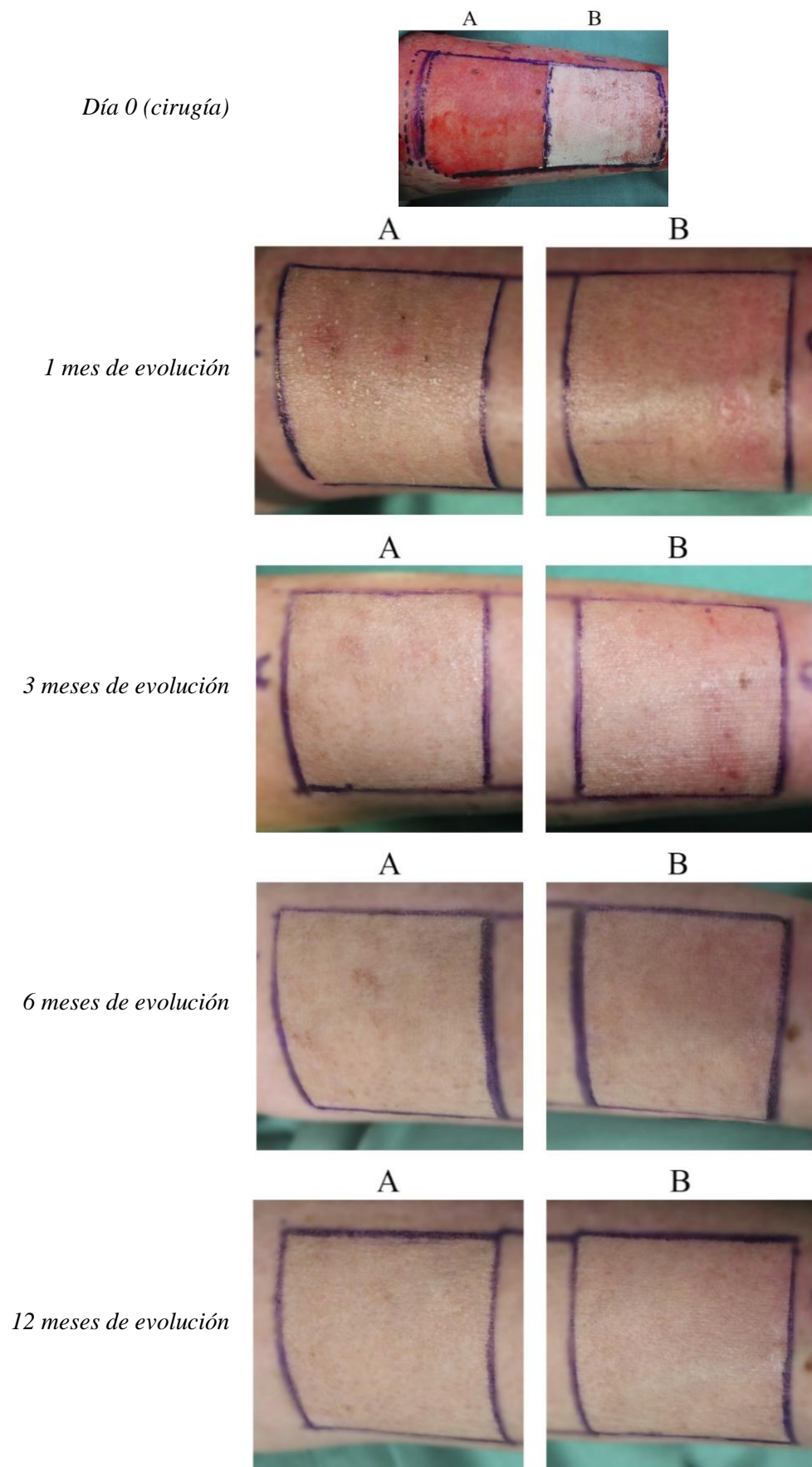


**Figura 25.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 11 a lo largo de 12 meses.



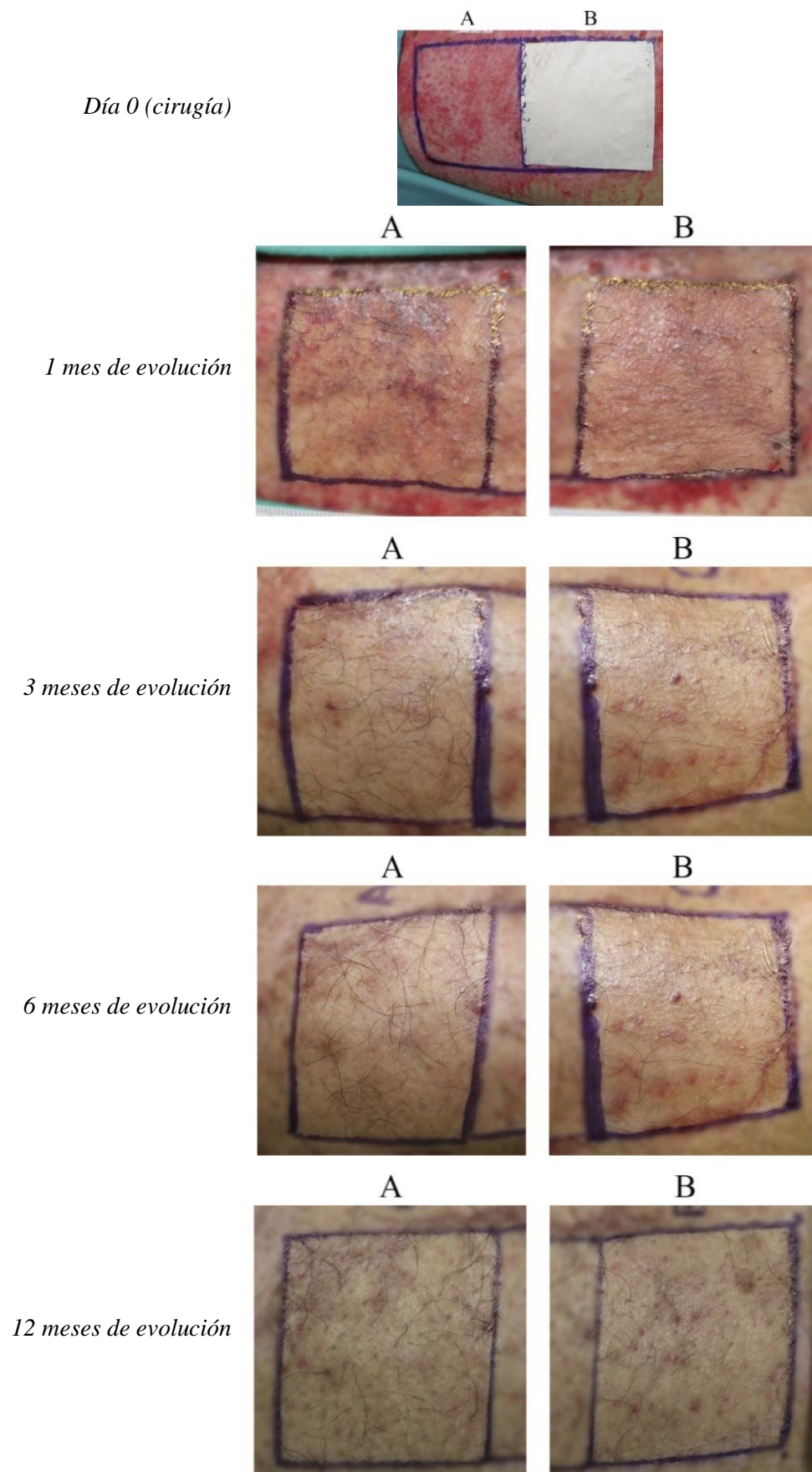
**Figura 26.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 12 a lo largo de 12 meses



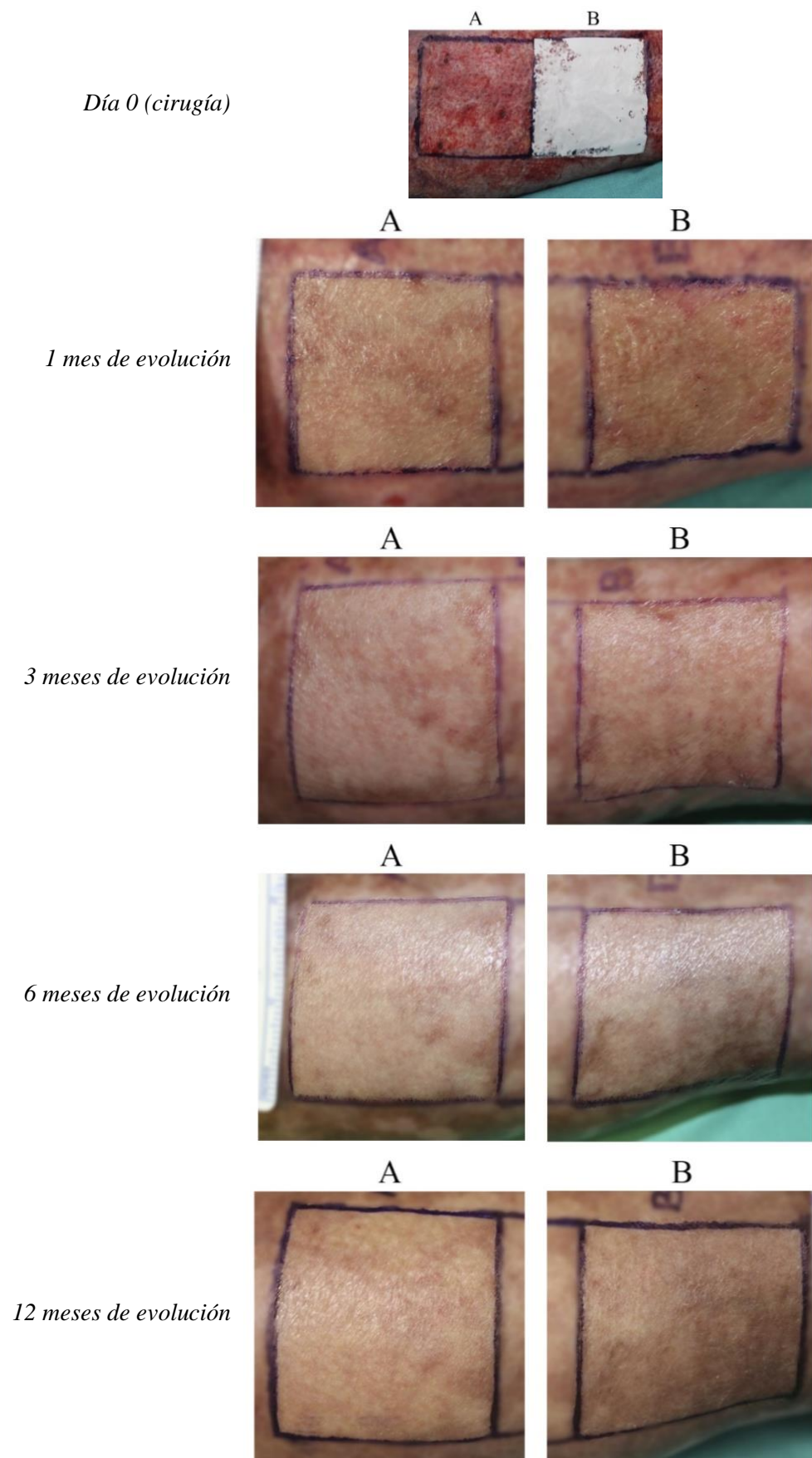


**Figura 27.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 13 a lo largo de 12 meses.



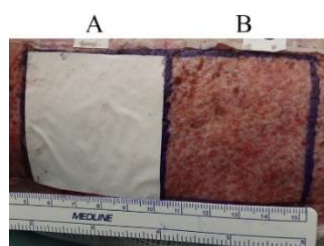


**Figura 28.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 14 a lo largo de 12 meses.

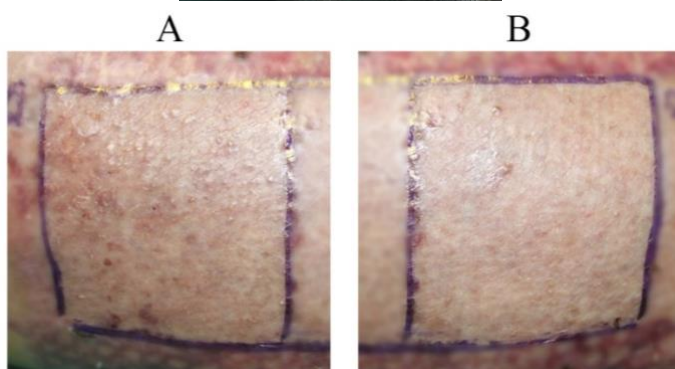


**Figura 29.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 15 a lo largo de 12 meses.

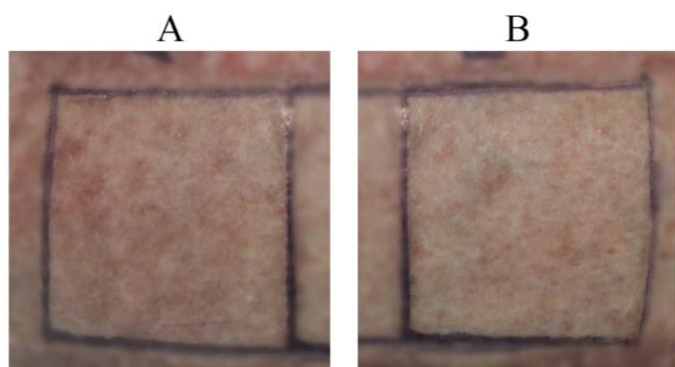
*Día 0 (cirugía)*



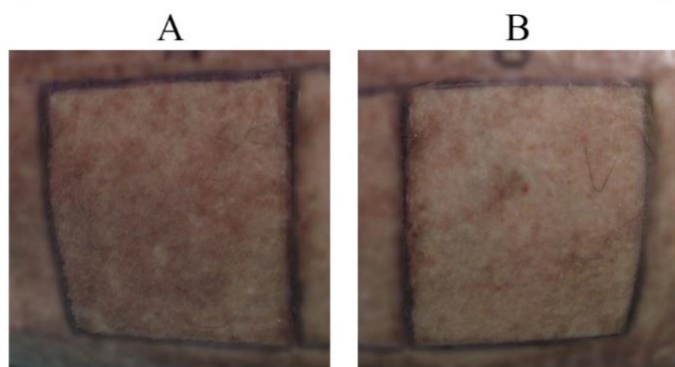
*1 mes de evolución*



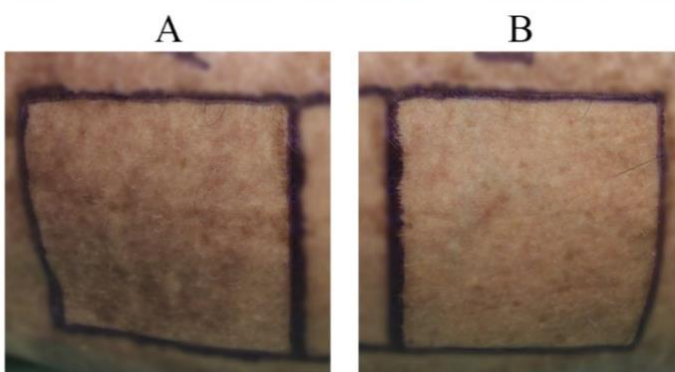
*3 meses de evolución*



*6 meses de evolución*



*12 meses de evolución*



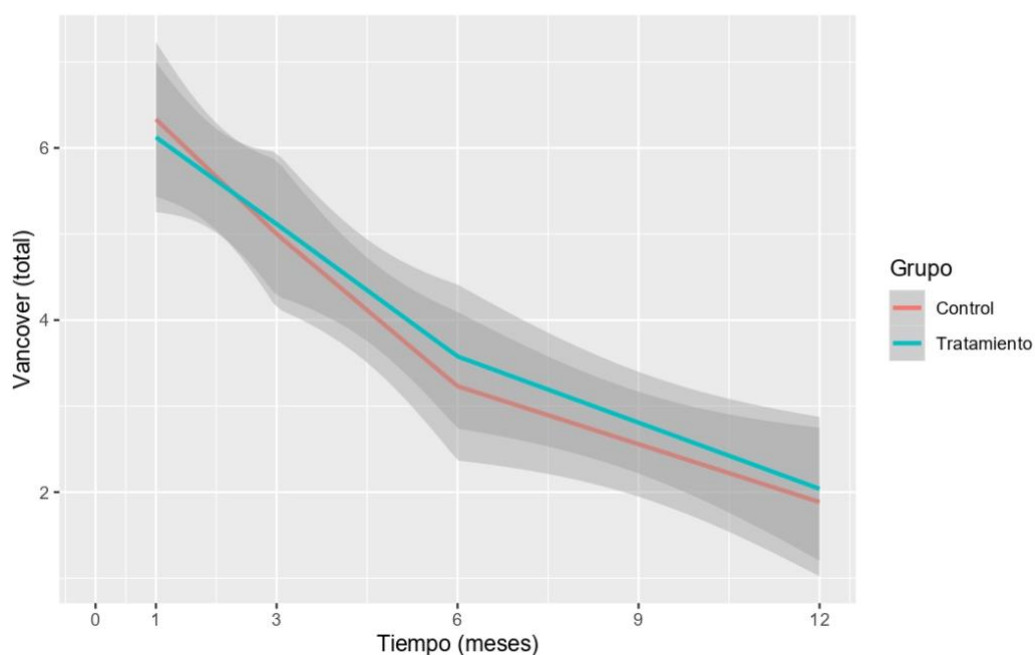
**Figura 30.** Evolución de las cicatrices del paciente de la figura 16 a lo largo de 12 meses.

En un modelo mixto de regresión de percentiles a la mediana (tabla 10), no hubo diferencias en la evolución de la calidad cicatricial medida según la escala de Vancouver (Fig. 31) y POSAS (Fig. 32) (probabilidad de que existan diferencias < 0,001).

REGRESIÓN MIXTA ESCALAS VANCOUVER Y POSAS				
Variables	VANCOUVER		POSAS	
	Valor $\pm$ error típico	IC 95%	Valor $\pm$ error típico	IC 95%
Intercepto	6,45 $\pm$ 0,51	5,45 – 7,47	38,01 $\pm$ 2,28	33,57 – 42,54
spline1_tiempo	-0,42 $\pm$ 0,17	-0,77 – -0,08	-3,34 $\pm$ 0,71	-4,76 – -1,97
spline2_tiempo	-0,71 $\pm$ 0,14	-0,99 – -0,43	-2,06 $\pm$ 0,59	-3,20 – -0,89
spline3_tiempo	-0,19 $\pm$ 0,07	-0,34 – -0,05	-0,90 $\pm$ 0,30	-1,50 – -0,31
spline1_tiempo:grupo tto	-0,03 $\pm$ 0,12	-0,27 – 0,21	0,73 $\pm$ 0,57	-0,41 – 1,85
spline2_tiempo:grupo tto	0,08 $\pm$ 0,18	-0,26 – 0,44	-0,33 $\pm$ 0,82	-1,94 – 1,29
spline3_tiempo:grupo tto	0,00 $\pm$ 0,08	-0,17 – 0,16	-0,02 $\pm$ 0,37	-0,74 – 0,71
Error típico identificación (intercepto)	1,72 $\pm$ 0,33	1,14 – 2,44	8,56 $\pm$ 1,69	5,75 – 12,36
Error típico identificación (tiempo)	0,21 $\pm$ 0,04	0,14 – 0,30	0,63 $\pm$ 0,16	0,36 – 0,98
WAIC	806,10 $\pm$ 24,30		1423,8 $\pm$ 29,5	

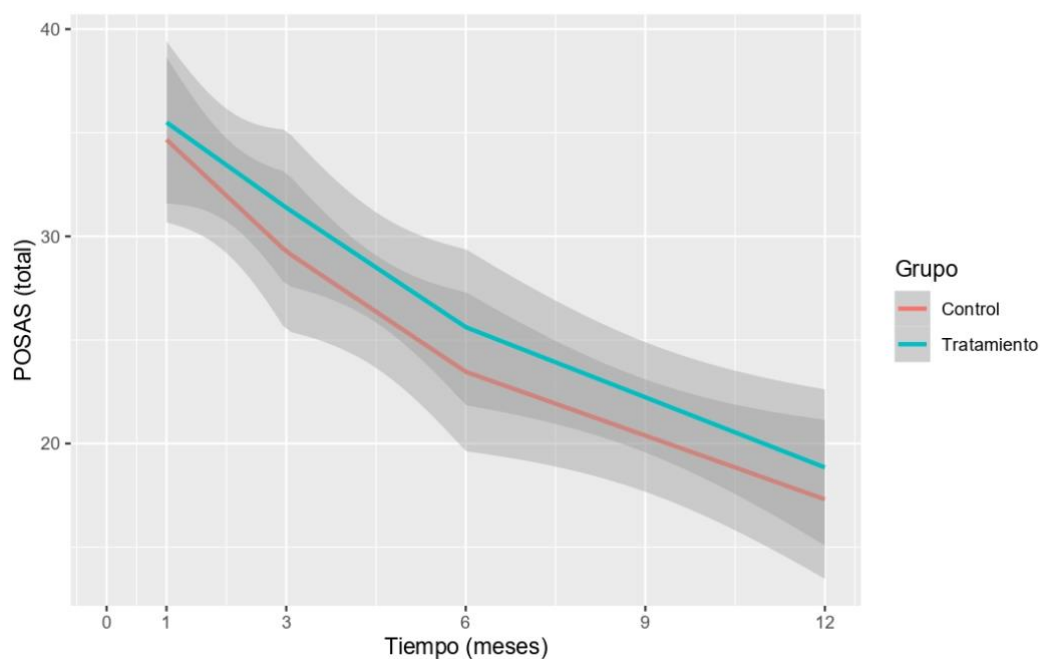
**Tabla 10.** Modelo mixto de regresión de percentiles para la evolución de las escalas de Vancouver y POSAS a lo largo de los 12 meses de seguimiento y según grupos de estudio. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la evolución de las cicatrices del grupo control y aquellas del grupo tratamiento.

## EVOLUCIÓN DE LA PUNTUACIÓN TOTAL EN LA ESCALA DE VANCOUVER



**Figura 31.** Evolución de los valores de la escala de Vancouver en cada grupo de estudio a lo largo de 12 meses. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo de confianza al 95%. A lo largo de los 12 meses de seguimiento, la puntuación va disminuyendo de 6/18 a 2/18 (la calidad de las cicatrices fue mejorando).

## EVOLUCIÓN DE LA PUNTUACIÓN TOTAL EN LA ESCALA POSAS



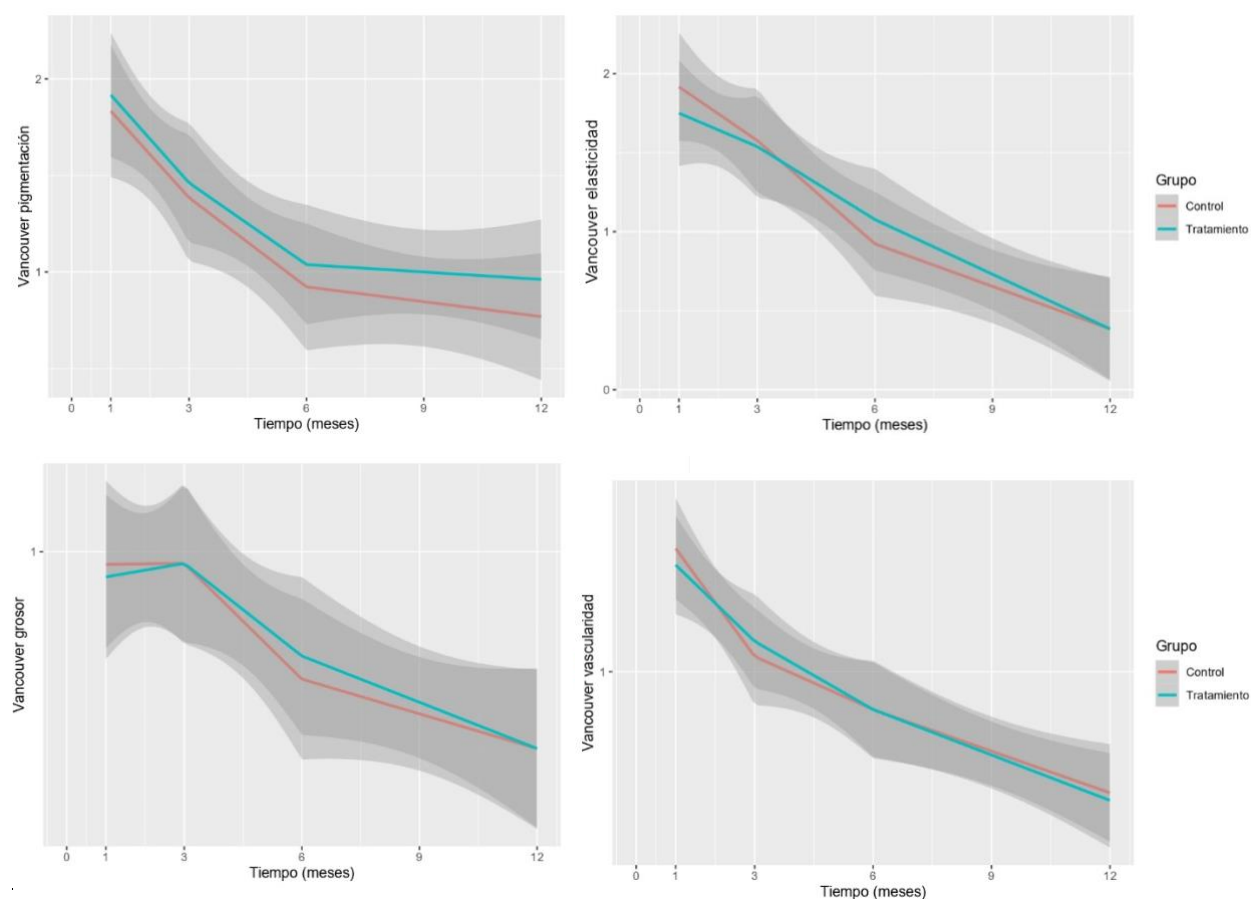
**Figura 32.** Evolución de los valores de la escala POSAS en los grupos de estudio a lo largo de 12 meses. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo de confianza al 95%. A lo largo de los meses, la puntuación va disminuyendo de 35/120 (control)



y 37/120 (tratamiento) a 15/120 (control) a 17/120 (tratamiento), es decir, la calidad de la cicatriz fue mejorando a lo largo de los meses.

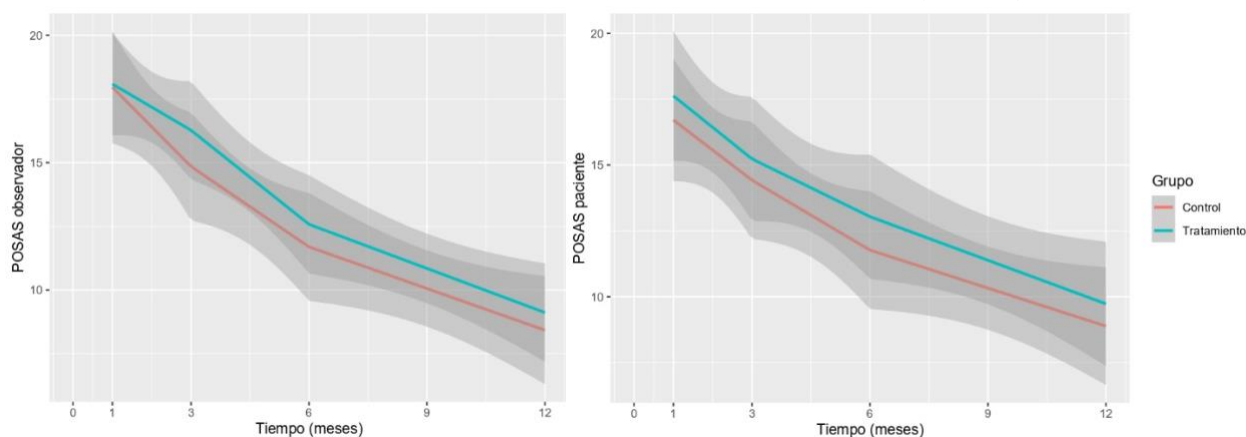
También se analizó la evolución de las distintas subescalas, siendo en todos los casos similar la evolución entre la zona tratamiento y la zona control (Figs. 33 y 34).

#### EVOLUCIÓN DE LA PUNTUACIÓN EN LAS SUBESCALAS (VANCOUVER)



**Figura 33.** Evolución de los valores de las subescalas de la escala de Vancouver en las zonas control (rojo) y en las zonas tratamiento (azul), durante los 12 meses de seguimiento. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo de confianza al 95%. En todos los casos, la puntuación va disminuyendo en ambos grupos, es decir, todas las subcaracterísticas de las cicatrices van mejorando a lo largo del tiempo de seguimiento.

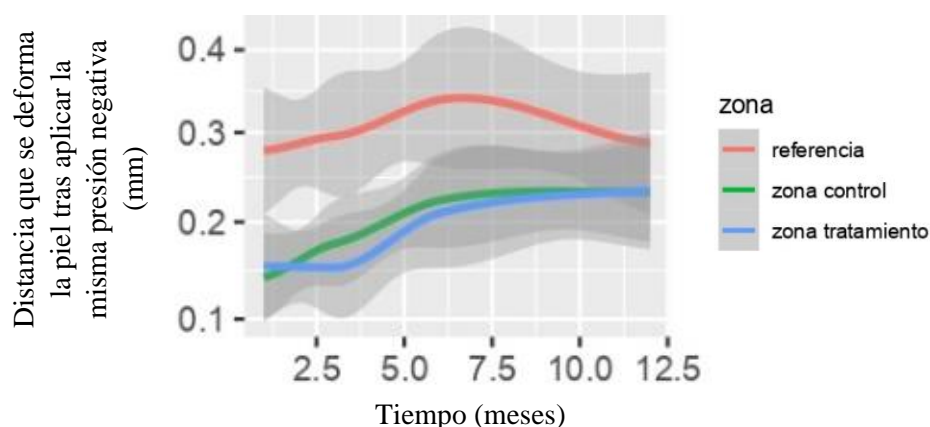
### EVOLUCIÓN DE LA PUNTUACIÓN EN LAS SUBESCALAS (POSAS)



**Figura 34.** Evolución de la cicatriz valorada a través de la escala POSAS, según el observador médico (izquierda) y según el/la paciente (derecha), por grupos, durante 12 meses. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo de confianza al 95%.

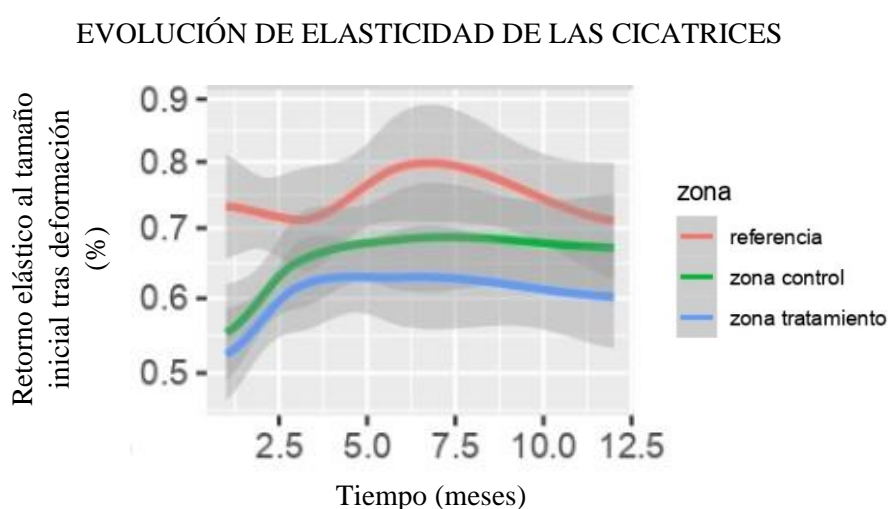
La medición de la elasticidad mediante Cutometer® Dual MPA 580 se realizó inicialmente, pero, a diferencia de las escalas, debía ser realizada por un personal diferente del asistencial. Por ello, ante la situación epidemiológica creada por la pandemia del virus SARS-CoV-2 y para restringir al máximo la exposición de los pacientes al contacto con el personal sanitario, se decidió prescindir de esta medición y se modificó el protocolo del ensayo. En consecuencia, solo se evaluó esta variable en la primera mitad de los pacientes del estudio (n = 13). En un modelo mixto de regresión no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figs. 35-36).

### EVOLUCIÓN DEFORMIDAD TRAS PRESIÓN NEGATIVA DE LAS CICATRICES



**Figura 35.** Evolución de los milímetros de deformidad a la presión negativa durante 12 meses de seguimiento. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo

de confianza al 95%. La deformación elástica de la piel cicatricial va aumentando en las zonas control y tratamiento conforme la cicatriz va madurando (líneas verde y azul), con escasos cambios a partir de los 6 meses. La zona de referencia corresponde a una zona de piel sana, y su capacidad de deformación aumentó los primeros 6 meses de seguimiento de forma no estadísticamente significativa probablemente debido a un aumento en el cuidado de la piel (aplicación diaria de crema hidratante, siguiendo los consejos médicos). Tras los 6 meses, la mayoría de los pacientes ya no tienen síntomas o tienen síntomas escasos por lo que no mantuvieron los buenos hábitos adquiridos y la elasticidad vuelve al valor inicial.



**Figura 36.** Evolución del retorno elástico a la forma inicial (tras la deformación mediante presión negativa) durante los 12 meses de seguimiento. Las líneas tendenciales se representan con colores, siendo el sombreado el intervalo de confianza al 95%. La elasticidad aumenta en la piel cicatricial durante los primeros 3 meses con escasos cambios posteriormente. Se observa también el mismo artefacto respecto a la zona de referencia (línea roja) que en la figura 33.



# DISCUSIÓN



## 7. DISCUSIÓN

En los últimos 50 años, el importante avance en los cuidados críticos ha logrado un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes quemados graves (10,27). Ello ha supuesto un nuevo reto en el tratamiento de estos pacientes, que consiste en lograr una cobertura definitiva que restablezca precozmente la barrera cutánea en las áreas lesionadas (7,10). Esta restitución, además de disminuir el riesgo de infección, que es la primera causa de mortalidad en el paciente gran quemado (28), aporta los mejores resultados funcionales y estéticos.

El *gold standard* del tratamiento quirúrgico sigue siendo el desbridamiento y la cobertura con autoinjertos de piel. Sin embargo, esta terapia depende de la disponibilidad de zonas donantes, que son escasas en pacientes grandes quemados (>20% superficie corporal quemada). Además, son frecuentes las formas de cicatrización anómala, como la cicatrización patológica, la retracción o las alteraciones de la pigmentación (3,6). Estas complicaciones ocurren con menor intensidad y frecuencia cuanto más dermis sana es aportada al lecho, pero ello también aumenta la morbilidad de la zona donante. En pacientes cuyas zonas donantes deban ser utilizadas más de una vez, debido a su escasez, podría aparecer un adelgazamiento progresivo de la dermis ya que en cada retoma es menor la dermis sana a partir de la cual se regenera y por consiguiente no sería posible aumentar la cantidad de dermis en el injerto y así evitar las complicaciones antes descritas.

Esta problemática ha llevado a muchos investigadores a buscar un producto que mejore la posibilidad de prendimiento de los autoinjertos y aumente la cantidad de dermis aportada al lecho para mejorar la calidad de la cicatriz. Uno de éstos materiales es el PLGA, que ya ha sido utilizado exitosamente en formato de apósito para tratamiento de las quemaduras (29).

## 7.1 Efectividad y tolerancia del tratamiento

Este trabajo se ha centrado en estudiar la tolerancia y efectividad de SKINHEALTEX PLGA en el tratamiento de las quemaduras, obteniéndose los siguientes resultados:

- SKINHEALTEX PLGA no disminuyó el prendimiento de los autoinjertos.
- SKINHEALTEX PLGA fue bien tolerado por los pacientes, no habiéndose observado ningún evento adverso relacionado con el biovelo, ni tampoco un aumento en el picor o dolor de las zonas tratadas.
- No se observaron cambios analíticos negativos o sugestivos de efectos sistémicos del biovelo.

Es decir, según estos resultados, SKINHEALTEX PLGA es un producto seguro que no disminuye el prendimiento de los autoinjertos de piel parcial.

La hipótesis de trabajo de los investigadores fue que el biovelo mejoraría el prendimiento de los autoinjertos de piel parcial. Aunque SKINHEALTEX PLGA no mejoró el prendimiento de los autoinjertos de piel parcial, el hecho de que no se viera disminuido el prendimiento es muy relevante, dado que el resto de los productos del mercado disponibles actualmente, sí disminuyen el prendimiento. Es especialmente destacable que el prendimiento en este ensayo ha sido mayor al 95% en ambos grupos a los 6 días y del 100% a los 15 días. En comparación, la tasa de prendimiento de injertos pre-tratados 4 semanas antes del injerto con una matriz reabsorbible de poliuretano en un estudio observacional prospectivo reciente en 30 pacientes quemados fue del 82% a los 7-10 días (30), dato en línea con las tasas de prendimiento de injertos con interposición de coberturas temporales, como se ha descrito previamente en este trabajo. Todo ello implica que SKINHEALTEX PLGA supone una mejora clínicamente relevante en el prendimiento de los autoinjertos de piel parcial respecto al resto de productos actualmente en el mercado o en investigación.

El método de la electrohilatura se ha aplicado clínicamente a algunas otras formas de heridas en humanos, siendo escasa la literatura disponible (sí ha sido, ampliamente investigada a nivel preclínico). En un estudio multicéntrico controlado sin ciego en 41 pacientes adultos se compararon los efectos de una membrana electrohilada *on site*, sobre el paciente con Jelonet® o Biatain® Ibu, aplicados sobre zonas donantes de autoinjertos

de piel parcial (31). El dolor postoperatorio fue menor en el primer día postoperatorio pero similar después, y tampoco hubo diferencias en el tiempo hasta la reepitelización, ni en la calidad de la cicatriz medida por la escala de Vancouver. Otro grupo europeo utilizó biovelos electrohilados de óxido de polietileno para el tratamiento y prevención de la radiodermatitis aguda y en el cuidado de la piel tras la crioterapia de queloides, en 12 y 24 pacientes respectivamente (32,33). En ambos casos, se seleccionaron voluntarios, no hubo ciego de pacientes ni investigadores, y el biovelo se comparó con un producto de referencia que en un caso no se describía y en el otro se mencionaba sus principios activos. Por ello, aunque obtuvieron resultados prometedores, existen sesgos diversos (sesgo de autoselección, efecto placebo, tratamiento control poco detallado y diferente del *gold standard* actual) que hacen aconsejable una interpretación cautelosa de los mismos. Todo ello le da importancia al presente estudio, ya que presenta menos sesgos que los descritos y por tanto aporta evidencia científica de mayor calidad de cara a continuar la investigación con estos novedosos productos.

En cuanto a biovelos no electrohilados, también es escasa la literatura disponible, habiéndose aplicado a dos series de pacientes publicadas (34,35). En una, los investigadores aplicaron una matriz de ácido hialurónico con fibroblastos autólogos cultivados a dos defectos cutáneos, uno por resección de epitelomas múltiples al que también se aplicó un autoinjerto de piel parcial, y uno por una úlcera por presión crónica (34). Los defectos cutáneos curaron a las 2 y 8 semanas respectivamente. En otro ensayo, una matriz de colágeno fue aplicada a 5 defectos de etiología variada bajo autoinjertos de piel parcial, también con buena evolución (35). Se necesitan estudios de mayor calidad científica para desvelar el potencial clínico real de estos materiales.

Todas estas investigaciones son reflejo del deseo de encontrar mejores apósitos y mejores adyuvantes a la cicatrización, sin que de momento se haya encontrado un material idóneo. A fecha de la redacción, el equipo investigador del estudio presentado no ha encontrado en la literatura publicaciones referentes a ensayos clínicos en quemaduras en humanos con PLGA electrohilado, por lo que el presente trabajo supone un gran avance y lidera la investigación en este prometedor campo.

## 7.2 Calidad de la cicatriz

El tratamiento de los pacientes con quemaduras no termina con la curación de las heridas, pues la mayoría de pacientes con quemaduras profundas presentarán alteraciones de la cicatrización a lo largo del proceso de maduración de la cicatriz (36). Las secuelas cicatriciales funcionales y estéticas de las quemaduras entorpecen la rehabilitación de estos pacientes, disminuyen su calidad de vida y retrasan su reintegración socio-laboral (37).

Para poder evaluar la cicatriz de las heridas y buscar formas de mejorarla existen diversos métodos. Los métodos objetivos implican aparatología económicamente costosa, la dedicación de una gran cantidad de tiempo para cada uso, y el aporte de información limitada pues miden un parámetro únicamente. Los métodos subjetivos dan una impresión general, no son invasivos, y generalmente son fáciles de usar, por lo que se consideran más útiles clínicamente y su uso está más extendido (38).

Entre los métodos subjetivos, aunque en la práctica clínica frecuentemente se realiza una evaluación clínica directa, en la literatura se utilizan escalas para favorecer la comparabilidad entre estudios. Las escalas más frecuentemente empleadas son la Escala de Vancouver para cicatrices (25) y la escala POSAS (26), ambas validadas (38,39). La primera fue desarrollada en los años 80 para evaluar cicatrices específicamente tras quemaduras, y evalúa 4 variables: la pigmentación, la elasticidad, el grosor o altura de la cicatriz, y su vascularización (a través del relleno capilar). Esta escala la realiza el/la facultativo/a únicamente, por lo que posteriormente se desarrollaron escalas que incorporaban la perspectiva de los/as pacientes, como la escala POSAS. Esta escala se divide en 2 subescalas, una que valora el facultativo, que recoge las variables evaluadas por la escala de Vancouver y el área cicatricial, y una que valora el paciente, que recoge también la presencia e intensidad de dolor o de prurito (las variables pigmentación y vascularización se unen en una, “color”, debido a que es difícil para los pacientes distinguirlas individualmente).

Existen otras escalas, generalmente más centradas en el aspecto de la cicatriz y menos completas por lo que se utilizan menos, como la escala Manchester para cicatrices (color, brillantez, márgenes, distorsión, textura) (40) o la escala visual analógica para cicatrices (aspecto general) (41).

Los métodos objetivos buscan aumentar la reproducibilidad de los métodos de evaluación de las cicatrices a costa de medir un único parámetro y el consumo de una gran cantidad de tiempo. Los parámetros medidos son los mismos evaluados por las escalas: el grosor (mediante ultrasonidos), el color (mediante análisis fotográfico), la vascularización (mediante flujometría láser o presión trascutánea de oxígeno) y la elasticidad (tonometría, presión negativa, tracción) (42). No existen datos que sugieran superioridad de un método objetivo concreto respecto a los demás. En el presente estudio se decidió medir la elasticidad de la piel mediante Cutometer® Dual MPA 580 (mide la resistencia de la piel a la succión), pues la elasticidad está en relación con la cantidad de dermis presente, a su vez determinante de la calidad global de la cicatriz tras una quemadura.

La expectativa del grupo investigador era que los prometedores resultados de los estudios preclínicos (favorecimiento el crecimiento celular dérmico y angiogénesis) se replicaran a nivel clínico, consiguiendo cicatrices de mejor calidad. Sin embargo, no hubo diferencias en la calidad de las cicatrices de cada grupo medidas mediante las escalas de Vancouver y POSAS y Cutometer® Dual MPA 580. Una posible explicación es que las características de las cicatrices dependen de muchos factores independientes del tratamiento, principalmente los dependientes del paciente (edad, etnia, predisposición genética), pero también la etiología exacta de la quemadura o su ubicación (38,42). Es decir, el estudio estuvo infra-potenciado para evaluar este aspecto, especialmente en caso de los datos recogidos mediante Cutometer®, cuyo pequeño tamaño muestral hace que el análisis estadístico no sea fiable.

## 7.3 Perspectivas de futuro

Objetivada la biocompatibilidad del biovelo SKINHEALTEX PLGA en la clínica, y la ausencia de disminución de prendimiento de los autoinjertos, nuestros resultados ofrecen la expectativa de futuro de que pueda ser utilizado como vía de administración local de fármacos que favorezcan la regeneración celular en nuestro entorno clínico: el tratamiento de las quemaduras.

Los biovelos pueden ser utilizados para la administración local de terapias médicas incorporando el fármaco a su proceso de fabricación (el fármaco será posteriormente liberado en el lecho conforme se degrade el biovelo). Esto se está investigando actualmente a nivel preclínico, con resultados muy prometedores, en enfermedades que suponen causas de muerte importantes en nuestro entorno, como la cardiopatía isquémica o el cáncer. Por ejemplo, tras la aplicación de un biovelo de nanofibras electrohiladas de PLGA con factor de crecimiento vascular endotelial en un modelo murino de infarto al miocardio hubo un aumento de la angiogénesis, un remodelamiento cardíaco positivo, y un mayor grosor del ventrículo izquierdo (43). Al aplicar biovelos de nanofibras electrohiladas de PLGA cultivados con células madre a un modelo murino similar, se observó regeneración de sectores de miocitos necrosados y mejora de la función de eyección cardíaca (44). También se han fabricado *stents* cubiertos de nanofibras electrohiladas de PLGA unidas a fármacos activos como el  $\beta$ -estradiol o la pitavastatina para fomentar la re-endotelización y proteger de una re-trombosis, así como válvulas aórticas tridimensionales con PLGA electrohilado con células intersticiales de válvula aórtica humana para sustitución valvular, en ambos casos con resultados prometedores en investigaciones *in vitro* (18,45,46).

En el ámbito del cáncer se han desarrollado *stents* hechos de nanofibras de silicona con semillas de iodo-125 para el tratamiento braquiterápico del colangiocarcinoma extrahepático, tumor en el que la reestenosis biliar por tumores intra-*stent* es una de las principales causas de morbilidad. Un grupo investigador observó inhibición del crecimiento tumoral tras implantar estas nanofibras en unos ratones inmunodeprimidos portadores de un xenotrasplante de células de colangiocarcinoma extrahepático humanas (47). Otro grupo investigador observó que el implante de nanofibras electrohiladas de PLGA con vorinostat lograba una mayor tasa de inhibición de crecimiento tumoral en



ratones portadores de HuCC-T1 (línea de células de colangiocarcinoma extrahepático humanas) que el vorinostat administrado mediante inyección paratumoral (48). Estos investigadores sugirieron que el vorinostat en las nanofibras permanece en el tejido tumoral durante más tiempo y por ello tiene mayor efecto antitumoral. También se ha observado una disminución en la tasa de crecimiento de líneas celulares humanas de cáncer de próstata tras la aplicación de nanopartículas de PLGA y poli(etilenglicol) cargadas con eupatorina (49). La eupatorina es un flavonoide con efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y citotóxicos (induce apoptosis) por bloqueo de los receptores androgénicos (es estructuralmente similar a la testosterona), pero no se ha utilizado hasta el momento debido a su perfil farmacocinético inadecuado y escasa estabilidad química. Su encapsulación en nanofibras de PLGA electrohiladas la protege de la degradación precoz además de mejorar su biocompatibilidad y solubilidad, con lo que el efecto de la eupatorina encapsulada fue mayor que el de la eupatorina libre (49).

Otras aplicaciones incluyen la sustitución del tejido condral, óseo o periodontal (13,50,51). Por ejemplo, los compuestos de PLGA con fosfato de calcio electrohilados tienen uso para los defectos óseos, pues son degradados a la misma velocidad que a la que se forma nuevo tejido óseo. Así, se ha conseguido la regeneración de defectos óseos con hueso mineralizado manteniendo la integridad mecánica en modelos murinos (13,50).

Simultáneamente, debido al rápido avance de este campo, ya se está investigando la siguiente generación de biovelos (SKINHEALTEX PLGA pertenece a la primera generación) (52,53). Se espera que estas matrices tridimensionales faciliten su integración en el tejido, ayuden a compensar el tejido dérmico perdido, y potencien la funcionalización de los biovelos. Este, en definitiva, es un campo innovador muy prometedor con potencial para lograr un tratamiento de heridas más efectivo, impactando directamente en la calidad de vida de los pacientes.

## 7.4 Limitaciones del estudio

Todo estudio presenta limitaciones. En el caso del presente trabajo, las más características pertenecen al proceso de la electrohilatura. Este novedoso proceso requiere de la optimización de diversos parámetros de procesamiento, lo cual es laborioso y, sin conocer los parámetros de procesamiento exactos, poco replicable por otros grupos de investigación. Dado que el producto está protegido como modelo de utilidad, no se han descrito dichos parámetros en este estudio. Adicionalmente, la electrohilatura utiliza disolventes con toxicidad celular que han de ser eliminados del producto totalmente antes de su uso, y es difícil controlar la forma y tamaño de los poros, dando lugar a variabilidad en el producto resultante.

Aunque en el cálculo muestral inicial se calcularon 30 pacientes, finalmente se reclutaron 26 debido a la situación epidemiológica. Los autores de este trabajo consideran que es poco probable que haya influido de forma significativa en los resultados obtenidos, dado que en el cálculo muestral inicial se asumieron pérdidas a lo largo del seguimiento que posteriormente no se produjeron, y dada la homogeneidad de los resultados. Sin embargo, el ensayo podría estar infrapotenciado para valorar algunos aspectos. Ello es especialmente cierto para la medida de la elasticidad mediante Cutometer® Dual MPA 580, que sólo se realizó en 13 pacientes, por lo que dichos datos, como ya se ha destacado previamente, no son fiables.

Otra posible fuente de sesgos es la variable prendimiento. La evaluación clínica de esta variable, aunque fuera por profesionales entrenados, comporta cierto grado de subjetividad.

Por último, la limitación más importante es probablemente la validez externa. Existen diversas co-intervenciones que podrían afectar las variables resultado, como por ejemplo los protocolos de rehabilitación y fisioterapia postoperatorios, que impactan en la calidad de las cicatrices. Estas co-intervenciones son las mismas para todos los pacientes del presente estudio, pero pueden diferir en caso de pacientes tratados en otros centros, pudiendo dar lugar a resultados diferentes en otras instituciones.

# CONCLUSIONES



## 8. CONCLUSIONES

- SKINHEALTEX PLGA es un producto seguro que puede aplicarse como interfaz entre los autoinjertos y el lecho desbridado de una quemadura, sin disminuir el prendimiento de estos.
- Las cicatrices resultantes son de calidad similar a la conseguida con autoinjertos de piel parcial solos, *gold standar* actual para el tratamiento quirúrgico de las quemaduras.
- Dado que este material permite retener sustancias farmacológicas, nuestros resultados apoyan su posible uso como transportador de dichos fármacos en terapias locales que aumenten el prendimiento de los autoinjertos o mejoren la calidad de las cicatrices resultantes en pacientes con quemaduras, a estudiar en investigaciones futuras.
- Este es el primer ensayo clínico en el que se investiga la aplicación de un biomaterial electrohilado a quemaduras.



# BIBLIOGRAFÍA





## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hunt JL, Arnoldo BD, Purdue GF, Herndon DN. Chapter 4: Prevention of burn injuries. In: Total Burn Care. 4th ed. New York: Elsevier; 2012. p. 49.
2. Pruitt BA, Wolf SE, Mason AD, Herndon DN. Chapter 3: Epidemiological, demographic, and outcome characteristics of burn injury. In: Total Burn Care. 4th ed. New York: Elsevier; 2012. p. 15–45.
3. van Baar ME. Epidemiology of Scars and Their Consequences: Burn Scars. In: Téot L, Mustoe TA, Middelkoop E, Gauglitz GG, editors. Textbook on Scar Management: State of the Art Management and Emerging Technologies [Internet]. Cham (CH): Springer; 2020 [cited 2022 Nov 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586079/>
4. Bombaro KM, Engrav LH, Carrougier GJ, Wiechman SA, Faucher L, Costa BA, et al. What is the prevalence of hypertrophic scarring following burns? Burns. 2003;29:299–302.
5. Lee JO, Dibildox M, Jimenez CJ, Gallagher JJ, Sayeed S, Sheridan RL, et al. Chapter 13: Operative wound management. In: Total Burn Care. 4th ed. New York: Elsevier; 2012. p. 157–72.
6. Braza ME, Fahrenkopf MP. Split-Thickness Skin Grafts. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Nov 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551561/>
7. ISBI Practice Guidelines Committee, Steering Subcommittee, Advisory Subcommittee. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. Burns. 2016;42:953–1021.
8. Mcheik JN, Barrault C, Levard G, Morel F, Bernard FX, Lecron JC. Epidermal healing in burns: autologous keratinocyte transplantation as a standard procedure: update and perspective. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2014;2:e218.
9. Barret JP. Chapter 17: The role of alternative wound substitutes in major burn wounds and burn scar resurfacing. In: Total Burn Care. 4th ed. New York: Elsevier; 2012. p. 215–7.

10. Gacto-Sanchez P. Surgical treatment and management of the severely burn patient: Review and update. *Medicina intensiva* [Internet]. 2017 Sep [cited 2022 Nov 22];41(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28456441/>
11. Kaur G, Narayanan G, Garg D, Sachdev A, Matai I. Biomaterials-Based Regenerative Strategies for Skin Tissue Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater*. 2022;16:2069–106.
12. Naskar S, Das SK, Sharma S, Kuotsu K. A Review on Designing Poly (Lactic-co-glycolic Acid) Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharm Nanotechnol*. 2021;9:36–50.
13. Zhou H, Lawrence JG, Bhaduri SB. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review. *Acta Biomater*. 2012;8:1999–2016.
14. Gil-Castell O, Badia JD, Ontoria-Oviedo I, Castellano D, Marco B, Rabal Á, et al. In vitro validation of biomedical polyester-based scaffolds: Poly(lactide-co-glycolide) as model-case. *Polymer Testing*. 2018;66:256–67.
15. Castellano Izquierdo D, Sepúlveda Sanchis P, Ruiz Saurí A. Evaluación de Biopolímeros como Superficie de Regeneración de Tejidos Dérmico y Cardíaco. [Valencia]: Universitat de València; 2018.
16. Castellano D, Blanes M, Marco B, Cerrada I, Ruiz-Saurí A, Pelacho B, et al. A comparison of electrospun polymers reveals poly(3-hydroxybutyrate) fiber as a superior scaffold for cardiac repair. *Stem Cells Dev*. 2014; 23:1479–90.
17. Hiep NT, Lee BT. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21:1969–78.
18. Cheraghi M, Pooria A. A review: Nanofibrous scaffold in possible prevention and treatment of coronary artery disease. *Biotechnol Appl Biochem*. 2019;66:478–83.
19. Dankers PYW, Boomker JM, Huizinga-van der Vlag A, Wisse E, Appel WPJ, Smedts FMM, et al. Bioengineering of living renal membranes consisting of hierarchical, bioactive supramolecular meshes and human tubular cells. *Biomaterials*. 2011;32:723–33.

20. Yanaga H, Tai Y, Yamauchi T, Mori S, Udoh Y, Yamamoto M, et al. Take percentage and conditions of cultured epithelium were improved when basement membrane of the graft was maintained and anchoring mesh was added. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107:105–15.
21. Haifei S, Xingang W, Shoucheng W, Zhengwei M, Chuangang Y, Chunmao H. The effect of collagen-chitosan porous scaffold thickness on dermal regeneration in a one-stage grafting procedure. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;29:114–25.
22. Ma B, Xie J, Jiang J, Wu J. Sandwich-type fiber scaffolds with square arrayed microwells and nanostructured cues as microskin grafts for skin regeneration. *Biomaterials.* 2014;35:630–41.
23. Vanaclocha Saiz MN. El impacto pronóstico de la nutrición en el paciente quemado [Tesis Doctoral]. [Valencia]: Universitat de València; 2022.
24. Fitzpatrick TB. Ultraviolet-induced pigmentary changes: benefits and hazards. *Curr Probl Dermatol.* 1986;15:25–38.
25. Sullivan T, Smith J, Kermode J, McIver E, Courtemanche DJ. Rating the burn scar. *J Burn Care Rehabil.* 1990;11:256–60.
26. Draaijers LJ, Tempelman FRH, Botman YAM, Tuinebreijer WE, Middelkoop E, Kreis RW, et al. The patient and observer scar assessment scale: a reliable and feasible tool for scar evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113:1960–5; discussion 1966–1967.
27. Tejiram S, Romanowski KS, Palmieri TL. Initial management of severe burn injury. *Curr Opin Crit Care.* 2019;25:647–52.
28. Manning J. Sepsis in the Burn Patient. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2018;30:423–30.
29. Rahimi F, Rezayatmand R. Use of a biosynthetic wound dressing to treat burns: a systematic review. *J Wound Care.* 2020;29:S16–22.
30. Lo CH, Brown JN, Dantzer EJG, Maitz PKM, Vandervord JG, Wagstaff MJD, et al. Wound healing and dermal regeneration in severe burn patients treated with

- NovoSorb® Biodegradable Temporising Matrix: A prospective clinical study. *Burns*. 2022;48:529–38.
31. Haik J, Ullman Y, Gur E, Ad-El D, Egozi D, Kruchevsky D, et al. Advances in the Use of Electrospun Nanofibrous Polymeric Matrix for Dermal Healing at the Donor Site After the Split-Thickness Skin Graft Excision: A Prospective, Randomized, Controlled, Open-Label, Multicenter Study. *J Burn Care Res*. 2022;43:889–98.
  32. Kyritsi A, Kikionis S, Tagka A, Koliarakis N, Evangelatou A, Papagiannis P, et al. Management of Acute Radiodermatitis in Non-Melanoma Skin Cancer Patients Using Electrospun Nanofibrous Patches Loaded with *Pinus halepensis* Bark Extract. *Cancers (Basel)*. 2021;13:2596.
  33. Kikionis S, Koromvoki M, Tagka A, Polichronaki E, Stratigos A, Panagiotopoulos A, et al. Ulvan-Based Nanofibrous Patches Enhance Wound Healing of Skin Trauma Resulting from Cryosurgical Treatment of Keloids. *Mar Drugs*. 2022;20:551.
  34. Galassi G, Brun P, Radice M, Cortivo R, Zanon GF, Genovese P, et al. In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold. *Biomaterials*. 2000;21:2183–91.
  35. Wollina U, Meseg A, Weber A. Use of a collagen-elastin matrix for hard to treat soft tissue defects. *Int Wound J*. 2011;8:291–6.
  36. Cubison TCS, Pape SA, Parkhouse N. Evidence for the link between healing time and the development of hypertrophic scars (HTS) in paediatric burns due to scald injury. *Burns*. 2006;32:992–9.
  37. Warden GD, Warner PM, Herndon DN. Chapter 62: Functional sequelae and disability assessment. In: *Total Burn Care*. 4th ed. New York: Elsevier; 2012. p. 699–705.
  38. van de Kar AL, Corion LUM, Smeulders MJC, Draaijers LJ, van der Horst CMAM, van Zuijlen PPM. Reliable and feasible evaluation of linear scars by the Patient and Observer Scar Assessment Scale. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116:514–22.

39. Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care*. 2010;14:R188.
40. Beausang E, Floyd H, Dunn KW, Orton CI, Ferguson MW. A new quantitative scale for clinical scar assessment. *Plast Reconstr Surg*. 1998;102:1954–61.
41. Duncan JAL, Bond JS, Mason T, Ludlow A, Cridland P, O’Kane S, et al. Visual analogue scale scoring and ranking: a suitable and sensitive method for assessing scar quality? *Plast Reconstr Surg*. 2006;118:909–18.
42. Serghiou MA, Ott S, Whitehead C, Cowan A, McEntire S, Suman OE, et al. Chapter 47: Comprehensive rehabilitation of the burn patient. In: *Total Burn Care*. 4th ed. New York: Elsevier; 2012. p. 517–49.
43. Formiga FR, Pelacho B, Garbayo E, Abizanda G, Gavira JJ, Simon-Yarza T, et al. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. *J Control Release*. 2010;147:30–7.
44. Kai D, Wang QL, Wang HJ, Prabhakaran MP, Zhang Y, Tan YZ, et al. Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model. *Acta Biomater*. 2014;10:2727–38.
45. Oh B, Lee CH. Advanced cardiovascular stent coated with nanofiber. *Mol Pharm*. 2013;10:4432–42.
46. Wu S, Li Y, Zhang C, Tao L, Kuss M, Lim JY, et al. Tri-Layered and Gel-Like Nanofibrous Scaffolds with Anisotropic Features for Engineering Heart Valve Leaflets. *Adv Healthc Mater*. 2022;11:e2200053.
47. Lin L, Guo L, Zhang W, Cai X, Chen D, Wan X. Novel Silicone-Coated 125I Seeds for the Treatment of Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2016;11:e0147701.

48. Kwak TW, Lee HL, Song YH, Kim C, Kim J, Seo SJ, et al. Vorinostat-eluting poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofiber-coated stent for inhibition of cholangiocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:7669–80.
49. Tousi MS, Sepehri H, Khoee S, Farimani MM, Delphi L, Mansourizadeh F. Evaluation of apoptotic effects of mPEG-b-PLGA coated iron oxide nanoparticles as a eupatorin carrier on DU-145 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *J Pharm Anal*. 2021;11:108–21.
50. Wu DT, Munguia-Lopez JG, Cho YW, Ma X, Song V, Zhu Z, et al. Polymeric Scaffolds for Dental, Oral, and Craniofacial Regenerative Medicine. *Molecules*. 2021;26:7043.
51. Wu X, Ding J, Xu P, Feng X, Wang Z, Zhou T, et al. A cell-free ROS-responsive hydrogel/oriented poly(lactide-co-glycolide) hybrid scaffold for reducing inflammation and restoring full-thickness cartilage defects *in vivo*. *Biomed Mater*. 2021;16.
52. Chin JS, Madden LE, Phillips ARJ, Chew SY, Becker DL. Bio-Mimicking Acellular Wet Electrospun Scaffolds Promote Accelerated Integration and Re-Epithelialization of Full-Thickness Dermal Wounds. *Bioengineering (Basel)*. 2022;9:324.
53. Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AAA, Dudhipala N. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*. 2022;11:2439.

# ANEXOS





## **10. ANEXOS**

Anexo I: Aprobación del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos

Anexo II: Autorización de la AEMPS

Anexo III: Hoja de información y consentimiento para los pacientes respecto al estudio

Anexo IV: Hoja de información y consentimiento para los pacientes respecto a la toma de fotografías

Anexo V: Hoja de registro de escala de Vancouver

Anexo VI: Hoja de registro de escala de POSAS

Anexo VII: Artículo asociado

# Anexo I: Aprobación del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos



## DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. María Tordera Baviera, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la siguiente propuesta de ensayo clínico:

Código de protocolo del promotor: **SKINHEALTEX PLGA**

Título: **"ESTUDIO CLÍNICO PROSPECTIVO, CONTROLADO Y ALEATORIZADO, CON EVALUACIÓN ENMASCARADA, PARA COMPARAR INTRAINDIVIDUALMENTE LA EFICACIA DE SKINHEALTEX PLGA FRENTE AL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO HABITUAL CON AUTOINJERTO EN PACIENTES CON QUEMADURAS."**

Promotor: **INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE**

PROTOCOLO: **1/ 22 de febrero de 2018**

HIP/CI:

- Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado, versión 1 de fecha 22 de febrero de 2018
- Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado para el Uso de Fotografías para fines adicionales, versión 1 de fecha 22 de febrero de 2018

PROCEDIMIENTOS Y MATERIAL UTILIZADO PARA EL RECLUTAMIENTO DE LOS SUJETOS: **06 de marzo de 2018**

Que este Comité ha realizado la evaluación de la solicitud de autorización del ensayo y ha valorado las respuestas del promotor a las aclaraciones solicitadas (si las hubiera).

Que este Comité ha realizado la evaluación de la solicitud de autorización del ensayo, de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 1090/2015 y en el art 7 del reglamento (UE) 536/2014 y considera que:

- El procedimiento para obtener el consentimiento informado (incluyendo las hojas de información al sujeto de ensayo y consentimientos informados mencionados en el encabezamiento), y el plan de reclutamiento de sujetos previsto son adecuados y cumplen con los requisitos para la obtención del consentimiento informado previstos en el capítulo II del Real Decreto 1090/2015.
- Las compensaciones previstas a los participantes son adecuadas, así como las previsiones de indemnización por daños y perjuicios que pueda sufrir el participante.
- El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.
- El uso futuro de las muestras biológicas obtenidas durante el ensayo se adecua a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.
- Para la realización del ensayo se consideran adecuados los centros e investigadores previstos en el anexo II a este dictamen, teniendo en cuenta las declaraciones de idoneidad emitidas por el promotor y por los responsables de las instituciones correspondientes.

Que este Comité decidió emitir **DICTAMEN FAVORABLE** en la reunión celebrada el día 28 de marzo de 2018 (acta nº 433).

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente – Real Decreto 1090/2015 – para que la decisión del citado CEIm sea válida.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 28 de marzo de 2018



Fdo.: Dra. María Tordera Baviera  
Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos

## **Anexo I Dictamen inicial COMPOSICION DEL CEIm**

**Presidente:**

Dra. Adela Cañete Nieto (Oncología Pediátrica)

**Vicepresidente:**

Dr. Salvador Aliño Pellicer (Catedrático Farmacólogo Clínico)

**Secretaria Técnica:**

Dra. María Tordera Baviera (Farmacéutica del Hospital)

**Miembros:**

Dr. Bonaventura Casanova Estruch (Neurología)  
Dra. M<sup>a</sup> Isabel Izquierdo Macián (Neonatología)  
Dr. Luis Vicente Martínez Dolz (Cardiología)  
Dra. Paula Ramírez Gallego (Medicina Intensiva - Miembro de la Comisión de Investigación)  
Dra. Sara Brugger Frigols (Radiodiagnóstico)  
D. Serafín Rodríguez Capellán (Licenciado en derecho - Ajeno a las profesiones sanitarias)  
Dña. María Victoria Paricio Gómez (Enfermería)  
Dr. José María Canelles Gamir (Farmacéutico de Atención Primaria)  
Dr. Matteo Frasson (Cirugía General y Aparato Digestivo)  
Dr. José Vicente Solanas Prats (Atención Primaria)  
Dña. Pilar Robles Villalba (Vicepresidenta de la asociación de Miastenia - Miembro ajeno a las profesiones sanitarias)  
Dr. Javier Lluna González (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial - Formación acreditada en Bioética)  
D. Miguel Ángel Cano Torres (Secretario de ASLEUVAL - Miembro Lego - Ajeno a las profesiones sanitarias)

## **Anexo II Dictamen Inicial**

### **CENTROS E INVESTIGADORES PRINCIPALES PARTICIPANTES EN ESPAÑA**

Código de protocolo del promotor: **SKINHEALTEX PLGA**

Título: ***"ESTUDIO CLÍNICO PROSPECTIVO, CONTROLADO Y ALEATORIZADO, CON EVALUACIÓN ENMASCARADA, PARA COMPARAR INTRAINDIVIDUALMENTE LA EFICACIA DE SKINHEALTEX PLGA FRENTE AL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO HABITUAL CON AUTOINJERTO EN PACIENTES CON QUEMADURAS."***

Promotor: **INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE**

Investigador principal	Centro de realización del estudio
Dra. M <sup>a</sup> Dolores Pérez del Caz	Hospital Universitario y Politécnico la Fe

## Anexo II: Autorización de la AEMPS



PS/CR

671/18/EC

### AUTORIZACION DE INVESTIGACIONES CLINICAS

Visto el procedimiento iniciado por D<sup>a</sup>. Laura Segura Martí, como persona de contacto designada por el promotor de la investigación clínica “Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras.”, nº expte. 671/18/EC, en solicitud de autorización de la misma.

Tramitado el procedimiento conforme a lo dispuesto en el Título IV de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas y, consideradas las disposiciones establecidas en el capítulo VIII del Real Decreto 1591/2009, por el que se regulan los productos sanitarios y el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal “Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios” y se aprueba su estatuto.

En su virtud, a propuesta del Departamento de Productos Sanitarios, y en el uso de las atribuciones que me están conferidas, he resuelto

**AUTORIZAR** la realización de la investigación clínica indicada en las condiciones y términos que figuran en el expediente, en los centros sanitarios siguientes:

- Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

Contra esta resolución que agota la vía administrativa puede interponerse potestativamente recurso de reposición ante la Directora de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en los artículos 123 y 124 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, o interponerse recurso contencioso-administrativo ante el Juzgado Central de lo contencioso-administrativo de la Comunidad Autónoma de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

Mediante este documento se Notifica a D<sup>a</sup>. Laura Segura Martí (Avenida Fernando Abril Martorell, 106, Torre A – 7<sup>a</sup> planta, 46026 Valencia), la presente resolución, según lo exigido en el artículo 40 de la mencionada Ley 39/2015.

DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

P.A. art.14.4 del Estatuto de la AEMPS (R.D. 1275/2011, de 16 de septiembre)

SECRETARIO GENERAL

Francisco Javier Muñoz Aizpuru

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	Localizador: KSR8FLR3EF
Fecha de la firma: 26/06/2018	

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO  
psinclinic@aemps.es

Página 1 de 1

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8  
28022 MADRID  
Tel.: (+34) 91.822.54.99  
Fax: (+34) 91.822.52.89

## Anexo III: Hoja de información y consentimiento para los pacientes respecto al estudio

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

<b>Código de Protocolo:</b> SKINHEALTEX PLGA	<b>Promotor:</b> Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
<b>Versión:</b> 3	<b>Fecha de la versión:</b> 15/04/2021
<b>Nombre del Investigador Principal:</b> Maria Dolores Pérez del Caz <b>Datos de contacto:</b> 961244000 ext.440190	<b>Centro:</b> Hospital Universitari i politècnic La fe <b>Servicio:</b> Cirugía Plástica y Quemados
<b>Título del ensayo:</b> Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras.	

#### 1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un ensayo clínico en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por un Comité de Ética de la Investigación con medicamentos y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, y el Reglamento Europeo 536/2014 de 16 de abril por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este ensayo. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

## **2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

## **3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ENSAYO:**

Las quemaduras son lesiones que destruyen las capas de la piel entera o parcialmente dependiendo de la gravedad de la herida y se pueden clasificar en tres grados de gravedad según el daño producido; primer, segundo y tercer grado (de menos a más gravedad).

En las quemaduras de primer grado afecta a las capas más superficiales de la piel (epidermis) y no requieren una atención médica urgente y la cicatriz que se produce es discreta. En cambio las quemaduras de segundo y tercer grado afectan a capas más profundas (epidermis y dermis) y requieren una atención más especializada. Este tipo de quemaduras son susceptibles de recibir injertos de piel. El injerto de piel es una técnica en la que se toma piel de un área del cuerpo (zona dadora) para restablecer la cobertura de la piel en otra área (zona receptora) del propio paciente. Aunque es una práctica que clínicamente conlleva ventajas funcionales no lo es tanto en cuanto a las consecuencias estéticas. En muchos casos deja secuelas tanto en la zona donante como en la zona de herida que recibe el injerto dejando cicatrices defectuosas (anchas, pigmentadas, hipertróficas, queloides).

Según la gravedad de la lesión se necesitará un injerto de espesor parcial o total y que sea de un tipo u otro influirá en el desarrollo posterior de la curación del injerto y del resultado estético de la cicatriz.

Si el injerto es de espesor total (epidermis y la dermis en su totalidad) preservan mejor las características de la piel (textura, color y espesor) y no produce mucha retracción del tejido pero necesita mucho más tiempo para curar y esto puede provocar la pérdida del injerto.



Si el injerto es de espesor parcial (epidermis y parte de dermis) tienen un mejor prendimiento sin embargo son más susceptibles de sufrir retracción en la herida cicatrizante.

Para ello, en este estudio, se ha desarrollado un biovelo denominado SKINHEALTEX PLGA que ha demostrado ser inócuo para las células y biodegradable. Un biovelo es un material con forma de gasa o velo extremadamente fino, diseñado para aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo.

El objetivo de este estudio es determinar si poniendo este biovelo en la base de los injertos se reduce el tiempo de prendimiento de los injertos, se promueve la vascularización, y se disminuye la retracción de las heridas. Esto se traduciría en conservar las características físicas de la piel y aumentar las probabilidades de éxito en cuanto al rechazo.

Si accede participar en este estudio, su médico responsable, seleccionará dos zonas susceptibles de recibir un injerto de piel. Una zona se tratará de la manera habitual, que será poniendo el injerto de piel únicamente, y la otra zona se pondrá SKINHEALTEX PLGA debajo del injerto en el momento de la cirugía.

La elección de cuál de las dos zonas llevará el biovelo será aleatoria y ni usted ni el evaluador conocerán cual de las dos zonas es la que lleva el biovelo.

Para la evaluación de la progresión de la herida será necesario tomar fotografías en el momento de realizar las curas (los días 2, 6, 10 y 15 tras la cirugía). Las fotografías sólo abarcarán la zona de estudio y se garantizará la confidencialidad de los datos obtenidos.

Si, pasados 15 días, las dos zonas de su herida no han cerrado, el médico volverá a citarle para realizar una segunda intervención y dejará de participar en el estudio. Si alguna de las dos zonas ha cerrado, se le volverá a citar para realizar la intervención en esa zona, pero seguirá participando en el estudio.

Se le realizará un seguimiento al mes, a los 3 meses, 6 meses y 1 año tras la intervención. Deberá acudir al centro para que:

- Se tomen las fotografías de su herida.
- Le pediremos que rellene un simple test sobre su opinión en la evolución de la herida. Serán preguntas relacionadas con la coloración que toma la herida, si siente picor, dolor, etc...

A continuación, le mostramos el calendario de visitas/procedimientos que se realizarán durante su participación en el estudio:

Punto temporal	Visita de selección	Cirugía	Periodo de evaluación	Alta del paciente	Seguimiento a largo plazo			
Procedimiento	Día de ingreso	Día 0	Días 2, 6, 10, 15	Día de cierre de la herida	1 mes después de la cirugía	3 meses después de la cirugía	6 meses después de la cirugía	12 meses después de la cirugía
Firma de Consentimientos informados	+							
Recogida de datos (edad, peso, antecedentes médicos, ...)	+	+						
Análítica	+				+			
Test de embarazo	+							
Fotografía general	+	+						
Aleatorización		+						
Fotografía macroscópica		+	+	+	+	+	+	+
Cirugía y Aplicación del tratamiento		+						
Evaluación Acontecimiento Adverso			+	+	+	+	+	+
Escala Vancouver					+	+	+	+
Escala POSAS					+	+	+	+

#### **4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:**

La participación en este estudio en ningún momento podrá comportar riesgo adicional para su salud. No obstante, el tratamiento experimental, puede no aportar beneficios para su lesión.

Se espera obtener un mayor conocimiento de su enfermedad, lo que podría aportar beneficio para otros pacientes y para usted. Además, con el implante del biovelo debajo del injerto en el momento de la cirugía, esperamos evitar las secuelas consecuencia del implante de injerto que, como se ha explicado anteriormente, ocurren con frecuencia en esta clase de intervenciones.

#### **5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:**

Si usted decide no participar en este estudio, tras la obtención del injerto se le aplicará el procedimiento habitual en este tipo de cirugía.

El médico del estudio le dará la información detallada del tratamiento del estudio y de los tratamientos alternativos, si usted así lo desea.

#### **6. SEGURO:**

El promotor del estudio dispone de una póliza de seguros que se ajusta a la legislación vigente (Real Decreto 1090/2015 por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos), que le proporcionará la compensación e indemnización correspondientes en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse en relación con su participación en el estudio. Esta póliza está contratada con la compañía HDI, con nº de póliza 08058090-30013.

En caso de que se necesiten cuidados médicos, los gastos ocasionados por ello es responsabilidad del Promotor.

Le informamos que es posible que su participación en este ensayo clínico pueda modificar las condiciones generales y particulares (cobertura) de sus pólizas de seguros (vida, salud, accidente), y por ello, le recomendamos que se ponga en

contacto con su compañía de seguros y le informe de su participación en el mismo para determinar si podría afectar a su póliza de seguro actual o en el caso de que vaya a contratar una póliza nueva.

#### **7. N° DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ENSAYO:**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dra. M<sup>a</sup> Dolores Pérez del Caz en el número de teléfono 961244000 ext.440190.

#### **8. CONFIDENCIALIDAD:**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio o colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, n° de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. El acceso a su historia clínica ha de ser sólo en lo relativo al estudio.

#### **9. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:**

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto, e incluso, le serán reintegrados los gastos extraordinarios que le suponga la participación en el mismo (comidas, traslados, etc...). Usted no tendrá que pagar por los medicamentos que le suministren en el estudio.

#### **10. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:**

Cualquier nueva información referente al producto utilizado en el estudio que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la mediación en estudio o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos.

En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el ensayo siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en el Real Decreto.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación objeto del presente estudio. Por lo tanto, ni el investigador, ni el promotor, adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del ensayo: Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras.

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos).

He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer preguntas sobre el estudio.  
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: \_\_\_\_\_ (nombre del Investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante

Firma del Investigador

Fecha

Fecha

Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.

### CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

*La declaración del testigo imparcial es obligatoria cuando el paciente, el padre o madre, el tutor o el representante legal no sepan leer o escribir.*

Título del ensayo: Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras.

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos),

He recibido la hoja de información sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He sido informado por: \_\_\_\_\_ (nombre del investigador)

Declaro bajo mi responsabilidad que: \_\_\_\_\_ (nombre del participante del ensayo)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Firma del Testigo

Firma del Investigador

Fecha

Fecha

Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.

## CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Título del ensayo: Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras.

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos del representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: \_\_\_\_\_ (nombre del Investigador)

Comprendo que la participación en el estudio es voluntaria

Comprendo que es posible retirarse del estudio:

1º Cuando así lo quiera el participante

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En \_\_\_\_\_ mi presencia se ha dado a \_\_\_\_\_ (nombre del participante), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y \_\_\_\_\_ presto mi conformidad con que \_\_\_\_\_ (nombre del participante) participe en el estudio.

Firma del Representante

Firma del Investigador

Fecha

Fecha

Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.



## Anexo IV: Hoja de información y consentimiento para los pacientes respecto a la toma de fotografías

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### USO DE FOTOGRAFÍAS PARA FINES ADICIONALES

<b>Código de Protocolo:</b> SKINHEALTEX PLGA	<b>Promotor:</b> Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
<b>Versión:</b> 1	<b>Fecha de la versión:</b> 22/02/2018
<b>Nombre del Investigador Principal:</b> Maria Dolores Pérez del Caz <b>Datos de contacto:</b> 961244000 ext.440190	<b>Centro:</b> Hospital Universitari i polítènic La fe <b>Servicio:</b> Cirugía Plástica y Quemados
<b>Título del ensayo:</b> Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras.	

#### 1. INTRODUCCIÓN:

Ya ha firmado una hoja de consentimiento por la que permite al personal del ensayo tomar fotografías del área tratada durante su participación en el estudio.

El consentimiento anterior permite al promotor del estudio utilizar las fotografías para realizar la evaluación de las lesiones.

La finalidad de esta hoja es preguntarle si consiente que las fotos se utilicen para fines adicionales. Las fotos solo mostrarán el/las áreas tratadas y en ningún caso saldrán otras zonas o partes que puedan identificar su identidad.

#### 2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que no está obligado a aceptar que sus fotografías se utilicen para estos fines adicionales.

Puede revocar su consentimiento en cualquier momento antes de que se utilicen de cualquier modo las fotografías para cualquiera de los fines descritos en esta hoja. Una vez que las fotografías se hayan utilizado para cualquiera de los fines descritos, tan solo será posible revocar el consentimiento para usos futuros (nuevos) de las fotografías.

En caso de que revoque su consentimiento, no se alterará la relación con su médico ni se producirá perjuicio alguno en su tratamiento.

### **3. FINES ADICIONALES DE LAS FOTOGRAFÍAS**

Al firmar esta hoja, consiente que las fotos tomadas durante su participación en el estudio se utilicen para los siguientes fines adicionales:

- Congresos de carácter científico/médico
- Publicaciones científicas
- Material docente
- Tesis doctoral

Si consiente que sus fotografías se utilicen para estos fines adicionales y, posteriormente, cambia de opinión, indíquese al médico o al personal del ensayo.

### **4. CONFIDENCIALIDAD:**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al médico del estudio. Las fotografías tomadas para el estudio estarán identificadas mediante un código y sólo el médico del estudio o colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. El investigador principal del estudio será el responsable de dicho registro. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité de Ética de la Investigación y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

El promotor garantiza su anonimato. Se difuminará o cubrirá cualquier facción que pueda identificarle, tal y como se hará para los fines previstos para las fotografías en este ensayo.

Si desea obtener más información acerca de cómo se protegerán sus datos mientras participa en este ensayo, consulte al médico o al personal del ensayo. Podrá formular las preguntas que tenga con respecto al estudio y al uso de las fotografías en cualquier momento. Puede contactar al médico del ensayo en cualquier momento si tiene alguna inquietud o queja.

#### **5. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:**

Permitir que el promotor utilice las fotografías para estos fines adicionales no le ayudará de modo alguno.

No recibirá ningún pago por permitir al promotor que utilice las fotografías para estos fines adicionales. Si alguien utiliza las fotografías en reuniones científicas, con fines formativos o en revistas o libros científicos, tampoco se le pagará. El promotor será propietario de los derechos de las fotografías.

Tiene derecho a ver las fotografías que se tomen del área de tratamiento.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del ensayo: "Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras"

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos).

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el uso adicional de las fotografías que se tomarán durante el estudio.

He recibido suficiente información acerca de las fotografías del estudio

He hablado con: \_\_\_\_\_ (nombre del Investigador)

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar el consentimiento:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para que se utilicen las fotografías que se tomen durante el estudio de la forma descrita.

Firma del Participante

Firma del Investigador

Fecha

Fecha

El investigador certifica que el participante ya mencionado ha tenido tiempo suficiente para considerar esta información, ha tenido la posibilidad de formular preguntas y ha aceptado voluntariamente que se utilicen las fotografías que se hagan en el estudio de la forma descrita.

Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.

## CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

*La declaración del testigo imparcial es obligatoria cuando el paciente, el padre o madre, el tutor o el representante legal no sepan leer o escribir.*

Título del ensayo: "Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras"

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos),

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el uso adicional de las fotografías que se tomarán durante el estudio.

He recibido suficiente información acerca de las fotografías del estudio.

He sido informado por: \_\_\_\_\_ (nombre del investigador)

Declaro bajo mi responsabilidad que: \_\_\_\_\_ (nombre del participante del ensayo)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse el consentimiento:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Y ha expresado libremente su conformidad para que se utilicen las fotografías que se tomen durante el estudio de la forma descrita.

Firma del Testigo

Firma del Investigador

Fecha

Fecha

El investigador certifica que el participante ya mencionado ha tenido tiempo suficiente para considerar esta información, ha tenido la posibilidad de formular preguntas y ha aceptado voluntariamente que se utilicen las fotografías que se hagan en el estudio de la forma descrita.

Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.

Protocolo SKINHEALTEX PLGA  
Versión 1 del 22 de febrero de 2018

Página 5 de 6

## CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Título del ensayo: "Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras"

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos del representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el uso adicional de las fotografías que se tomarán durante el estudio.

He recibido suficiente información acerca de las fotografías del estudio.

He hablado con: \_\_\_\_\_ (nombre del Investigador)

Comprendo que la participación es voluntaria

Comprendo que es posible retirar el consentimiento:

- 1º Cuando así lo quiera el participante
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En \_\_\_\_\_ mi presencia se ha dado a \_\_\_\_\_ (nombre del participante), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que se utilicen las fotografías de \_\_\_\_\_ (nombre del participante) que se hagan en el estudio de la forma descrita.

Firma del Representante

Firma del Investigador

Fecha

Fecha

El investigador certifica que el representante del participante ya mencionado ha tenido tiempo suficiente para considerar esta información, ha tenido la posibilidad de formular preguntas y ha aceptado voluntariamente que se utilicen las fotografías que se hagan en el estudio de la forma descrita. Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.

## Anexo V: Hoja de registro de escala de Vancouver



Código paciente: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

### Escala de Vancouver (Vancouver ScarScale – VSS).

Pigmentación		A	B
0	Color normal (parecido a piel cercana)		
1	Hipopigmentada		
2	Hiperpigmentada		
Vascularidad			
0	Normal		
1	Rosa (flexible con mínima resistencia)		
2	Roja (aumento significativo en el riego sanguíneo local)		
3	Morada (excesivo riego sanguíneo local)		
Flexibilidad	Bandas (bridas, no limitan grado de movimiento)		
0	Normal		
1	Flexible		
2	Cede		
3	Firme		
4	Adherencia		
5	Contractura		
Altura/Grosor			
0	Normal		
1	<2 mm		
2	2-5 mm		
3	>5 mm		
<b>TOTAL =</b>			

La tabla mide 6 variables, con un total de 18 puntos y puntuación mínima 0. La puntuación más baja significa el mejor estado de la cicatriz.

## Anexo VI: Hoja de registro de escala de POSAS



Código paciente: \_\_\_\_\_


Fecha: \_\_\_\_\_

### Componente paciente de la escala POSAS (Patient and Observer Scar Assessment Scale)

Componente para el observador												
	Piel normal 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Vascularización	Peor cicatriz imaginable										A	B
Pigmentación												
Grosor												
Relieve												
Flexibilidad												
Área de cicatriz vs herida inicial												
Componente para el paciente												
	No, sin síntomas 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
¿La cicatriz duele?	Peor síntoma posible										A	B
¿La cicatriz pica?												
	No, como la piel normal 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
¿Es el color de la cicatriz diferente?	Sí, muy diferente										A	B
¿Es la cicatriz más rígida?												
¿Es el grosor de la cicatriz diferente?												
¿Es la cicatriz irregular?												
<b>TOTAL =</b>												



## Electrospun poly(hydroxybutyrate) scaffolds promote engraftment of human skin equivalents via macrophage M2 polarization and angiogenesis

Delia Castellano<sup>1,2†</sup>, Ana Sanchis<sup>1†</sup>, María Blanes<sup>3</sup>, M<sup>a</sup>. Dolores Pérez del Caz<sup>1</sup>, Amparo Ruiz-Saurí<sup>4</sup>, Marina Piquer-Gil<sup>1,2</sup>, Beatriz Pelacho<sup>5</sup>, Bruno Marco<sup>3</sup>, Nahuel García<sup>1,2</sup>, Imelda Ontoria-Oviedo<sup>1,2</sup>, Vicente Cambra<sup>3</sup>, Felipe Prosper<sup>5</sup> and Pilar Sepúlveda<sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Regenerative Medicine and Heart Transplantation Unit, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Joint Unit for Cardiovascular Repair Instituto de Investigación Sanitaria La Fe-Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Instituto Tecnológico Textil Aitex, Alcoy, Spain

<sup>4</sup>Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Laboratory of Cell Therapy, Foundation for Applied Medical Research and Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, Pamplona, Spain

### Abstract

Human dermo-epidermal skin equivalents (DE) comprising *in vitro* expanded autologous keratinocytes and fibroblasts are a good option for massive burn treatment. However, the lengthy expansion time required to obtain sufficient surface to cover an extensive burn together with the challenging surgical procedure limits their clinical use. The integration of DE and biodegradable scaffolds has been proposed in an effort to enhance their mechanical properties. Here, it is shown that poly(hydroxybutyrate) electrospun scaffolds (PHB) present good biocompatibility both *in vitro* and *in vivo* and are superior to poly-ε-caprolactone electrospun scaffolds as a substrate for skin reconstruction. Implantation of PHB scaffolds in healthy rats polarized macrophages to an M2-type that promoted constructive *in vivo* remodelling. Moreover, implantation of DE-PHB composites in a NOD/SCID mouse xenograft model resulted in engraftment accompanied by an increase in angiogenesis that favoured the survival of the human graft. Thus, PHB scaffolds are an attractive substrate for further exploration in skin reconstruction procedures, probably due in part to their greater angiogenic and M2 macrophage polarization properties. Copyright © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 8 February 2016; Revised 12 January 2017; Accepted 17 January 2017

Keywords poly(hydroxybutyrate); electrospinning; skin equivalents; human skin xenograft

### 1. Introduction

Skin is the largest organ in the body and serves as a protective barrier against the environment. Loss of large portions of skin is life threatening and skin replacement is the only therapeutic option. Conventional treatment for extensive skin damage includes the use of autologous split-thickness skin grafts, consisting of the complete epidermis and a thin dermal portion. However, when skin loss exceeds 60%, there is insufficient autologous donor skin or dermal portion available to cover the wound and alternative treatments are necessary. Among the most effective treatments for skin repair is the engraftment of dermo-epidermal skin equivalents (DE), which consist of expanded autologous keratinocytes seeded onto a fibrin layer containing fibroblasts (Ehrlich 2004). Major hurdles for this procedure, however, include the treatment delay

due to the need for cell expansion, which can increase the possibility of clinically relevant infections, the risk of sepsis or the occurrence of a hypermetabolic response affecting all organs, all of which contribute to postburn morbidity and mortality (Kraft *et al.*, 2012). An additional challenge is the difficulty in achieving efficient DE engraftment to anatomic sites of injury subjected to frequent movements, for example the neck or the axilla. Thus, improvements in the mechanical properties of DE to allow the effective manipulation by surgeons would improve the clinical outcome.

New therapeutic modalities to treat massive burns include artificial skins comprising commercially available acellular biological matrices such as Apligraf® (Eagelstein and Falanga, 1997), Integra® (Boyce *et al.*, 1999) or Matriderm® (MD) (Rysse *et al.*, 2008), or biological materials (biomaterials) such as collagen or hyaluronic acid, with distinctive three-dimensional architectures (Kashiwa *et al.*, 2004; Powell and Boyce, 2007). Categories of scaffolds used to treat skin defects include spheroid particles, sponges and polymeric sheets, all of which are composed of biomaterials with different degrees of *in vivo* degradability. Polymer electrospinning

\*Correspondence to: Pilar Sepúlveda, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Avda. Fernando Abril Martorell, n° 126, Torre A, Valencia 46026, Spain. Phone: 00 34 961216699, E-mail: pilar.sepulveda.sanchis@gmail.com

†Delia Castellano and Ana Sanchis contributed equally to this work.

is a technique that uses high voltage to produce fibre scaffolds from liquid on a nanoscale. Among the different types of polymers used, collagen and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) show good results when used for the manufacture of tissue-engineered skin substitutes (Dai *et al.*, 2005). Poly(hydroxybutyrate) (PHB) is a bacterial polymer with good skin wound healing properties *in vitro* (Han *et al.*, 2007; Suwantong *et al.*, 2007) and *in vivo* (Veleirinho *et al.*, 2012) when used either alone or in combination with seeded adipose tissue mesenchymal stem cells (Zonari *et al.*, 2015).

It has previously been demonstrated that electrospun PHB scaffolds showed excellent biocompatibility for cardiac repair (Castellano *et al.*, 2014). Although this polymer has been demonstrated to be a good candidate for tissue engineering and wound dressing (Bye *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015), to the authors' knowledge it has not been evaluated for skin autografts or DE engraftment.

Different mechanisms have been proposed to explain the ability of biological or artificial matrices to promote tissue repair. Among them, macrophage polarization is considered a critical determinant for constructive remodelling of implanted biomaterials (Badyalak *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2012), and extracellular matrix extracts or natural polymers including tyramine substituted-hyaluronan, collagen or chitosan have been shown to induce M2-type macrophage polarization (Chin *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2016; Sadler *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2013). Moreover, the category of scaffold can also influence the host immune response. For instance, PCL fibre thickness and pore size influence macrophage polarization and arterial regeneration (Wang *et al.*, 2014), and differences in these parameters in polydioxanone electrospun scaffolds were shown to influence macrophage polarization and secretion of angiogenic cytokines vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- $\beta$ 1 and basic fibroblast growth factor, underscoring the need for a rational design of implantable scaffolds (Garg *et al.*, 2014). In the present study, biological responses against MD, PCL and PHB were analysed after subcutaneous implantation in immunocompetent rats or as a scaffold to support human DE engraftment, and it was shown that electrospun PHB scaffolds facilitate the handling of DE and improve graft survival via M2-type macrophage polarization, induction of angiogenesis and epidermis stratification at the site of implantation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult male Wistar rats (age 6–8 weeks, 200–250 g) were purchased from Charles River Laboratories Inc., MA, USA, and maintained under standard laboratory conditions. Athymic NOD/SCID mice (age 8–10 weeks, 30–50 g; Charles River Laboratories) were maintained under

pathogen-free laboratory conditions. All animal procedures were approved by institutional ethical and animal care committees.

### 2.2. Electrospinning and electron microscopy

Two polymeric solutions for electrospinning were prepared. PCL (Mw = 70,000–90,000 g/mol, viscosity = 1.22 dL/g; Purac Bioquímica, Barcelona, Spain) was dissolved in a mixture of dimethylformamide/chloroform (1:8) at room temperature (RT) and stirred overnight to ensure complete dissolution. A weight concentration of 18% (w/v) was chosen. PHB (Mw = 400,000 g/mol; Biomer, Krailling, Germany) was dissolved in chloroform at 60°C and stirred for 2 days. A weight concentration of 12% (w/v) was used. Solvents were supplied by Sigma-Aldrich. All materials were used directly without further purification. The solutions were electrospun using a 2.2D-350 electrospinner (YFLOW, Málaga, Spain). The main characteristics of this instrument are the double polarization, coaxial ability, Taylor cone visualization, integrated drum collector control panel and robotized stage that moves the electrospinning source in an alternative fashion covering a 400 × 400-mm area. Electrospinning conditions were adjusted for each polymer and are summarized in Table 1. Electrospinning was performed with 20-ml syringes (BD Plastipak™) and stainless steel capillaries with an inner diameter of 0.6 mm. The air temperature of the electrospinning room was approximately 23°C and air humidity was 27–35%. After electrospinning, collected nanofibre webs were dried under vacuum (0.8 bar) in a Vacuotem-T oven (JP Selecta SA, Barcelona, Spain) at RT overnight to remove residual solvent. Nanofibre mesh surfaces were activated with N<sub>2</sub> low-pressure plasma treatment (Europlasma, Belgium) for 20 s to introduce polar groups onto the surface and increase the surface hydrophilicity. The diameter of the fibres was determined by microscopy. Briefly, electrospun scaffolds were coated with gold (Polaron SC7620 “Mini” Sputter Coater, Quorum Technologies, Kent, UK) and fibre structures were examined with a microscope (Tecnai FEI electron microscope, Oregon, USA) at an accelerating voltage of 25 kV. Fiber diameter was determined using ImageJ v1.48 software (National Institutes of Health). Electrospun sheets were sterilized by ultraviolet radiation for 60 min or soaked with ethanol and dried before cell culture and *in vivo* applications.

Table 1. Electrospinning conditions

Polymer	Weight concentration (Solvent)	Rate (mL/h)	Voltage (kV)		Distance (cm)
			Injector	Collector	
PHB	12% w/v (CHCl <sub>3</sub> )	1	7.80	−1.93	20
PCL	18% w/v (dimethylformamide/CHCl <sub>3</sub> 1:8)	4	7.32	−5.34	25

### 2.3. Isolation and culture of fibroblasts and keratinocytes from skin tissue

Human keratinocytes and dermal fibroblasts were obtained from discarded skin tissue of healthy donors during abdominoplasty after informed consent. Tissue was minced with no prior dermal-epidermal separation. Fragments were digested with 0.05% trypsin/0.02% ethylenediamine tetra-acetic acid (TE), which was replenished every 30 min. TE was inactivated by addition of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Thermo Fisher Scientific) with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco, MA, USA) and cells were centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min. The pellet was suspended in culture medium and cells were counted using a hemocytometer. The procedure was repeated until no more cells were obtained from the sample. TE was then completely eliminated and the remaining skin tissue was immersed in a solution of collagenase type I (2 mg/ml; Sigma) in Hank's balanced salt solution (Gibco, MA, USA) until its complete disaggregation (8–12 h). The disaggregated mixture was filtered through a 40- $\mu$ m filter (Falcon; Becton-Dickinson, N.J. USA) and centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min. The pellet was suspended in culture medium and cells were counted. Primary keratinocytes obtained after TE digestion were seeded in a 75-cm<sup>2</sup> culture flask ( $2 \times 10^6$  cells/flask) in the presence of  $5 \times 10^6$  lethally-irradiated NIH 3 T3 cells and cultured following the method described by Rheinwald and Green (1975). Keratinocyte culture medium (KCM) was a mixture of DMEM/Ham's F-12 (3:1) (Gibco, MA, USA) supplemented with 10% FCS, epidermal growth factor (EGF; 10 ng/ml, R&D Systems), insulin (5 mg/ml, Sigma-Aldrich), cholera toxin (8 ng/ml, Sigma-Aldrich), hydrocortisone (0.4 mg/ml, Sigma), triode-thyronine (1.3 ng/ml, Sigma-Aldrich) and adenine (24 mg/ml, Sigma-Aldrich). Fibroblasts obtained after collagenase digestion were seeded ( $70,000$  cells/cm<sup>2</sup>) in DMEM (Gibco, MA, USA) plus 10% FCS. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium was replenished every 72 h.

### 2.4. Cell culture and polymer scaffold seeding

Dermal fibroblasts or primary endothelial cells from vascular endothelium (HUVEC, ATCC CRL-1730) were seeded onto the dry surface of ultraviolet-sterilized (20 min) polymer meshes or Marriderm<sup>®</sup> and allowed to adhere for 20 min. Thereafter, meshes were placed into 24-well plates filled with culture medium and incubated for a further 72 h. *medium* was then removed and scaffolds were washed with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, MA, USA), fixed with 2% paraformaldehyde, washed again with PBS, labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and visualized with a fluorescence microscope.

### 2.5. Proliferation assay

Primary cultures of dermal fibroblasts or endothelial cells were seeded at  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> or  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>,

respectively, onto polymeric sheets in the appropriate medium. Proliferation was measured after 72 h using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 460 nm using a microplate reader (Victor3 1420 Multilabel Counter; PerkinElmer Inc., MA, USA). The experiment was performed three times.

### 2.6. Scaffold subcutaneous implantation in rats

Adult male Wistar rats ( $n = 15$ ) were anesthetized with isoflurane and a 2-cm<sup>2</sup> subcutaneous pocket was made at the dorsal region. Scaffold material (4 cm<sup>2</sup>) was implanted subcutaneously placed on top of the muscular fascia and the skin was sutured with Monosyn 3/0 (B/Braun, Melsungen, Germany).

### 2.7. DE and implantation in NOD/SCID mice

To prepare the DE, fibroblasts (final concentration  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were suspended in 10 ml of human plasma containing 10 mg of the antifibrinolytic agent tranexamic acid (Amchafibrin; Fides Ecopharma SA, Madrid, Spain). The final volume was adjusted to 23 ml with saline (0.9% NaCl), and 2 ml of CaCl<sub>2</sub> (2% in saline) was added to start plasma coagulation. For DE casting, the mixture was dispensed into a 100-cm<sup>2</sup> culture plate and allowed to solidify at 37°C (about 20 min). In some experiments, DE were cast onto a polymer mat. The gel was then covered with KCM without EGF for 12 h. Subsequently,  $5\text{--}12 \times 10^6$  keratinocytes/cm<sup>2</sup> were seeded onto the fibrin with or without fibroblast gel using the same KCM. Medium was replenished with KCM plus EGF after three days. Cell growth was observed with an inverted microscope until confluence (10–12 days).

For human xenograft studies, casted DE with or without polymeric scaffolds were implanted onto NOD/SCID mice. Briefly, DE-scaffold composites were implanted onto full-thickness skin defects created surgically on the dorsal region of mice and were covered with frozen denatured autologous mouse skin to protect the human graft. The animal groups used were: (1) DE implanted without scaffold; (2) DE with MD scaffold; and (3) DE with PIB ( $n = 5$  mice in each group). All animals survived the surgical procedure. Grafts were examined after 2 and 4 weeks. Following sacrifice, the grafts were excised and processed for histology.

### 2.8. Histology

Histological score was calculated in immunocompetent rats from 5–10 transverse sections of 5  $\mu$ m of full-skin sections at the area of scaffold implantation. Sections were fixed with ethanol, embedded in paraffin and stained with Masson's trichrome. Anatomopathological parameters evaluated are shown in Table 2. In studies using human ED-scaffold implantation in NOD/SCID

Table 2. Histopathological analysis of BM implanted subcutaneously in the rat. The study was performed at 2 weeks

Factors evaluated (at 14 days)	MD	PCL	PHB
Biomaterial integrity	+++	+++	+
Granulomatous reaction	+++	++/+++	+++
Inflammatory infiltrate	+++	++	++
Vascular congestion	-	-	+
Haemorrhage	-	-	-
Necrosis	-	+	+

Values: (-) not detected, (+) slight presence, (++) moderate presence, (+++) strong presence

mice, a skin biopsy of 6 cm<sup>2</sup> was taken at the site of implantation four weeks after the xenografting procedure. Sections were processed as above and stained with haematoxylin/eosin (H/E), Masson's trichrome or specific antibodies against human antigens. Dermal collagen orientation was determined using Image J software with Fourier analysis, as described (Van Zuijlen *et al.*, 2002).

## 2.9. Analysis of macrophage M1/M2 inflammatory response

Macrophage profiling was performed by immunohistochemical staining in immunocompetent rats 2 weeks after scaffold implantation. Immunolabeling was performed with antibodies against CCR7 (1:100; clone ab 32527 Abcam) or CD206 (1:100; clone ab 6469393 Abcam) followed by detection with a donkey anti-rabbit Alexa 594 conjugated secondary antibody (1:200; Invitrogen) and anti-rat CD68 (1:100 dilution; clone MCA341R, BIORAD), followed by detection with a donkey anti-mouse Alexa 488-conjugated secondary antibody (1:200; Invitrogen). A total of six serial skin sections were prepared and four images of the zone surrounding the implant were taken per section with a 20× objective. Immunofluorescent images were acquired with a MR3 AxioCam camera (Zeiss) adapted to the M1 AxioImager Zeiss microscope (Zeiss). Double immunopositive cells, CCR7<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> or CD206<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>, were quantified using ImageJ. The ratio of M1 and M2 macrophages was calculated by quantifying the number of CCR7<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells (M1) and CD206<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells (M2) cells in each field.

## 2.10. *In vivo* 5-bromodeoxy-uridine labelling

One hour before sacrifice, 5-bromodeoxy-uridine (BrdU; Roche; 130 µg/g of body weight) was injected intraperitoneally into transplanted mice. After sacrifice, 1 cm<sup>2</sup> of grafted skin was recovered, fixed with 70% ethanol and processed for paraffin embedding. Tissue was sectioned in 5-µm thick slices, deparaffinized, rehydrated and blocked with methanol/water for 20 min at RT. Cellular DNA was denatured with 1 N HCl for 40 min at 37°C and then neutralized by rinsing five times with PBS for 10 min, followed by incubation with bovine serum albumin in a humidified chamber for enzyme

inactivation. After a blocking step with goat serum in PBS plus 0.2% Triton X-100, sections were incubated overnight with a murine anti-BrdU antibody and staining was revealed with diaminobenzidine. All BrdU-positive nuclei in cells from the basal layer were counted per microscope field in 3–4 sections. In total, 2000 nuclei were counted per animal and the percentage of BrdU-positive human keratinocytes was calculated by dividing the BrdU-positive cells by the total keratinocyte nuclei × 100.

## 2.11. Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed four weeks after implantation of human skin substitutes. Animals were euthanized and a full-thickness section was removed from the grafted area, washed with PBS, and fixed in ethanol. Grafted skin was analysed for the presence of lamina propria, basal stratum, granular stratum and corneal stratum with the following antibodies: anti-laminin (1:100; Abcam), anti-cytokeratin 5 (1:600; Covance, NJ, USA) and anti-human involucrin (1:100; Sigma Aldrich).

## 2.12. Analysis of vascular density

Immunohistochemical detection of vessels in human skin grafts was performed using an anti-mouse CD31 antibody (1:100; Chemicon International, CA, USA). Vessels were counted in 10 random fields under 20× magnification and the number of vessels per area unit (mm<sup>2</sup>) was scored using a fluorescence microscope and ImageJ software.

## 2.13. Morphometric analysis

Sections from implanted subcutaneous scaffolds were fixed with ethanol, paraffin embedded and stained with H/E and Masson's trichrome. A pathologist blinded to treatment groups evaluated inflammatory infiltrates. Human grafted DE were also analysed after tissue processing by morphometry and Masson's trichrome staining. Collagen fibre distribution was evaluated by Fourier analysis.

## 2.14. Electron microscopy of skin sections

Tissue was fixed in 2% glutaraldehyde and transverse skin sections of 50 µm were cut on a cryostat. Sections were postfixated in 2% osmium for 2 h, rinsed, re-hydrated and embedded in araldite (Durecupan; FuklaBiochemica, NY, USA). Serial 1.5-µm semithin sections were cut with a diamond knife and stained with 1% toluidine blue. After localization of the area of interest, ultrathin (0.05 µm) sections were cut with a diamond knife, stained with lead citrate and examined with a FEI Tecnai Spirit transmission electron microscope (Hillsboro, OR, USA).

### 2.15. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Comparisons between control and experimental groups were performed by one-way analysis of variance. Analyses were conducted with SPSS and GraphPad Prism 5 software. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  with a 95% confidence interval.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of electrospun scaffolds and *in vitro* cell biocompatibility

PHB and PCL were electrospun under similar conditions of voltage, flow rate and concentration, and the nanometric fibres were collected as a heterogeneous mesh and examined by electron microscopy (Figure 1A; top). Measurements of fibre thickness showed that the average diameter of PCL fibres was greater than that of PHB fibres (mean fibre diameter was  $2379 \pm 140$  nm and  $1603 \pm 73$  nm for PCL and PHB, respectively,  $p < 0.0001$ ; Figure 1B). To assess cell compatibility with scaffolds, dermal fibroblasts and human endothelial cells (HUVEC)

were seeded onto the polymer meshes, which were then cultured for 48 h. Matrigel<sup>®</sup> (MD), a nonporous collagen and elastin membrane, was used as a positive control scaffold. DAPI nuclear staining revealed that fibroblasts exhibited a spreading behaviour that was dependent on the polymer substrate, with the smaller diameter PHB fibres favouring cell spreading (Figure 1A; bottom). Moreover, viability of fibroblasts and endothelial cells was significantly lower on PCL scaffolds than on PHB scaffolds as determined by cell quantification using the CCK-8 assay (Figure 1C). No significant differences in cell proliferation were found between MD and PHB scaffolds, indicating a good biocompatibility of the latter (Figure 1C).

### 3.2. Biocompatibility of polymer meshes *in vivo*

Scaffold integrity was monitored 2 weeks after subcutaneous implantation in healthy rats and the foreign body response was assessed with respect to inflammation, granulomatous reaction, vascular congestion and haemorrhage (Table 2). MD and PCL scaffolds were found to be mostly intact with no macroscopic degradation, whereas PHB scaffolds showed partial degradation at

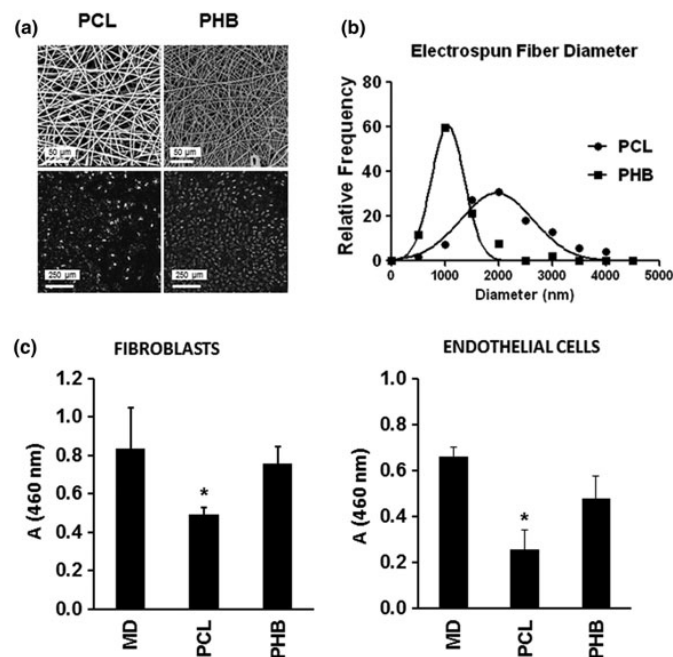


Figure 1. Characterization of polymer meshes. (A) Scanning electron microscopy of PCL and PHB electrospun scaffolds (upper panels) and nuclear staining (DAPI) of seeded dermal fibroblasts cultured for 3 days (lower panels; magnification 100 $\times$ ). (B) Nanofibre diameters of electrospun scaffolds. (C) Proliferation of dermal fibroblasts and endothelial cells on different scaffolds assessed by CCK-8 assay. The colorimetric reaction was measured at 460 nm and expressed as arbitrary units of optical density. Scale bar is indicated in each panel; \* $p < 0.05$  in PCL vs. PHB.

the time of sacrifice. All scaffold substrates induced a foreign body granulomatous reaction with abundant multinucleated cells and mononuclear cell infiltration, although the latter was moderate for PCL and PHB scaffolds (Figure 2A). No haemorrhage was observed in any group of rats. Vascular congestion induced by polymer mat implantation (indicative of angiogenesis) was particularly evident in PHB-implanted animals. Subcutaneous implantation of PCL and PHB led to a slight degree of necrosis presumably due to active remodelling, which has been observed in other studies using similar scaffolds (Bryan *et al.*, 2009) (Table 2).

The polarization profile of infiltrating macrophages was next analysed at 3, 7 and 14 days after scaffold implantation. M1-type macrophages, characterized by positive double immunostaining for CCR7/CD68, and M2-type macrophages characterized by CD206/CD68 staining, were identified by immunohistochemistry of inflammatory infiltrates at the border zone with implanted materials (Figure 2B). Whereas MD and PCL

scaffolds induced little macrophage polarization, the number of M2-type macrophages was significantly higher at the implantation site in PHB-implanted animals at all time points analysed. Accordingly, the M1/M2 ratio was  $0.51 \pm 0.07$  in MD,  $1.63 \pm 0.28$  in PCL and  $0.92 \pm 0.14$  in PHB at 3 days ( $p < 0.01$ );  $1.44 \pm 0.32$  in MD,  $1.02 \pm 0.26$  in PCL and  $0.44 \pm 0.07$  in PHB at 7 days ( $p < 0.01$ ); and  $2.05 \pm 0.30$  in MD,  $0.93 \pm 0.44$  in PCL and  $0.36 \pm 0.12$  in PHB at 14 days ( $p < 0.05$ ), indicating that PHB induces constructive remodelling *in vivo*.

### 3.3. DE viability, differentiation and organization onto electrospun scaffolds

To evaluate the influence of electrospun scaffolds on dermal-epidermal structure, DE were seeded in plastic culture dishes alone or onto scaffold-covered dishes (Figure 3A). As in control DE, MD and PHB scaffolds allowed fibroblast growth in the dermal layer of DE, and

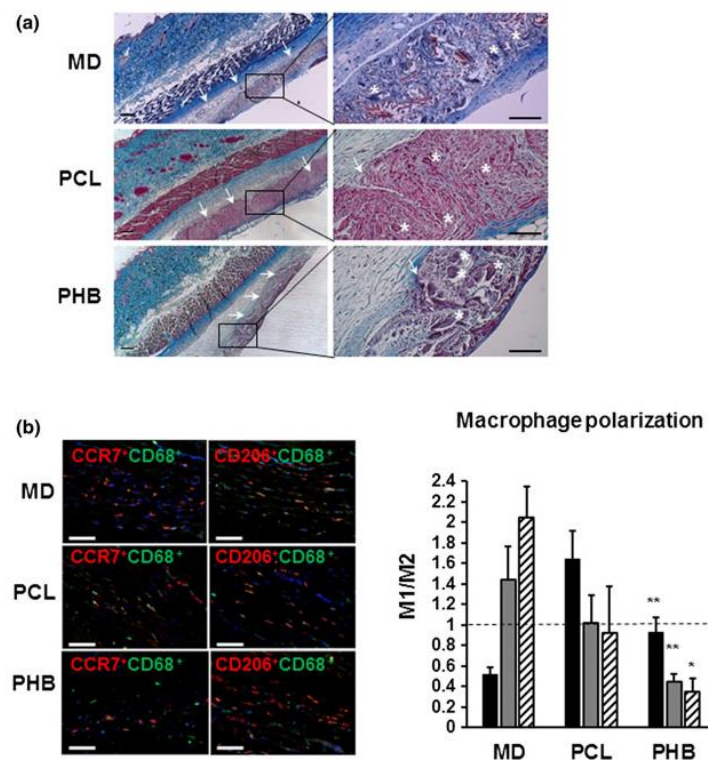


Figure 2. (A) Cross-section of epidermal and dermal tissue stained with Masson's trichrome showing scaffolds with different levels of degradation 2 weeks following implantation. Inset, detail of scaffold region at  $200\times$  magnification. White arrows point to implanted scaffolds and white stars denote multinuclear giant cells. (B) Kinetics of M1/M2 polarization 3 (black bars), 7 (grey bars) and 14 days (dashed bars) following subcutaneous implantation of MD, PCL and PHB scaffolds. Representative immunofluorescence images of dermal tissue stained for CCR7 or CD206 (red) and CD68 (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). M1 (CCR7<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>)/M2 (CD206<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>) ratio of macrophages present in the scaffold surrounding region 14 days following implantation. Scale bar is 100  $\mu$ m in A and 50  $\mu$ m in B. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

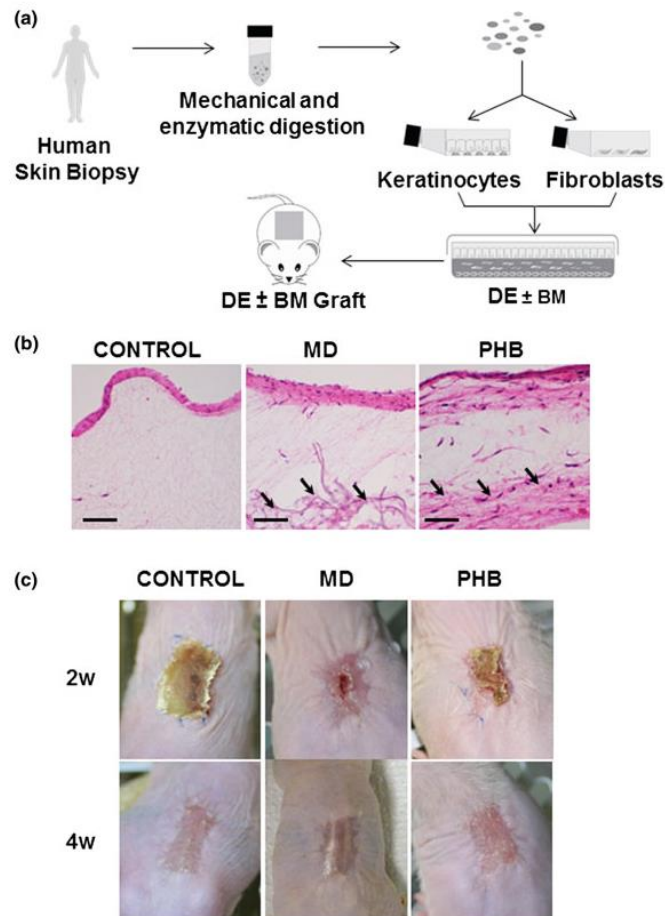


Figure 3. (A) Schematic diagram of human skin biopsy processing and DE culturing with or without biomaterial scaffold (BM). (B) Sections of DE comprising keratinocytes cultured as a layer on top of fibrin–fibroblasts gel for 10 days with or without polymeric scaffold. DE were processed for paraffin embedding and H/E staining. Black arrows point to scaffold fibres at the bottom of DE. Photomicrographs were taken at  $200\times$  magnification. (C) Macroscopic appearance of grafted DE with or without scaffolds at 2 and 4 weeks following implantation. Representative images of mice from each group are shown. Scale bar is  $50\text{ }\mu\text{m}$  in B [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

both scaffolds supported epidermal stratification (Figure 3 B). By contrast, the DE was completely distorted after seeding onto the PCL scaffold, resulting in the mixing of keratinocytes and fibroblasts (not shown). Because of this, the PCL polymer was excluded from further analysis.

#### 3.4. Macroscopic assessment of engrafted DE skin grafts in NOD/SCID mice

DE-scaffold composites ( $6\text{ cm}^2$ ) were implanted onto the dorsal region of NOD/SCID mice as described in Materials and methods. Animals implanted with DE but without scaffolds were used as a control. Macroscopic assessment

at 2 weeks post-grafting revealed that the majority of animals remained covered with autologous denatured skin, but after 4 weeks the crust of denatured mice skin cover had fallen off and newly formed human skin appeared below (Figure 3C). Indeed, all groups showed good engraftment of DE and no macroscopic differences were observed among the three groups (Figure 1).

#### 3.5. Microscopic assessment of engrafted DE skin grafts in NOD/SCID mice

Mice were euthanized 1 month after implantation and human skin grafts were sectioned and stained with H/E



and Masson's trichrome or immunostained with specific antibodies to unequivocally identify human keratinocytes in the engrafted area. Similar to native human skin, immunopositive staining for laminin was observed in basal lamina of all mice (Figure 4). Differences between hosts and human grafts were clearly detected by H/E and trichrome staining, particularly with regards to the presence of hair follicles and the abundant sebaceous glands in mouse skin. MD and PHB mats were present at the time of sacrifice (black arrows in Figure 4), with the consequent increase in dermal thickness. Biodegradation processes appeared very active around the grafts as

demonstrated by the presence of granulomatous cells, presumably from murine origin. Hair follicles were absent at the graft site and the number of epidermal papillae was very low in comparison with nonwounded areas (Figure S2). Positive staining of keratinocytes with CCK5 (red) and human involucrin (green) was observed in the grafts. Epidermal thickness was  $27.78 \pm 9.37 \mu\text{m}$  in MD-implanted animals and  $46.55 \pm 18.80 \mu\text{m}$  in PHB-implanted animals, which is comparable to the  $30\text{-}\mu\text{m}$  thickness measured in normal skin. Collagen fibre alignment in control (without scaffold), MD and PHB animals, calculated from Masson's trichrome-stained

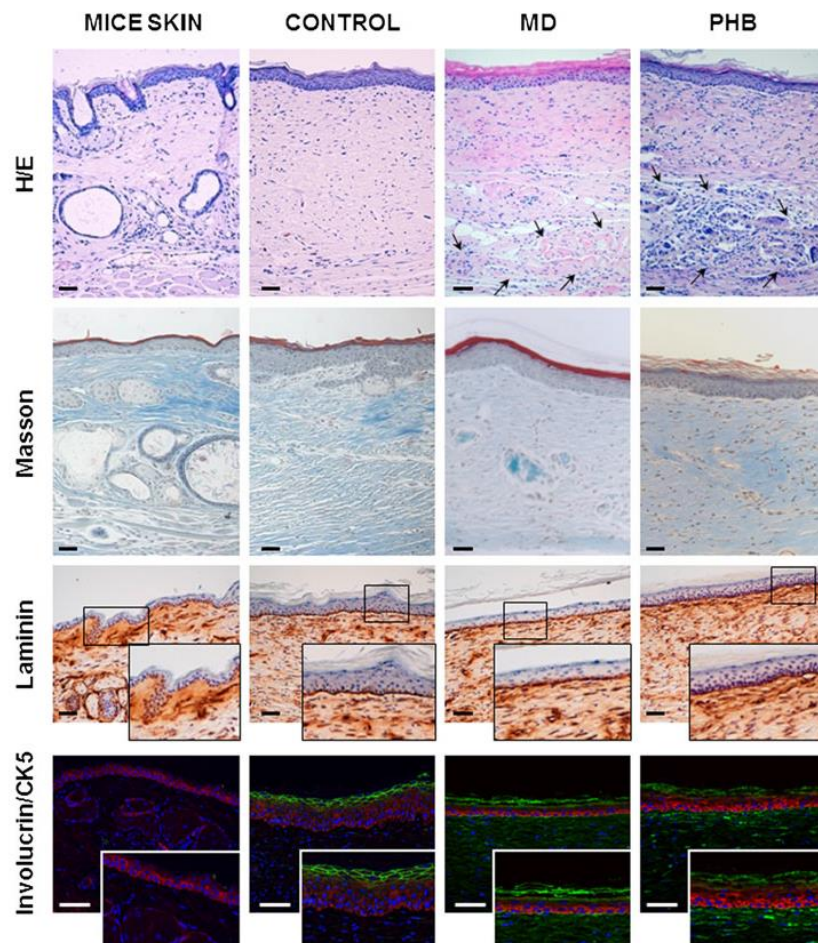


Figure 4. Histological appearance of grafted DE, with or without MD or PHB, in the dorsal region of NOD/SCID mice. Sections of biopsies taken at graft site 4 weeks after implantation of DE were stained with H/E, Masson's trichrome or specific antibodies against laminin, involucrin and cytokeratin 5. Normal undamaged mouse skin is also shown. Photomicrograph magnification was  $200\times$  for H/E and laminin staining,  $100\times$  for trichrome and  $400\times$  for involucrin/cytokeratin 5 double immunostaining. Scale bar is  $50 \mu\text{m}$  in all panels [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



#### Electrospun poly(hydroxybutyrate) for skin repair

sections with Fourier's equation was  $0.68 \pm 0.13$ ,  $0.57 \pm 0.04$  and  $0.66 \pm 0.17$ , respectively, indicating no scarring or fibrotic alignment of collagen fibres after implantation of the scaffolds.

#### 3.6. Electron microscopy analysis of DE skin grafts

Ultrathin sections of skin grafts were analysed by electron microscopy (Figure 5). MD and PHB skin grafts had increased stratification relative to controls without scaffold, particularly in the PHB group (Figure 5A–F). No differences in epidermal–dermal junctions were observed among groups and keratinocyte hemidesmosome junctions at the site of the basal lamina were observed in all animals (arrows in Figure 5G–I). Vessels and fibroblasts were abundant in the PHB group (Figure 5F). Generally, a more complex dermal architecture was detected in human DE

implanted with scaffolds than in controls (compare Figures 5E, 5F and 5D).

#### 3.7. Keratinocyte proliferation and angiogenesis in DE skin grafts

Epidermal proliferation of keratinocytes *in vivo* was analysed by BrdU incorporation. No differences were observed among groups. Accordingly, the percentage of BrdU-positive cells was calculated as  $13 \pm 3.39\%$  in control,  $12.1 \pm 3.54\%$  in MD group and  $11.5 \pm 1.29\%$  in PHB group (Figure 6A), indicating the absence of neoplasia after scaffold implantation.

Angiogenesis in skin grafts was quantified 1 month following implantation of DE and scaffolds by scoring the number of vessels immunopositive for CD31 (Figure 6B). Vessel density was significantly higher in PHB implants than in control and MD grafts (Figure 6B).

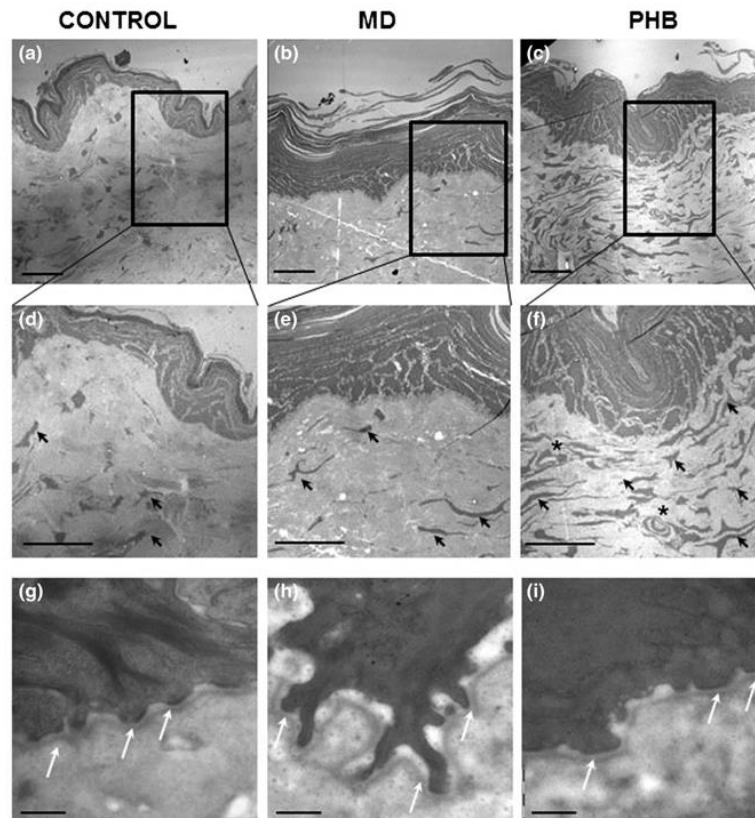
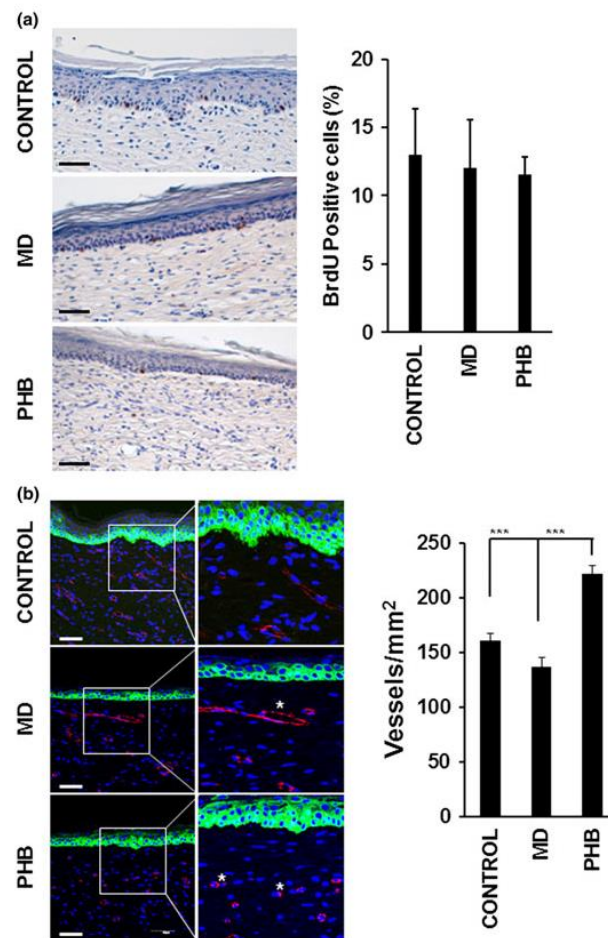


Figure 5. Transmission electron microscopy images of ultrathin sections corresponding to human skin grafts from control, Matrigel and PHB groups. Stars denote blood vessels and black arrows point to fibroblasts in the dermis. White arrows point to hemidesmosomes at the basal lamina. Scale bar was 20  $\mu\text{m}$  in A–F and 500 nm in G–I



**Figure 6.** Epidermal keratinocyte proliferation and dermal vasculogenesis in human xenografts 4 weeks following implantation of DE with or without scaffolds. (A) Representative images of BrdU incorporation in proliferating keratinocytes in grafted human epidermis (200 $\times$  magnification). The percentage of BrdU<sup>+</sup> cells was quantified in each group. (B) Representative immunofluorescence images of grafted human dermis stained for CD31 (red) to label blood vessels (white asterisks) in NOD/SCID mice transplanted with human DE-scaffold composites. Keratinocytes in epidermis were stained with cytokeratin 5 (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). The total number of vessels in the graft was quantified 4 weeks following implantation (n = 5 in each group; <sup>\*\*</sup> $p < 0.001$ ). Images were taken at 400 $\times$  magnification. Scale bar is 50  $\mu$ m in all panels [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Thus, PHB scaffold implantation in combination with DE resulted in greater neoangiogenesis.

#### 4. Discussion

Although much effort has been directed to improving treatments for burns patients (Lu and Huang, 2013), few changes in clinical practice have been made in the past

years and autologous skin equivalent transplantation remains the only definitive treatment (Gallico *et al.*, 1984). Key limitations of this procedure, however, include the requirement for cell expansion from small skin biopsies and the surgical DE handling, as these composites are thin flat gelatinous structures that are difficult to apply to challenging anatomical areas such as the axilla or neck.

Electrospun scaffolds comprising biodegradable polymers show promise in dermal wound-healing

applications (Blackwood *et al.*, 2008); nevertheless, their utility for *in vivo* human skin xenografting has not been fully investigated. Among the best characterized of these are poly(lactic acid-co-glycolic acid) (Kumbar *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2006), PCL (Chong *et al.*, 2007; Kobsa *et al.*, 2013), chitosan (Duan *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008), and gelatine (Chong *et al.*, 2007; Powell and Boyce, 2008). Although less studied, that the biocompatibility of PHB *in vitro* and its reparative properties *in vivo* have been demonstrated (Asran *et al.*, 2010; Castellano *et al.*, 2014; Zonari *et al.*, 2015).

In the present work, it is shown that PHB scaffolds sited at the base of human DE produce a more stratified epidermis than controls (no scaffold), which presumably improves the mechanical properties of the graft. This contention is supported by the following observations: (1) PHB is superior to PCL and similar to MD, the positive control, in terms of cell adhesion and proliferation; (2) PHB has good degradability relative to the other biodegradable scaffolds such as PCL, which offers additional advantages for human use. Given that PHB scaffolds favour fibroblast proliferation and acknowledging these cells as significant components of granulation tissue, both the amount and composition of granulation tissue could account for PHB constructive remodelling; (3) PHB favours the assembly and handling of DE-scaffold composites, whereas DE-PCL composites were impossible to form as keratinocytes were disarranged and failed to stratify *in vitro* (not shown). In this context, the poor compatibility of fibroblasts and keratinocytes with electrospun PCL scaffolds and epidermal and dermal layer intermixing has been reported in a previous study (Powell and Boyce, 2009); (4) M2 macrophage polarization is considered a critical step to stimulate regenerative wound healing vs. scarring (Guo *et al.*, 2015), and it is demonstrated here that PHB induces M2 macrophage polarization in rats. This is in accordance with earlier studies demonstrating M2 macrophage polarization when PHB scaffolds were implanted onto the surface of rat hearts (Castellano *et al.*, 2014). In the present study, M1 macrophages accumulated on day 3 and declined significantly by day 7–14 in wounded areas surrounding PHB and PCL scaffolds, a phenomenon that did not occur after implantation of MD scaffolds. This depletion of macrophages prevents scarring in wounded tissue and contributes to resolution of the granulomatous reaction (Lucas *et al.*, 2010; Mimura *et al.*, 2016). Conversely, the decline of M2 macrophages was less pronounced in animals implanted with PHB scaffold than in those implanted with MC or PCL scaffolds. While the

influence of fibre size and the density of the fibre mesh cannot be discarded, the strong M2 polarization observed at all time points analysed after scaffold implantation suggests that PHB polymeric properties favour wound regeneration; (5) BrdU labelling indicated no changes in proliferation rate at the epidermal level, pointing to the absence of hyperplasia and a proper re-epithelization process, which supports the safety of these scaffolds in clinical trials; and (6) PHB increases angiogenesis at the site of implantation. Since angiogenesis is a critical step for cellular engraftment of donor skin grafts, it is postulated that a polymer scaffold that promotes angiogenesis will be a promising candidate to improve the survival of engrafted DE.

## 5. Conclusion

The present study provides the first demonstration that PHB scaffolds improve skin graft implantation and repair. The main advantages of PHB include handling of DE together with cell affinity, vasculogenesis and stimulation of constructive tissue remodelling. Although further investigations in human trials will be required to determine whether PHB is a good alternative to existing biomaterials, the current results point to PHB as an excellent substrate for therapeutic intervention.

## Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

Supported in part by grants from Aitex, Ministerio de Economía y Competitividad, INNPACKTO (PI-2012-0681-300000) and RETOS (RTC 2015 4185 1) programmes, and RETICS programme from Instituto de Salud Carlos III (RD12/0019/0025) cofunded by FEDER *una manera de hacer Europa*. DC is supported by INNPACKTO grant. PS acknowledges support from Miguel Server I3 SNS. B.P. acknowledges support from ISCIII (PI10/01621, CP09/00333, PI13/414), ISCIII (PI16/00129, PI13/02144, CPII15/00017) and ERA-NET (NanoReHeart). We thank M. Soriano for electron microscopy and P. Marín at the core facility of confocal microscopy-IISLAFE. We are grateful to all patients who donated clinical samples. We thank the Pathology Service of Hospital La Fe for histological staining. We thank Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana for providing human plasma. We thank Dr Kenneth McCreath for helpful comments on the manuscript.

## References

- Acem A, Razghani S, Aggarwal N *et al.* 2010; Nanofibers from blends of poly(vinyl alcohol) and poly(hydroxy butyrate) as potential scaffold material for tissue engineering of skin. *Biomaterials* 31(12): 3419–3421.
- Aslan S, Volcan E, Revzin A *et al.* 2008; Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng Part A* 14(11): 1832–1842.
- Blackwood SA, McKenna P, Ganton I *et al.* 2008; Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. *Biomaterials* 29(21): 2091–2104.
- Boyce ST, Kayan R, Meyer NA *et al.* 1999; The 1999 clinical research award. *Advanced skin substitutes combined with Integra Artificial Skin to replace rat skin autograft and allograft for the closure of excised full-thickness burns. J Burn Care Rehabil* 20(6): 453–461.
- Brown BN, Lindero R, Tetley S *et al.* 2012; Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. *Acta Biomater* 8(3): 978–987.

- Sydn K, Rhodes NJ, Hunt JA. 2009; Derivation and performance of an entirely autologous injectable hydrogel delivery system for cell-based therapies. *Biomaterials* 30(2): 185–188.
- Sye E, Baselli J, Black J et al. 2013; Development of fibrous and layered nanofibrillar/nanofibrous scaffolds for regenerative medicine. *Biomater Sci* 1(9): 949–951.
- Castellano D, Sousa M, Horta A et al. 2014; A comparison of electrospun polymers versus poly(3-hydroxybutyrate) fiber as a superior scaffold for cardiac repair. *Stem Cells* 32(11): 1479–1490.
- Chen L, Calabro A, Rodriguez EE et al. 2011; Characterization of art bone response to pyramine substituted-hyaluronic scaffold: fascia extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med* 22(6): 1466–1477.
- Chong EC, Phan TT, Lim J et al. 2007; Evaluation of electrospun PCL/poly(lactic acid) scaffold for wound healing and layered dermal reconstruction. *Acta Biomater* 3(3): 321–330.
- Dai NT, Yeh MK, Lin CC et al. 2005; A reconditioned skin model based on cell support membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 329(3): 905–908.
- Chen B, Wu L, Li X et al. 2007; Degradation of electrospun P(LGA-chitosan)/PVA membranes and their cytocompatibility *in vitro*. *J Biomater Sci Polym Ed* 18(1): 95–115.
- Epstein WL, Palanga V. 1995; Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Crit Rev* 19(5): 891–905.
- Estrella HP. 2004; Understanding experimental biology: sixth equivalent from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. *Am J Surg* 187(5A): 595–595.
- Gálvez GG, Odell O'Connor NE, Conpton CC et al. 1984; Permanent coverage of large burn wounds with autogenous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311(7): 418–421.
- Garc K, Ward CL, Corcos ST. 2014; Asynchronous inflammation and myogenic cell migration limit muscle tissue regeneration mediated by a cellular scaffold. *Inflamm Cell Signal* 1(1): e390.
- Gro R, Medel AR, Stealing JA et al. 2015; Substrate modulus of 3D-printed scaffolds regulates the regenerative response in subcutaneous implants through the macrophage phenotype and Wnt signaling. *Biomaterials* 73: 63–75.
- Han L, Sahn SJ, Kim JY et al. 2007; Effect of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofiber matrices combined with hair follicular epithelial and dermal cells for biological wound dressing. *Artif Organs* 31(11): 801–806.
- Kadawa K, Gu G, Kado T et al. 2004; Treatment of full-thickness skin defect with concentrated grafting of 6-fold expanded mesh autologous and allogeneic cultured dermal substitutes. *Artif Organs* 28(5): 444–450.
- Kobayashi S, Kikuchi NI, Sawada A et al. 2013; An electrospun scaffold integrating nucleic acid delivery for treatment of full-thickness wounds. *Biomaterials* 34(15): 3851–3861.
- Kraft R, Herder DN, A-Morales AM et al. 2017; Burn size and survival probability in paediatric patients in modern burn care: a prospective observational cohort study. *Lancet* 379(9820): 1019–1021.
- Kumar SG et al. 2008; Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 29(30): 4103–4107.
- Lu G, Huang S. 2013; Bioprinted skin substitutes: key elements and novel design for biomedical applications. *Int Wound J* 10(4): 365–371.
- Luras, Waxman A, Tanian R et al. 2010; Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184(7): 3564–3577.
- Mimura KK, Morita AR, Miranda AC et al. 2016; Mechanisms underlying heterogenic skin scaffold-mediated tissue remodeling. *Sci Rep* 6: 25574.
- Pan H, Jiang H, Chen W. 2014; Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dentan and poly lactide-co-glycolide. *Biomaterials* 27(17): 3209–3220.
- Peng Z, Gao W, Yue S et al. 2016; Promotion of neurological recovery in rat spinal cord injury by mesenchymal stem cells loaded on nerve-guided collagen scaffold through increasing alternatively activated macrophage polarization. *J Tissue Eng Regen Med*. <https://doi.org/10.1002/term.2338>.
- Powell HM, Boyce ST. 2007; Wound closure with EDC cross-linked cultured skin substitutes grafted to athymic mice. *Biomaterials* 28(6): 1081–1082.
- Powell HM, Boyce ST. 2008; Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal-epidermal skin substitutes. *J Biomed Mater Res A* 84(4): 1078–1086.
- Powell HM, Boyce ST. 2009; Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Eng Part A* 15(8): 2177–2187.
- Rachowild JG, Goren H. 1973; Formation of a keratinizing epithelium culture by a cloned cell line derived from a carcinoma. *Cell* 6(3): 371–380.
- Rysal H, Gernsman R, Gernsman G et al. 2005; The use of Mar-Derm in early excision and immediate autologous skin grafting in burns – a pilot study. *Burns* 31(1): 95–97.
- Sahler K, Stellas K, Allen RW et al. 2016; Developing a pro-regenerative biomaterial scaffold microenvironment requires T helper 2 cells. *Science* 352(6283): 366–375.
- Swanston O, Wadsworth-Chapman S, Santhavamski N et al. 2007; *In vivo* biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *Int J Biol Macromol* 40(3): 217–223.
- Van Zuijlen PP, de Vries HJ, Lomax RN et al. 2002; Morphometry of dermal collagen degradation by Fourier analysis is superior to multiobserver assessment. *J Pathol* 199(3): 284–291.
- Vasconcelos JM, Fonseca AC, Costa M et al. 2013; Macrophage polarization following chitosan implantation. *Biomaterials* 34(36): 9552–9559.
- Veleichko A, Coelho DS, Das P et al. 2012; Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. *Int J Biol Macromol* 51(4): 343–355.
- Wang Z, Cui Y, Wang J et al. 2014; The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(ε-caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration. *Biomaterials* 35(22): 5700–5710.
- Yuan J, Gong J, Xing Z et al. 2015; Novel wound dressing based on nanofibrous PEG/keratin mats. *J Tissue Eng Regen Med* 9(9): 1027–1035.
- Zhou Y, Yang D, Chen X et al. 2008; Electrospun water-soluble chitosan/chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. *Biomacromolecules* 9(1): 349–354.
- Zonari A, Martins TM, Paula AC et al. 2015; Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. *Acta Biomater* 17: 175–181.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Supplementary Figure 1. Macroscopic images of five animals from each group (control, MD and PHB) at 2 and 4 weeks after implantation of human DE showing the grafted area.

Supplementary Figure 2. Images of engrafted human skin at 4× magnification (scale bar 1 mm) and 100× magnification (Scale bar 100 μm). Arrows point to the marginal zones of the lesions.