

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**

**UTILIZACIÓN DE UNA FUENTE ALTERNATIVA DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE  
MUCOSA VESICAL HUMANA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

**DOCTORADO DE BIOMEDICINA**



Tesis doctoral de:  
**BORIS DAMIÁN JAIMES PARRA**

Realizado bajo la dirección de:  
**Dr. Antonio Campos Muñoz**  
**Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello**

**Granada, España, 7 de Febrero de 2017**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Boris Damián Jaimes Parra  
ISBN: 978-84-9163-150-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45489>

# **UTILIZACIÓN DE UNA FUENTE ALTERNATIVA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE MUCOSA VESICAL HUMANA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

**Memoria que presenta el licenciado en Medicina  
Boris Damián Jaimes Parra  
para aspirar al título de Doctor**

**Fdo. Boris Damián Jaimes Parra**

**VºBº Director de Tesis**

**VºBº Director de Tesis**

**Fdo. Dr. D. Antonio Campos Muñoz  
Doctor en Medicina y Cirugía**

**Fdo. Dra. Dª. Ingrid J. Garzón Bello  
Doctora en Ingeniería Tisular**

**Departamento de Histología  
Universidad de Granada**

**201**

El doctorando Boris Damian Jaimes Parra y los directores de la tesis: Dr Antonio Campos Muñoz y Dra Ingrid Johanna garzón Bello.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos con otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / place and date

Granada, 7 de Febrero de 2017

Directores de tesis

Dr. Antonio Campos Muñoz

Dra. Ingrid Garzón Bello

Doctorando

Boris Damian Jaimes Parra

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada parcialmente por los Proyectos de Investigación FIS PI14/0955 y FIS PI15/2048 del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio Español de Economía y Competitividad).**

**Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico original:**

***Jaimes-Parra BD, Valle-Díaz de la Guardia F, Arrabal-Polo MÁ, Herrera-Imbroda B, Lara MF, Machuca-Santa-Cruz FJ, Campos A, Alaminos M, Crespo PV, Garzón I. Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. Int J Urol. 2016 Jan;23(1):85-92. doi: 10.1111/iju.12963. Epub 2015 Oct 26.***

***Factor de Impacto: 1.878; Área: Engineering, Biomedical; Percentil: 47***

***“Nuestro conocimiento es necesariamente finito, mientras que nuestra ignorancia es necesariamente infinita.”***

Karl Popper.



# AGRADECIMIENTOS



La presente Tesis Doctoral refleja no sólo el esfuerzo del investigador principal, sino también el esfuerzo y apoyo de un equipo de personas que, con sus conocimientos y consejos, me permitieron alcanzar los objetivos propuestos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis Doctoral, quienes son las personas de las que más he aprendido a lo largo de este arduo y fructífero camino, y de las que espero seguir aprendiendo siempre.

Gracias al Prof. Antonio Campos Muñoz, un hombre que con su pasión por la vida y las ciencias, me enseñó que cuando deseas algo hazlo, sin importar si fallas, continúa, porque con cada fallo estarás más cerca de encontrar la solución.

Gracias a la Prof. Ingrid Garzón Bello, una de las personas que más admiro, no sólo como investigadora y docente, sino también por el gran ser humano que ama las artes, que aprecia y comprende a sus estudiantes no sólo a nivel académico, sino también a nivel personal.

Gracias al Prof. Miguel Alaminos Mingorance, una de las personas más brillantes que jamás he conocido. Me enseñó que no existen límites para el deseo de aprender, que todo conocimiento es importante y que merece ser aprendido.

También, quiero agradecer al resto de profesores y profesoras del departamento de histología de la universidad de Granada, por apoyarme siempre que lo necesite y hacerlo siempre con alegría.

Gracias a todo el Grupo de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, por su paciencia, apoyo y consejos, los cuales llevaré conmigo con un especial aprecio. Porque como siempre he dicho, más que un grupo de investigación, es para mí una familia, a la cual estoy orgulloso de pertenecer.



A mis padres, a mi hermana y a mi novia, les agradezco de todo corazón por su incondicional apoyo así como por sus consejos. Es a ustedes a quienes dedico esta Tesis Doctoral. Siempre han sido y serán el pilar fundamental de mi vida. De corazón muchas gracias por su amor.

Por último, hago extensible mi sincero y gran agradecimiento al Dr. Tomás Sola Martínez, por su apoyo y por su ayuda. De corazón muchas gracias.

Muchas Gracias , con total sinceridad.



# ÍNDICE



INTRODUCCIÓN .....	1
1. SISTEMA URINARIO .....	3
1.1 Riñones.....	4
1.1.1 Embriología del riñón .....	4
1.1.2 Anatomía del riñón .....	4
1.1.3 Histología del riñón .....	5
1.2 Vías urinarias .....	7
1.2.1 Uréteres .....	7
1.2.1.1 Embriología del uréter .....	7
1.2.1.2 Anatomía del uréter .....	7
1.2.1.3 Histología del uréter .....	8
1.2.2 Vejiga urinaria .....	9
1.2.2.1 Embriología de la vejiga.....	9
1.2.2.2 Anatomía de la vejiga .....	9
1.2.2.3 Histología de la vejiga .....	11
1.2.3 Uretra .....	11
1.2.3.1 Embriología de la uretra.....	11
1.2.3.2 Anatomía de la uretra .....	12
1.2.3.3 Histología de la uretra .....	13
1.2.4 Histología comparada de las principales vías urinarias .....	14
1.3 Patologías Urinarias .....	20
1.3.1 Patologías Ureterales .....	20
1.3.2 Patologías de la vejiga .....	23
2. Ingeniería tisular .....	26
2.1 Ingeniería tisular de las vías urinarias.....	29
2.1.1 Ingeniería tisular del uréter.....	29
2.1.2 Ingeniería tisular de la vejiga urinaria.....	30
2.2 Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (HWJSC).....	33
OBJETIVOS .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
1. Generación de cultivos primarios de células de mucosa urinaria humana y de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton .....	41
1.1. Cultivo de células epiteliales procedentes de mucosa urinaria.....	42
1.2. Cultivo de células estromales procedentes de mucosa urinaria.....	42
1.3. Cultivo de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (HWJSC).....	42
2. Generación de sustitutos de mucosa urinaria humana mediante Ingeniería Tisular .....	44
2.1 Generación de un sustituto estromal de mucosa urinaria.....	45
2.2. Generación de un sustituto epitelial de mucosa urinaria .....	46
2.3. Inducción del proceso de diferenciación urotelial de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton en los sustitutos epiteliales de mucosa urinaria .....	47
2.4. Nanoestructuración y generación de estructuras tubulares .....	48
3. Análisis histológico .....	50
3.1. Microscopía óptica .....	50
3.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	50
3.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	51



<b>4. Análisis histoquímico .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Método histoquímico de Picrosirius .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2. Método histoquímico reticulina de Gomori .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3. Método histoquímico azul alcian .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4. Método histoquímico con ácido periódico de Schiff (PAS) .....</b>	<b>53</b>
<b>5. Análisis mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Análisis de viabilidad celular .....</b>	<b>57</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
<b>1. Generación y caracterización histológica de sustitutos ortotípicos de mucosa urinaria humana utilizando células nativas .....</b>	<b>59</b>
<b>2. Caracterización de la fuente alternativa utilizada de células madre mesenquimales (células mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical -HWJSC-).....</b>	<b>60</b>
<b>2.1. Citometría de flujo .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2. Caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica de las HWJSC mantenidas en cultivo .....</b>	<b>61</b>
<b>3. Caracterización histológica de los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana utilizando HWJSC como fuente celular alternativa .....</b>	<b>65</b>
<b>4. Caracterización histoquímica de los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana utilizando HWJSC como fuente celular alternativa .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1. Componentes fibrilares .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2. Componentes no fibrilares .....</b>	<b>71</b>
<b>5. Caracterización inmunohistoquímica e inmunofluorescente de los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana utilizando HWJSC como fuente celular alternativa .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. Expresión de citoqueratinas .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2. Expresión de proteínas de unión intercelular .....</b>	<b>80</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>102</b>



# INTRODUCCIÓN



La ingeniería tisular es una rama pionera de la investigación, la cual en las últimas décadas ha desarrollado grandes avances en los manejos y tratamientos de patologías. Dichos manejos convencionales son insuficientes e incluso en algunos casos nocivos para el mismo paciente. Una de las ramas que se ha visto beneficiada con estos grandes avances ha sido la urología. Dentro del campo de la ingeniería tisular, los manejos y la creación de tejidos artificiales con células madre abren actualmente una gran puerta de posibilidades para el manejo de patologías urológicas. En este contexto las células madre de la gelatina de Wharton presentan un enorme potencial para el desarrollo de nuevos manejos y tratamientos en el campo de la urología. En la presente Tesis Docotoral se explicaran las características del sistema urinario tanto anatómicas, embriológicas como histológicas. Así mismo, se explicaran las diversas patologías urológicas y sus actuales manejos, así como los efectos adversos y las limitaciones que dichos manejos presentan. Finalmente en este trabajo se expondrán los avances de la ingeniería tisular en el campo urológico, y el potencial actual de las células madre de la gelatina de Wharton.



## 1. SISTEMA URINARIO

El sistema urinario (1) está conformado por dos riñones, y las vías urinarias conformadas por dos uréteres, la vejiga urinaria y la uretra (Figura 1).

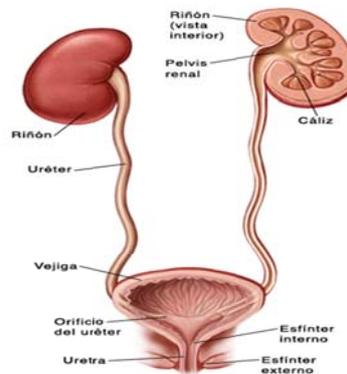


Figura 1. Imagen extraída de

<http://dellchildrens.kramesonline.com/spanish/HealthSheets/3,S,40092>. Esquema ilustrativo de la organización anatómica del sistema urinario

En general, el tracto urinario es esencialmente igual tanto en hombres como en mujeres. Las funciones del sistema urinario son fundamentales debido a que las células del cuerpo humano todos los días generan desechos entre los que se encuentran electrolitos, urea, ácido úrico, creatinina, entre otros. Estos desechos son tóxicos para el cuerpo humano, por esta razón, son llevados al torrente sanguíneo y de allí trasladados al sistema urinario donde son depurados, filtrados, almacenados de forma transitoria y posteriormente eliminados. El principal desecho es la orina el cual, el cual es un líquido orgánico, transparente y amarillento, compuesto de sustancias de desechos de las células, cuya composición es primordialmente agua, sales minerales, urea, ácido úrico y creatinina. En este contexto, los órganos encargados de la producción continua de la orina son los riñones; una vez producida la orina en los riñones, pasa a los uréteres que son conductos de forma cilíndrica cuya función es la de transportar la orina desde los riñones hasta la vejiga urinaria. Fundamentalmente en la vejiga urinaria la orina es almacenada y acumulada para luego ser evacuada intermitentemente a través de la uretra, el órgano de excreción final de la orina por donde es expulsada al exterior (2).



## **1.1 Riñones:**

### **1.1.1 Embriología del riñón:**

Durante la etapa embrionaria, se forman tres grupos de riñones. El primer grupo también llamado pronefros son estructuras no funcionales las cuales son bilaterales y transitorias, que aparecen en el embrión al principio de la cuarta semanas. Estos pronefros, degeneran rápidamente, aunque la mayor parte de la longitud de sus conductos se mantienen y son usados por el siguiente grupo de riñones los cuales se denominan mesonefros. Los mesonefros son órganos excretorios largos y gruesos, aparecen al final de la cuarta semana. A diferencia de los pronefros, los mesonefros están bien desarrollados y funcionan como riñones provisionales durante cuatro semanas hasta que se forman los riñones permanentes. Hacia el final del primer trimestre los mesonefros degeneran. Posterior a los pronefros y mesonefros aparecen los metanefros, también conocidos como primordios de los riñones permanentes, los cuales se comienzan a formar al inicio de la quinta semana y empiezan a funcionar aproximadamente cuatro semanas después. Los riñones permanentes tienen dos orígenes uno es el divertículo metanéfrico que es una excrecencia del conducto mesonéfrico cerca de su entrada a la cloaca y el otro es el blastema metanefrógeno (1).

### **1.1.2 Anatomía del riñón:**

A nivel anatómico encontramos dos riñones, los cuales son semejantes, pero su situación retroperitoneal, paravertebral y toracoabdominal, les confiere relaciones diferentes a la derecha y a la izquierda (2,3).

En su porción externa el riñón tiene una forma de semilla de guisante, además de presentar un hilio el cual se encuentra orientado medialmente. El riñón presenta dos caras, una anterior y ubicada en dirección anterolateral, y otra cara posterior la cual es casi plana. Así mismo, dos bordes uno lateral, el cual es convexo y uno medial el cual es cóncavo, el cual se interrumpe por el



hilio renal (1,2). Además de sus caras y bordes, los riñones presentan dos polos: el polo superior, el cual es ancho, redondeado e inclinado levemente en sentido medial y el polo inferior el cual es más alargado y vertical (3). El riñón, en su porción más externa presenta una capsula fibrosa unida al parénquima renal, el cual se prolonga hacia el seno renal por las papilas, y las vías excretoras, formadas por los cálices y la pelvis renal (2).

En lo que se refiere a la irrigación arterial de los riñones, destacan las arterias renales derecha e izquierda. Además de las arterias renales, ambos riñones son irrigados arterialmente por las arterias extrarrenales e intrarrenales. Por otra parte, la irrigación venosa se encuentra dada por las venas renales derecha e izquierda respectivamente (2,3).

Para poder cumplir a cabalidad sus funciones el riñón posee un sistema de inervación el cual proviene, de los ganglios aorticorreales, de los ganglios renales, del plexo renal, de los nervios espláncnicos mayor y menor, del plexo celíaco, del ganglio mesentérico superior y en algunos casos del tronco simpático superior (2).

### **1.1.3 Histología del riñón:**

La estructura general del riñón desde el punto de vista histológico incluye estructuras tales como: capsula renal, corteza renal, medula renal, lóbulos y lobulillos renales y nefrona.

En primer lugar, la **cápsula renal** es la superficie del riñón la cual se encuentra rodeada por una capa de tejido conectivo denso, el cual consiste en una capa externa compuesta de fibroblastos y fibras de colágeno. Además contiene una capa interna que se compone de miofibroblastos (3).

En segundo lugar, **la corteza y médula renal** son estructuras del riñón que se pueden observar macroscópicamente con facilidad. La zona superficial se denomina corteza renal y la zona más profunda, medula renal (Figura 2) (1,3).

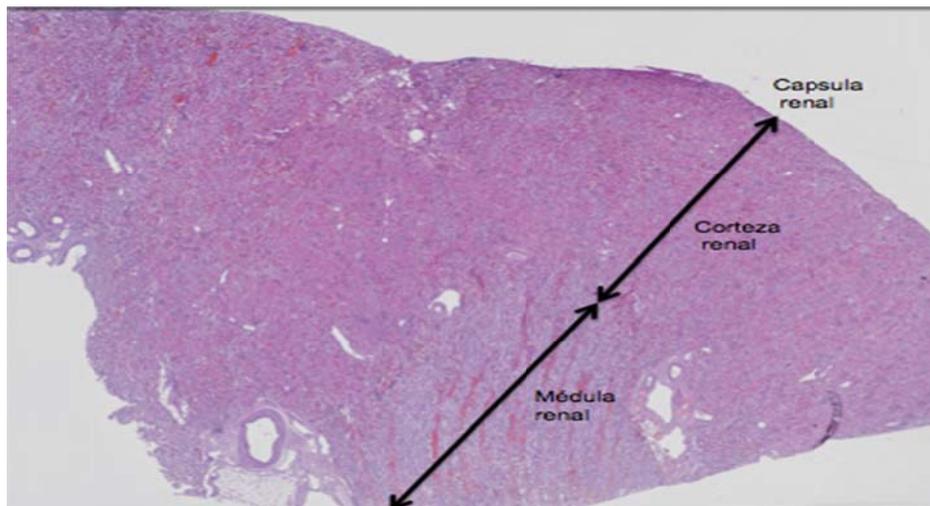


Figura 2. Corte histológico teñido con hematoxilín-eosina de riñón. Imagen tomada del microscopio virtual <http://histologia.ugr.es/departamento/>

Por otra parte, la **corteza renal** está compuesta por los corpúsculos renales junto con los túbulos rectos y los túbulos contorneados de las nefronas, los túbulos y conductos colectores así como una extensa red vascular. Cabe destacar que la nefrona es la unidad funcional básica del riñón. En el riñón encontramos aproximadamente dos millones de nefronas las cuales tienen a su cargo la producción de la orina.

En lo que se refiere a la médula renal cabe destacar que está constituida por los túbulos rectos, conductos colectores y una red capilar de vasos rectos. Los túbulos rectos de la nefrona y los conductos colectores continúan de la corteza a la medula acompañados de los vasos rectos los cuales se encuentran paralelos a los diversos túbulos (3). Debido a la distribución y las diferentes longitudes de los túbulos de la médula, en conjunto forman las pirámides medulares. Encontrando de ocho a doce pirámides a nivel renal. Estas pirámides se encuentran cada una dividida en una zona denominada medula externa y una zona denominada medula interna (3). Los **lóbulos y lobulillos renales** histológicamente están formados de la unión de cada pirámide renal y el tejido cortical asociado a la base y a sus lados. Estos lóbulos a su vez se subdividen en lobulillos formados por un radio medular central y la corteza renal que lo circunda (3).



Debido a la importancia histológica de la **nefrona** ampliaremos sobre esta estructura renal. Como se mencionó anteriormente, la nefrona es la unidad estructural y funcional del riñón. Las nefronas tienen como función la producción de orina. Podemos dividir la nefrona en dos partes: el **corpúsculo renal**, el cual está compuesto de la capsula de Bowman y el glomérulo renal formado por los capilares sanguíneos que se envuelven por la capa visceral de Bowman. Además del corpúsculo renal, la nefrona se divide en los **túbulos renales**, los cuales se pueden dividir en túbulos proximales, el segmento del asa de Henle y el túbulo distal (3).

## **1.2 Vías urinarias:**

### **1.2.1 Uréteres:**

#### **1.2.1.1 Embriología del uréter**

Embriológicamente, el desarrollo uretérico va ligado al desarrollo renal, ya que su desarrollo es originado a partir del divertículo metanéfrico o esbozo ureteral el cual es derivado del mesodermo (1,4).

#### **1.2.1.2 Anatomía del uréter:**

El cuerpo humano posee en total dos uréteres los cuales son conductos largos y finos, que se extienden desde la pelvis renal, hasta la vejiga urinaria. Cabe destacar que en su trayecto hacia la vejiga presentan una dirección vertical hacia abajo en su trayecto penetran las pelvis menor, y se dirigen en forma oblicua hacia abajo, adelante y medialmente, llegando hasta el fondo de la vejiga urinaria. Ya en la vejiga urinaria, atraviesan sus paredes y se abren en la cavidad vesical (2). Los uréteres son conductos musculares que presentan movimientos peristálticos, con los cuales desplazan la orina



intermitentemente del riñón a la vejiga. tienen aproximadamente 30-35 cm de largo en un humano adulto con un diámetro de 6-8mm (2,5,6).

La vascularización de los uréteres está dada por una irrigación arterial a través las arterias ureterales largas y cortas y la irrigación venosa, acompaña a la irrigación arterial hasta establecer una vía anastomótica entre venas ilíacas internas y venas renales. Finalmente, en cuanto a la inervación ureteral, está dada por la raíz nerviosa superior, un nervio principal inferior el cual proviene del nervio hipogástrico y por último una raíz inferior dada por el plexo hipogástrico inferior (2).

### 1.2.1.3 Histología del uréter:

Tal como mencioné previamente, el cuerpo humano posee dos uréteres, los cuales conducen la orina de la pelvis renal a la vejiga. La pared ureteral se encuentra compuesta en su porción luminal, por una capa de epitelio transicional también llamada urotelio, que convierte en impermeable al uréter además de resistente a las sustancias nocivas que componen la orina. Además del urotelio los uréteres poseen una capa de músculo liso y tejido conectivo denso irregular fibroelástico (Figura 3) (3,5,6).

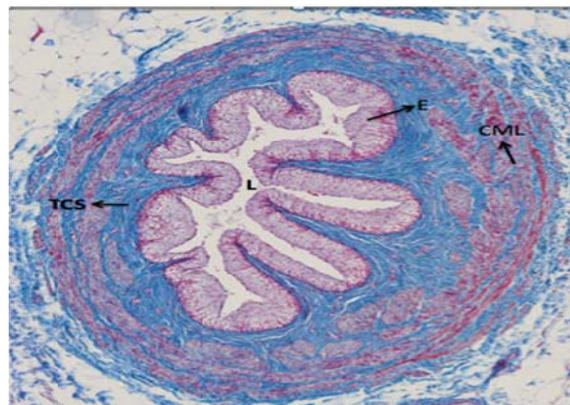


Figura 3. Corte histológico de uréter. Tinción tricromico de mason.

E: epitelio; CML: Capa musculo liso; TCS: Tejido conectivo subepitelial; L: Luz. Imagen tomada del microscopio virtual <http://histologia.ugr.es/departamento/>



La porción donde los uréteres ingresan a la vejiga es denominada como orificios ureterales, los cuales se comprimen cuando la vejiga se distiende por la orina evitando así el reflujo de orina hacia los riñones evitando lesiones e infecciones por reflujo desde la vejiga y desde la uretra(3,6).

## **1.2.2 Vejiga urinaria:**

### **1.2.2.1 Embriología de la vejiga:**

El desarrollo embriológico de la vejiga proviene del seno urogenital, dicho seno, se divide con el desarrollo en tres porciones, las cuales son una porción vesical craneal que forma la mayor parte de la vejiga, una porción pélvica media que origina la uretra en el cuello vesical y la uretra prostática en el hombre y toda la uretra de la mujer. Finalmente, una porción fálica caudal que desarrolla el pene o el clítoris rudimentario (1,4). Por otra parte cabe destacar que el epitelio de la vejiga procede del endodermo de la porción vesical y el resto de capas de la pared vesical derivan del mesénquima esplácnico adyacente (1,4).

### **1.2.2.2 Anatomía de la vejiga**

La vejiga es un órgano hueco musculo membranoso perteneciente al sistema urinario, cuya función es la de almacenar en promedio entre 250 a 300 cm<sup>3</sup> de orina para posteriormente, vaciarla a la uretra por donde será finalmente eliminada hacia el exterior. Este órgano, se encuentra ubicada en la excavación de la pelvis justo detrás del pubis. En su parte posterior se encuentra delimitada con el recto, la parte superior de próstata y las vesículas seminales en el hombre, mientras que en la mujer, su parte posterior limita con la vagina. En su parte inferior limita con los músculos perineales de la mujer y en los hombres su cara inferior limita con la próstata. En su parte superior, se encuentra recubierta por peritoneo parietal manteniéndolo separado de la cavidad abdominal.



La anatomía de la vejiga en su parte externa varía de acuerdo a su estado fisiológico, cambiando así su configuración externa. Cuando se encuentra distendida toma forma esférica, mientras que bajo condiciones de no distensión se caracteriza por tener una forma de tetraedro. En su forma no distendida la vejiga se estrecha hacia arriba y adelante formando sobre la línea media el vértice de la vejiga urinaria, el cual se prolonga hacia la pared abdominal anterior por el uraco. En la posición opuesta al vértice esta el fondo de la vejiga y debajo del fondo se encuentra el trígono vesical (2).

Siguiendo con la descripción anatómica de la vejiga, en la parte interna encontramos en su porción inferior los dos orificios ureterales y el orificio interno de la uretra. Por los orificios ureterales, la orina ingresa a la vejiga urinaria de manera intermitente. Además, por el orificio uretral el cual se ubica en una posición más anterior, marcando el centro del cuello de la vejiga, se lleva a cabo la función de evacuar la orina para finalmente expulsarla al exterior del cuerpo. Los tres orificios mencionados delimitan el trígono vesical configurando una porción fija y no distensible. que además su mucosa superficial se caracteriza por ser lisa (Figura 4) (2).

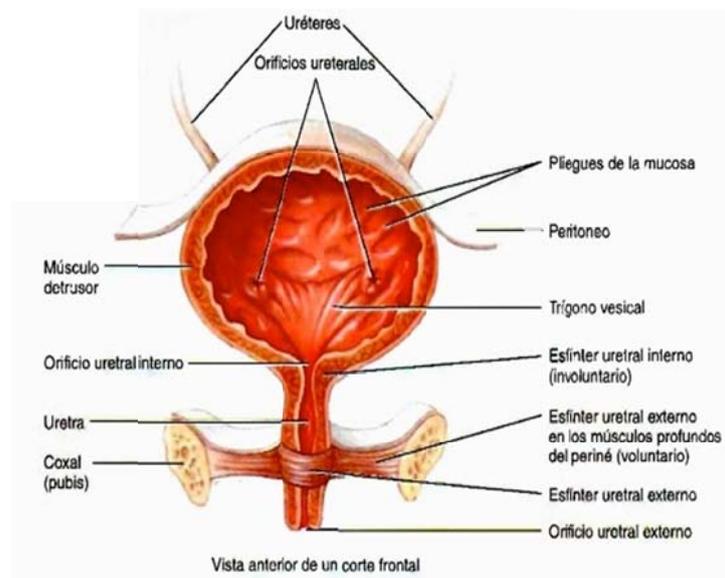


Figura 4. Anatomía de la vejiga urinaria; imagen extraída de <http://anatolandia.blogspot.com.es/2014/02/ureter-uretra-sistema-urinario.html#.U9ERUKhZmlc>.

### 1.2.2.3 Histología de la vejiga:

La vejiga urinaria se distiende por la orina acumulada, su epitelio de transición impermeable se adelgaza y se aplanan. Sus grandes células de forma cupuliforme también se aplanan y las membranas plasmáticas se despliegan, de manera que las regiones gruesas de las placas dejan de estar pegadas hacia el citoplasma y en su lugar pasan a formar un mosaico de placas engrosadas y regiones entre las placas más delgadas, lo que sirve para alojar la creciente cantidad de orina (Figura 5) (5,6,7).

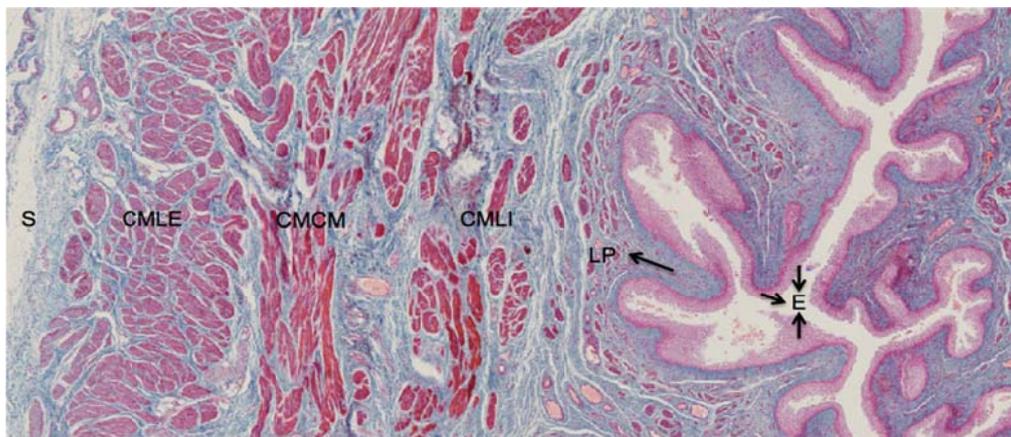


Figura 5. Corte histológico de vejiga humana. Tinción tricromico de mason. **E**: Epitelio; **LP**: Lamina propia; **CMLI**: Capa muscular longitudinal interna; **CMCM**: Capa muscular circular media; **CMLE**: Capa muscular longitudinal externa. <http://histologia.ugr.es/departamento/>

### 1.2.3 Uretra:

#### 1.2.3.1 Embriología de la uretra:

El epitelio de la mayor parte de la uretra masculina y de toda la uretra femenina deriva del endodermo del seno urogenital. En el hombre, la porción distal de la uretra en el glande del pene deriva de un cordón solido de células ectodérmicas que crece hacia dentro, desde el extremo del glande y se une al resto de la uretra esponjosa. Por consiguiente, el epitelio de la porción terminal de la uretra deriva del ectodermo superficial. El tejido conjuntivo y el



musculo liso de la uretra en ambos sexos derivan del mesénquima esplácnico (1,3).

### 1.2.3.2 Anatomía de la uretra:

La uretra es el conducto evacuador de la vejiga urinaria y, en el hombre, del producto de secreción externa del testículo y otras estructuras glandulares. Cabe resaltar que la uretra femenina y la masculina presentan diferencias.<sup>2</sup> Concretamente, en el hombre la uretra tiene un trayecto que inicia desde la vejiga hasta la extremidad del pene. El cual biológicamente conduce la orina y la eyaculación hacia el exterior. Esta estructura del sistema genitourinario en el hombre adulto mide 16 cm, con un diámetro el cual es variable. Además de esto, la uretra presenta tres dilataciones: prostática, bulba y balánica, con un estrechamiento a nivel del cuello vesical y otro en el orificio externo de la uretra. La vascularización de la uretra masculina es dada por arterias prostática, por la arteria uretral, la arterial del bulbo del pene y finalmente de ramas arteriales de la pudenda interna. La vascularización de la uretra masculina es venosa principalmente, y se da por el plexo venoso prostático, retropúbico y por la vena dorsal profunda del pene. Finalmente, su inervación es dada por el plexo hipogástrico inferior, por el nervio pudendo y por el nervio dorsal del pene (Figura 6) (2).

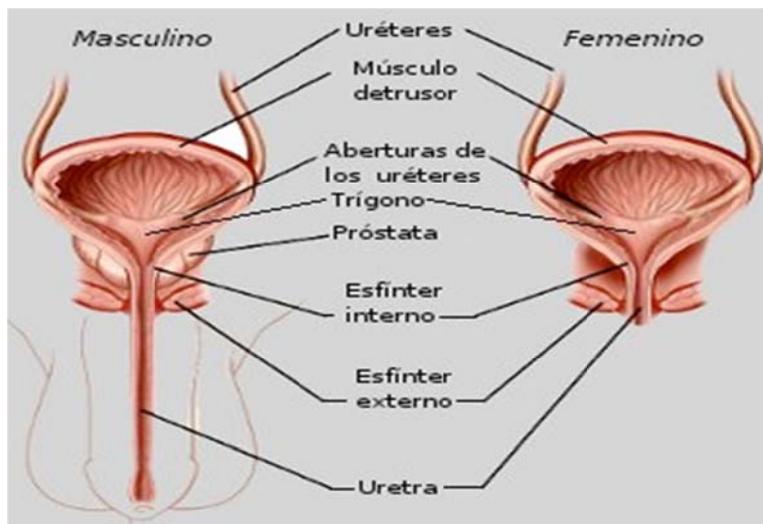


Figura 6. Anatomía de la vejiga y uretra. Imagen extraída de <http://www.sabelotodo.org/anatomia/uretra.html>



En la mujer, la uretra va desde el cuello de la vejiga hasta la vulva. Se caracteriza por ser más corta que en el hombre y es exclusivamente urinaria. Presenta un diámetro uniforme, estrechado solamente en su origen y en su terminación. Así mismo, presenta una mucosa, bastante delgada y resistente. Además tiene una capa muscular profunda la cual es longitudinal y una superficial la cual es circular. Finalmente, en lo que respecta a su inervación y vascularización es similar en estos aspectos a la del hombre, pero a diferencia de la uretra masculina, el componente vascular prostático esta reemplazado por los vasos de origen vesical y vaginal (2,6).

### **1.2.3.3 Histología de la uretra:**

La uretra es un tubo que transporta la orina desde la vejiga al exterior en la micción. Para entender mejor su histología dividiré su histología en uretra masculina y uretra femenina (6,7). En primer lugar, la uretra masculina esta formada por tres porciones las cuales son: porción prostática, porción membranosa y porción cavernosa o peneana. La porción prostática se encuentra próxima a la vejiga y su parte inicial esta dentro de esta. Cabe resaltar que en esta porción es donde la próstata y sus secreciones se abren paso. La siguiente porción de la uretra es la membranosa, la cual mide 1 centímetro de extensión y se reviste de un epitelio pseudoestratificado columnar en esta porción encontramos al musculo esfínter externo de la uretra. Finalmente la porción cavernosa de la uretra la localizamos en el cuerpo cavernoso del pene. El epitelio de esta porción es pseudopluriestratificado columnar con zonas de epitelio pluriestratificado pavimentoso (5,6,7).

En segundo lugar la uretra femenina es tubo de 4-5 cm de longitud, revestido, por epitelio pluriestratificado pavimentoso, con zonas de epitelio pseudopluriestratificado columnar. En su porción distal, cerca de su abertura al exterior posee el esfínter externo de la uretra (6,7).



#### 1.2.4 Histología comparada de las principales vías urinarias:

En este contexto, para entender mejor las características histológicas de la mucosa urinaria, nos enfocaremos en dos de sus órganos principales, la vejiga y los uréteres, objetos de estudio de la presente Tesis Doctoral. En primer lugar, la paredes vesicales y ureterales están divididas en tres capas desde el interior a la periferia: la capa mucosa que está constituida de urotelio y estroma o también llamada lamina propia, principal objeto de estudio, la capa muscular y la capa adventicia o serosa. De las cuales analizaremos cada una en gran detalle y profundidad (Figura 7) (Figura 8).

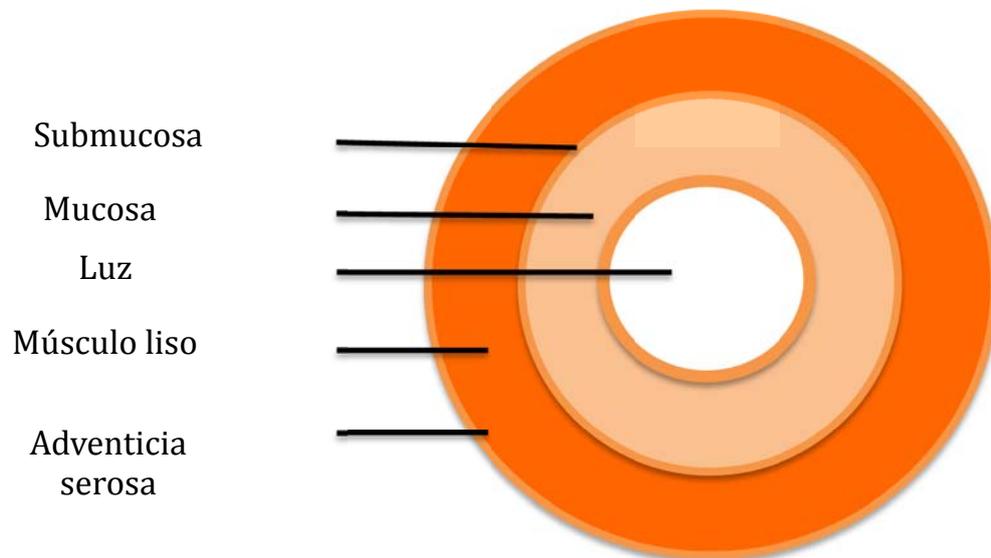


Figura 7. Diagrama de la arquitectura general de uréter y vejiga en el cual destacan las diferentes capas del tejido urinario: capa mucosa, submucosa, capa muscular, adventicia o serosa.

Con respecto a la capa mucosa, y uno de sus componentes, el urotelio, recientes estudios han descrito las funciones del urotelio como una barrera fisiológicamente activa imprescindible para el resto de funciones de la vejiga y uréter( 6,7).

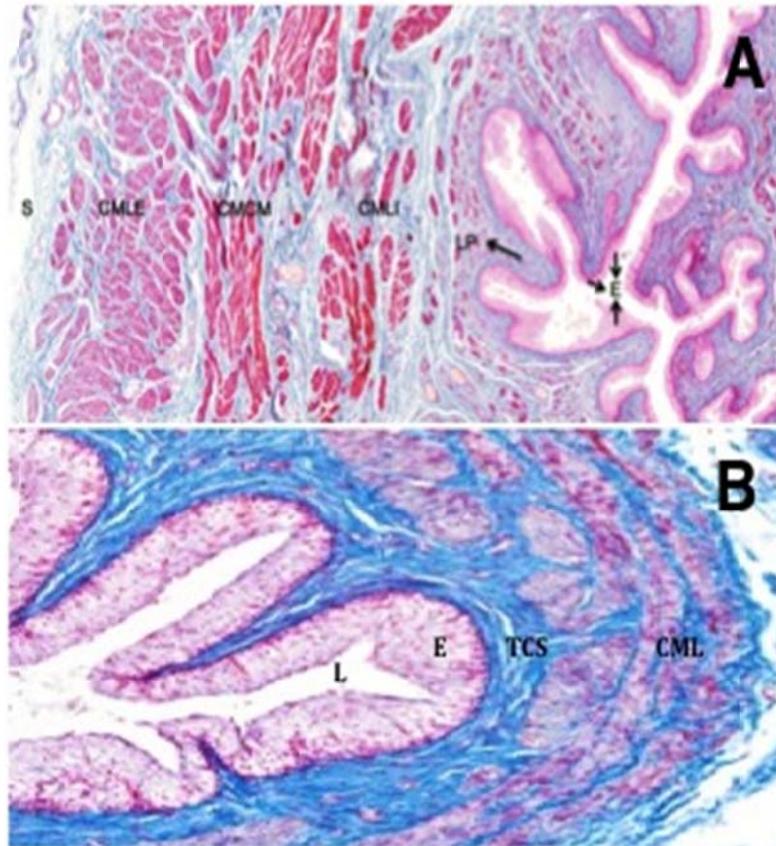


Figura 8. Tinción tricromico de masson. **8A**: Corte histológico de vejiga humana, **8B**: Corte histológico de Uréter humano. L: Luz; E: epitelio; LP: Lamina propia; TCS: Tejido conectivo subepitelial; CML: Capa musculo liso; CMLI: Capa muscular longitudinal interna; CMCM: Capa muscular circular media; CMLE: Capa muscular longitudinal externa. Imagen extraída del microscopio virtual <http://histologia.ugr.es/departamento/>

El urotelio es un epitelio de transición que se extiende desde los cálices menores y termina en la porción inicial de la uretra. En los cálices menores comienza con dos capas celulares que progresivamente van aumentando hasta cuatro en el vejiga y en el uréter. Como caso especial, se encuentran hasta seis o más capas de células epiteliales, demostrando la capacidad de distensión de estas células. Así mismo, conforme las células individuales de la vejiga se despliegan y se aplanan, el aspecto resultante corresponde a tres capas conocidas como “capas verdaderas” (3,6)

Las tres capas conocidas como verdaderas son conocidas como capa de células basales, de células intermedias y de células superficiales. En primer lugar, la capa de células basales son de tipo germinativo, posteriormente la capa de células intermedias se encuentra por encima de las basales, y

finalmente la capa de células superficiales, cuya ubicación es la más extrema por encima de la capa intermedia. Las células de la capa superficial se conocen también en la literatura con el nombre de células paraguas, esto se debe a la forma característica de estas células (Figura 9) (8,9,10), cuya porción apical es más extensa que la basal.

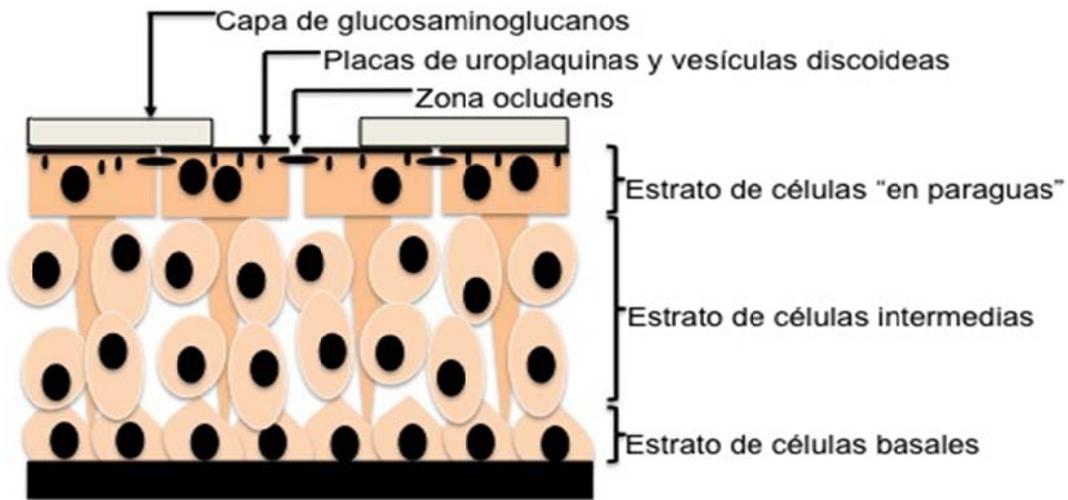


Figura 9. Esquema de urotelio en el que se representan gráficamente las diferentes capas del urotelio, principalmente compuesto por un estrato o capa basal, estrato o capa intermedia y a nivel más apical, un estrato o capa superficial donde destaca la presencia de células "paraguas"

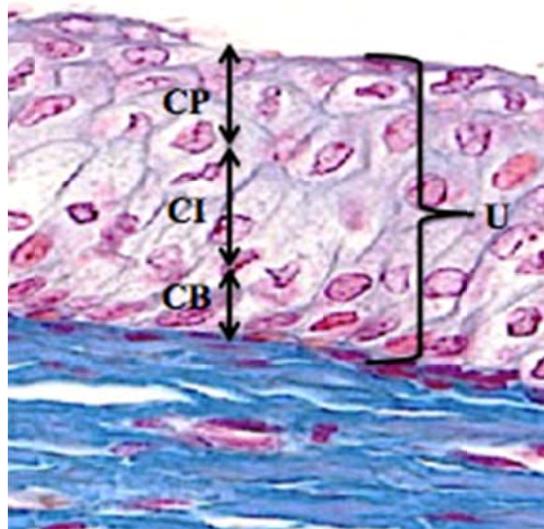


Figura 10. Imagen histológica de urotelio de uréter. Tinción tricrómica de Masson. **U**: Urotelio; **CB**: Capa basal; **CI**: Capa intermedia; **CP**: Células de células paraguas. Imagen tomada del microscopio virtual <http://histologia.ugr.es/departamento/>



Debido a la importancia de las células de la capa superficial en el normal desempeño de las vías urinarias, hablaremos más a fondo de ellas (Figura 10).

En este contexto, las células paraguas de la capa superficial tienen características que las hacen únicas del resto de las células del cuerpo humano, concretamente la capacidad de cambiar su forma de acuerdo al estado fisiológico de las vías urinarias, en pocas palabras, pueden aumentar o disminuir su superficie sobretodo la apical. Por otra parte, pueden ser multinucleadas, además poseen un gradiente muy alto entre el plasma y la orina en términos de concentración de agua, concentración de potasio, concentración de urea, osmolaridad y pH. De igual forma, tienen una membrana de superficie apical de unidad asimétrica, con la hojuela externa formada de placas proteicas y lípidos, y la hojuela interna formada de lípidos (8).

Por otra parte, la capacidad que poseen las células paraguas de cambiar de forma ya sea aumentando o disminuyendo su superficie aún es poco comprendida. Al respecto, la teoría más usada actualmente afirma que existen abundantes vesículas discoideas subapicales. Estudios realizados describieron la presencia de procesos de exocitosis en estas vesículas para aumentar el área de superficie de las células de paraguas (8,9)

Por otra parte, algunos estudios afirman que dichas vesículas discoideas subapicales están también relacionadas con redes de filamentos conectados a placas de uroplaquinas (10,11).

De igual forma es importante descartar que las células paraguas exhiben en su membrana apical, regiones tipo placas, donde la membrana tiene la mayor parte cubierta por una capa proteica y el resto son zonas similares a bisagras. Estas grandes zonas de placa están compuestas por proteínas conocidas como uroplaquinas (10). En la actualidad se conocen cinco uroplaquinas: UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa y UPIIIb. De estas cinco uroplaquinas la UPIa, UPII, UPIIIa y UPIIIb solo se expresan en el uroepitelio



concentrándose en la capa de células paraguas (9,10). La función primaria de las proteínas de uroplaquinas es la de formar parte de la barrera plasmatorina, además se han demostrado que las uroplaquinas actúan como sitio de inserción primaria de la *Escherichia coli* uropatógena fimbriada tipo I, también son útiles como biomarcadores para el diagnóstico diferencial y la identificación temprana de células de cáncer urotelial diseminado a tejidos locales, ganglios linfáticos y corriente sanguínea (10,11).

Los estudios más detallados, revelan la presencia de uroplaquinas en el 90% de la superficie del uroepitelio y que el otro 10% está conformado por una superficie de membrana celular descubierta, la cual permite la presencia de regiones flexibles y dan la capacidad al sistema urinario de poder plegarse o expandirse (10,12,13). Todas estas características convierten a las uroplaquinas en piezas claves del funcionamiento normal del sistema urinario, donde su alteración o ausencia, conlleva al flujo de orina y sustancias nocivas desde la luz hacia las capas profundas del uroepitelio, además conlleva a alteraciones hidroelectrolíticas así como reflujos vesicoureterales (10,14,15,16).

Además de las uroplaquinas, otro componente importante del urotelio son las citoqueratinas, las cuales son proteínas de filamento intermedio que se encuentran presentes de las células epiteliales. La expresión de las citoqueratinas esta determinada por el tipo célula así como el estado de desarrollo y de diferenciación celular (17). Diferentes grupos de investigación, han descrito que las células del urotelio humano adulto no patológico, expresa citoqueratinas características de los epitelios simples como son la CK7, CK8, CK18, CK19 y CK20, igualmente, otros estudios han demostrado la presencia de isotipos asociados a epitelios de tipo estratificado como es la Ck13, en menor medida se describe la presencia de CK4, CK5 y CK17 (18,19,20,21). Posteriormente, análisis más específico de las proteínas de filamento intermedio, demuestran que la presencia de los diferentes isotipos de citoqueratinas varia de ubicación en el urotelio. Las citoqueratinas CK7, CK8, CK18 y CK19 son expresadas en todas las capas celulares del urotelio,



mientras que las CK5 y CK17 son de expresión basal, finalmente, la CK20 se expresa fundamentalmente en las células de paraguas (19,22).

Tal y como se mencionó anteriormente, la capa mucosa del tejido urinario está constituida de urotelio y lamina propia. Una vez explicado en detalle el urotelio, su estructura y organización histológica, así como los marcadores uroteliales de mayor relevancia a nivel científico y experimental, pasaré a describir los detalles histológicos de la lámina propia.

El estroma o lámina propia que componen la capa mucosa de la vejiga urinaria y de los uréteres está compuesta principalmente por un componente fibrilar y no fibrilar. En primer lugar, el componente fibrilar está constituido principalmente por fibras de colágenos, fibras elásticas y reticulares. Los tipos de colágeno más abundantes son el tipo I, III y IV (9,23,24). El colágeno, se ubica en el estroma por fuera de las fibras musculares. Además, del colágeno tenemos a la elastina como componente vesical pero a pesar de lo que se cree, las fibras de elastina son muy pocas en la vejiga, a diferencia del colágeno. En segundo lugar, el componente no fibrilar está principalmente representado por la presencia proteoglicanos, glicosaminoglicanos y proteínas multiadhesivas y agua. Dichos componentes forman una especie de compartimiento acuoso que con los cambios de la vejiga urinaria esencialmente con la deformación, adquiere una contextura viscosa (9,23,24,25). En el caso del uréter, destaca de la misma forma la presencia de componentes fibrilares y no fibrilares, y una gran red vascular, canales linfáticos, terminaciones nerviosas y fibras elásticas (6, 26). A nivel celular, tanto en la vejiga como en el uréter destaca la presencia de fibroblastos inmersos en la matriz estromal.

Otra de las capas que resulta relevante destacar es la capa muscular. La capa muscular provee la capacidad de contracción o relajación que poseen las vías urinarias para cumplir con sus funciones. En este sentido, la capa muscular está constituida principalmente por musculo liso. Este musculo liso lo podemos dividir en tres tipos de capas musculares de adentro hacia afuera: capa muscular interna o profunda constituida por fibras de tipo



longitudinal, la capa muscular media formada por fibras circulares y la capa muscular externa formada por fibras musculares longitudinales. Esta última capa muscular se encuentra presente solamente en el extremo distal del uréter. Estas capas musculares son las que permiten una adecuada mecánica del transporte urinario desde el riñón hasta la uretra. En el caso de la vejiga urinaria, estas capas musculares de la pared vesical conforman el musculo detrusor que cuando la vejiga se llena este se contrae y expulsa la orina. Como antagonistas del músculo detrusor se encuentra los esfínteres de la uretra.

Finalmente, en la porción externa, nos encontramos con la capa adventicia en el caso de los uréteres, la cual en su porción proximal depende de la capsula fibrosa del riñón continuando en su porción más distal con la capa celulosa perivesical (2). En contraste, en la porción más externa de la vejiga urinaria nos encontramos con la capa serosa también conocida como peritoneo vesical, la cual se encuentra solamente en la parte postero-superior y en la porción superior de las paredes laterales de la vejiga. El peritoneo de la vejiga urinaria se logra adherir a ella a través de la fascia vesical y sigue sus movimientos de distensión o aplastamiento (2).

### **1.3 Patologías Urinarias**

Son muchas las patologías de las vías urinarias que de no ser adecuadamente tratados pueden progresar hasta estadios severos, resultando en secuelas sistémicas permanentes e incluso en el reemplazo no solo del uréter o de la vejiga sino de otros órganos como por ejemplo el riñón.

#### **1.3.1 Patologías Ureterales:**

Las patologías ureterales podemos dividir las en congénitas o adquiridas. Entre las congénitas tenemos la duplicación ureteral, las inserciones



ureterales ectópicas, el uréter retrocava, ureterocele y el megauréter congénito. Dentro de las patologías adquiridas encontramos fibrosis retroperitoneal, neoplasias, procesos inflamatorios crónicos, hernias ureterales, litiasis ureteral, procesos obstructivos, procesos infecciosos y traumas (27). Muchas de estas patologías tanto adquiridas como congénitas son de difícil manejo y a pesar de manejos farmacológicos y no invasivos dichas patologías pueden progresar a estados severos irreparables (Figuras 11,12,13,14).



Figura 11. Duplicación ureteral completa derecha (28).



Figura 12. Megauréter primario imagen extraída de <https://goo.gl/FlwiDN>

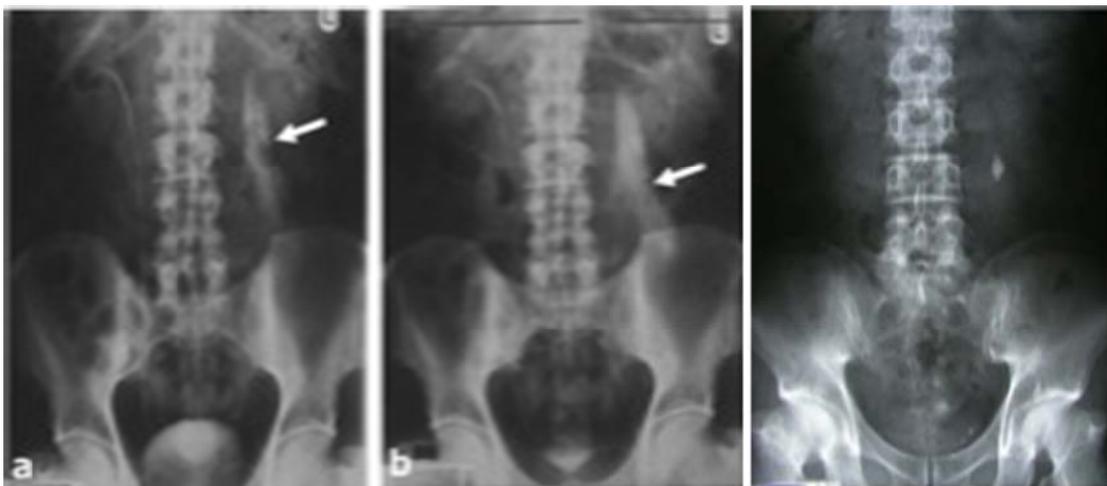


Figura 13. Ruptura ureteral izquierda (a y b) (29).



Figura 14. Litiasis ureteral imagen extraída de <http://goo.gl/A1r8LS>



En este sentido el tratamiento de las patologías ureterales ha sido abordado terapéuticamente de diferentes maneras. En primer lugar farmacológicamente y en segundo lugar realizando procedimientos quirúrgicos. Entre los procedimientos quirúrgicos, se tienen los procedimientos realizados mediante técnica laparoscópicas, cuyos resultados clínicos así como la posibilidad de su realización varían en gran parte por la capacidad técnica del cirujano, así como del estado clínico del paciente. A pesar que los procedimientos laparoscópicos son muy comunes en la actualidad, los procedimientos mediante cirugía abierta continúan siendo los más utilizados. En casos de traumatismos, dependiendo de la ubicación de la lesión ya sea proximal, media o distal, se procede a realizar la ureteroureterostomía, la transureteroureterostomía y la ureteroneocistostomía respectivamente. Otro tratamiento quirúrgico utilizado es la interposición de intestino, el cual es realizado cuando se presentan extensos segmentos de uréter destruidos, en estos casos el íleon es el segmento intestinal más utilizado (30).

En este sentido, cabe destacar que muchos de los abordajes terapéuticos utilizados hasta el momento pueden derivar en ser reacciones alérgicas, y efectos adversos derivados del tratamiento farmacológico, así como, poca o nula respuesta al tratamiento mediante fármacos. Así mismo, los procedimientos quirúrgicos pueden ocasionar hemorragias, lesiones iatrogénicas, o bien, limitación técnica en el caso de las laparoscópicas por falta de experiencia del cirujano, infecciones, recidivas, muerte y en el caso de utilizar segmentos intestinales se presentarían además obstrucciones intestinales, obstrucción ureteral-intestinal, filtración de orina, estenosis del estoma, urolitiasis, acidosis metabólica, pielonefritis, deterioro renal, cáncer, infecciones, diarrea, malabsorción de vitamina B12 y excesiva producción de moco (31,32). Por este motivo, la creación de un sustituto ureteral mediante ingeniería tisular se presenta como una nueva opción terapéutica que minimizaría las complicaciones asociados a la terapéutica actual.

### 1.3.2 Patologías de la vejiga:

Las patologías vesicales podemos dividir las en congénitas o adquiridas. Entre las congénitas tenemos como principales exponentes la vejiga neurogénica y la extrofia de vejiga. Dentro de las patologías adquiridas encontramos el cáncer de vejiga, traumas, procesos infecciosos severos y además procesos inflamatorios crónicos. Muchas de estas patologías tanto adquiridas como congénitas son de difícil manejo y a pesar de manejos farmacológicos y no invasivos dichas patologías pueden progresar a estados severos irreparables (Figuras 15, 16, 17, 18).

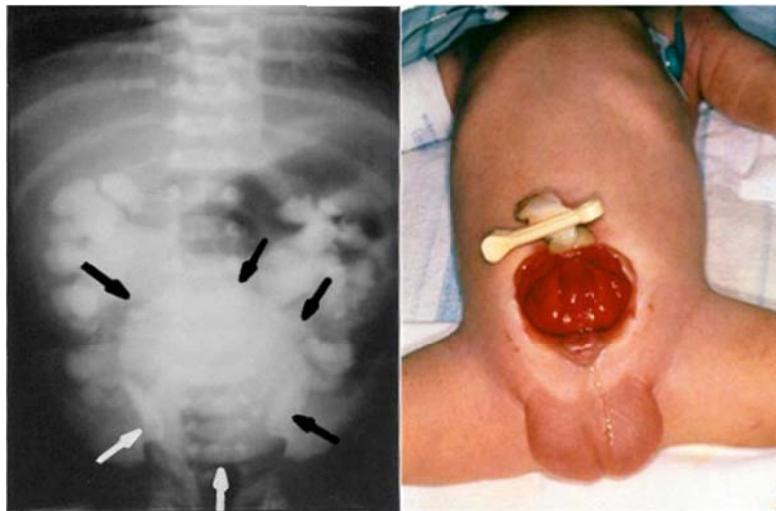


Figura 15. Vejiga neurogénica y enorme hidronefrosis en uréteres, y cálices bilateralmente. Imagen extraída de <http://goo.gl/23e5sA>

Figura 16. Extrofia vesical clásica masculina imagen extraída de <http://goo.gl/Ek0KY8>

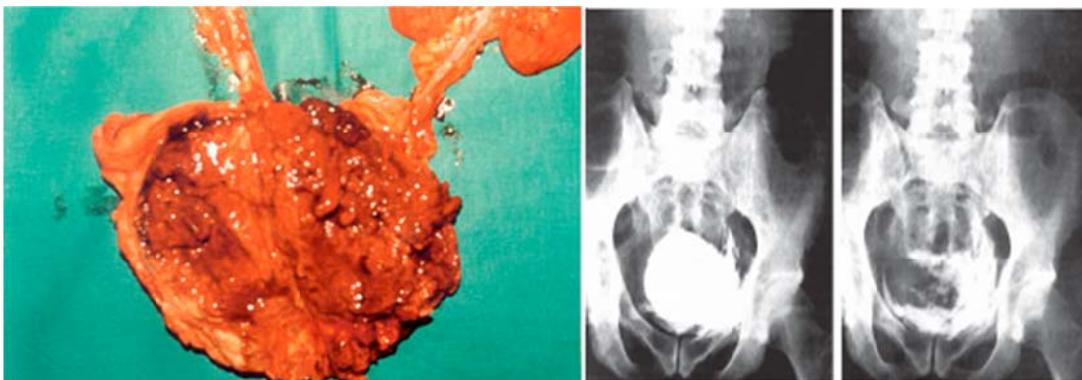


Figura 17. Tumor rabdoide de vejiga. Imagen extraída de <http://goo.gl/y7asNH>

Figura 18. Cistografía retrograda que demuestra extravasación del contraste por ruptura vesical. Imagen extraída de <http://goo.gl/m9OtKb>



En este sentido el tratamiento de las patologías vesicales has sido abordado terapéuticamente de diferentes maneras. En primer lugar utilizando procedimientos quirúrgicos y en segundo lugar mediante el uso de trasplantes.

Entre los procedimientos quirúrgicos, se tienen los de sustitución vesical ortotópica; Entre los que se encuentran procedimientos como las sustituciones continentales ortotópicas de las cuales las más conocidas son Camey II descrita por Camey en 1990, tenemos también el reservorio ileal descrita por Pagano en 1990 y la neovejiga ileal de Studer descrita por Studer en 1989. Otro tipo de procedimientos realizados de derivación urinaria no continentales son la técnica de Pagano descrita por Pagano en 1984, la técnica de Nesbit descrita por Nesbit en 1949 y la técnica de Le Duc descrita por Le Duc en 1987. Por otra parte, están los procedimientos de tipo continentales heterotópicos entre los más conocidos están Mainz II descrita en 1991 por Fisch-Hohenfellner y la hemi-Kock descrita en 1988 por Kock. Todas estas técnicas constituyen los principales procedimientos en el manejo de pacientes con cistectomía o pacientes que necesiten cirugía urológica reconstructiva de vejiga (Figura 19, 20). En lo que se refiere a los procedimientos quirúrgicos es importante destacar el avance de las técnicas quirúrgicas. En este contexto, el uso de segmentos intestinales en procedimientos de cirugía urológica reconstructiva tanto para el reemplazo como la ampliación de la vejiga han sido ampliamente utilizados. Entre las porciones intestinales usadas se encuentran segmentos de colon, íleon, yeyuno y estomago (32).

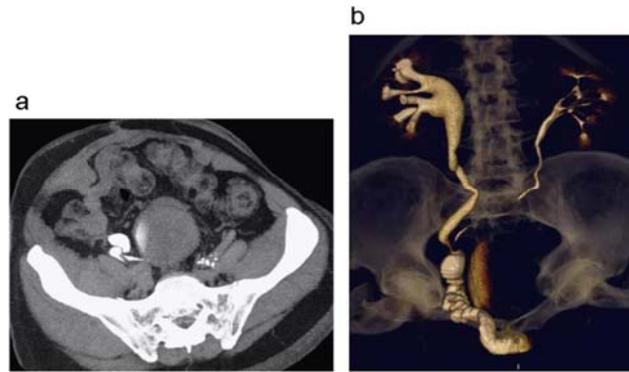


Figura 19. Neovejiga ortotópica de Studer imagen extraída de <http://www.elsevierciencia.com/es/revista/-/articulo/ureter-hallazgos-tomografia-computarizada-multidetector-13153753>

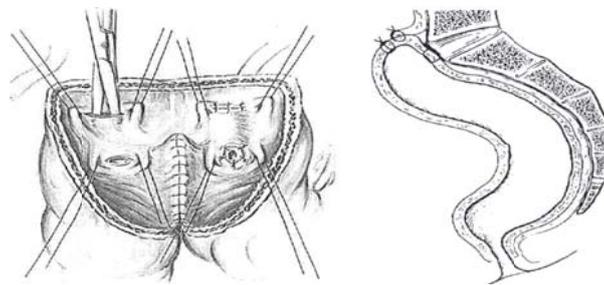


Figura 20. Procedimiento Mainz II imagen extraída de <http://www.sau-net.org/comites/educacion/fasciculos/derivfigsl.pdf>

Sin embargo, los problemas asociados a los procedimientos quirúrgicos en los que se usan segmentos gastrointestinales para cirugía urológica, radica en la amplia gama de complicaciones que presentan. Dichas complicaciones son la obstrucción intestinal, obstrucción ureteral-intestinal, filtración de orina, estenosis del estoma, urolitiasis, acidosis metabólica, pielonefritis, deterioro renal, cáncer, infecciones, diarrea, malabsorción de vitamina B12 y excesiva producción de moco tal y como se nombró anteriormente (31,32).

Por otra parte, otra de las estrategias terapéuticas utilizadas para el tratamiento de patologías vesicales. Son los trasplantes. Pero a pesar de los avances en la actualidad, el uso de trasplantes alogénicos no es factible en el caso de patologías urológicas, esto se debe a que durante los procesos de extracción del órgano del donante y su colocación en el receptor, el órgano en sí mismo ha perdido casi toda su inervación. Lo que dejaría sin sensibilidad y sin poder realizar contracciones.



## 2. La Ingeniería Tisular

En el mundo actualmente existen millones de pacientes que presentan fallas orgánicas y pérdidas de órganos, esto constituyo un problema desafiante para la medicina y para los sistemas sanitarios existentes en el mundo; debido a esto, la espera para trasplante de órganos se ha incrementado en los últimos años. A pesar del aumento de la demanda de órganos, el número de pacientes que fallecen en la lista de espera también ha ido en aumento (Figura 21). Debido a todo esto, la comunidad científica ha mostrado un gran interés en la ingeniería tisular, un área multidisciplinaria que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de tejidos biológicos, utilizando células, biomateriales y factores de crecimiento. El objetivo final de la ingeniería tisular es restaurar, mantener o mejorar la función de los tejido u órganos nativos (33).



Figura 21 **Maestro de Stettener**, *El milagro de los santos Cosme y Damián* (XVI), Württembergisches Landesmuseum, Stuttgart.

Los inicios de la ingeniería tisular remontan a 1938 con la publicación del libro *“the culture of organs”* escrito por Charles A. Lindbergh y Alexis Carrel (34). Posteriormente en 1960 inicia firmemente la investigación de cultivos celulares y tejidos. En esta etapa de la ingeniería tisular se buscaba la manera de aislar y mantener porciones de tejido vivo fuera del cuerpo, logrando producir cultivos en monocapa de un único tipo celular (35). Varios



años después, en el año 1970, W.T. Green logro generar cartílago artificial usando cultivos de condrocitos los cuales se combinaron con “andamios de hueso”. A pesar de estos avances, hasta 1980 se utilizó vagamente el término de “ingeniería de tejidos”, aplicado para la manipulación quirúrgica de los tejidos y órganos utilizando dispositivos protésicos y biomateriales (36). Posteriormente en 1985 el término ingeniería artificial fue firmemente definido y usado por YC Fung de la universidad de California. Cabe aclarar que fue en su publicación de 1993 que Langer y Vacanti, describieron la ingeniería tisular como un “campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y la ciencia de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mejoren o mantengan la función del tejido o de un órgano completo” (35). En 1998 la agencia Americana de medicamentos conocida por sus siglas en inglés como FDA dio la primera aprobación de un tejido alogénico creado por ingeniería tisular. Desde entonces, han sido numerosos los ensayos clínicos y tejidos artificiales generados mediante técnicas de ingeniería tisular aprobadas por dicha agencia (Tabla 1). Estos estudios ponen en relieve los múltiples avances en la investigación de la ingeniería tisular con el objetivo de lograr la mejor comprensión de los mecanismos celulares y genéticos implicados en la regeneración. El mejor entendimiento de los principios celulares y genéticos ha mejorado las técnicas de cultivos y la creación de tejidos, disminuyendo sus riesgos, entre estos riesgos se encuentra principalmente la proliferación incontrolada (35). En este sentido, la ingeniería tisular tiene un futuro prometedor en el cual nos ofrece alternativas para el manejo de lesiones o enfermedades de pacientes las cuales con manejos tradicionales no tienen mejoría (36).



Nombre del medicamento	País donde se encuentra aprobado	Datos del medicamento
Dermagraft®	Aprobado en Estados Unidos	Cultivos alogénicos de fibroblastos sobre una malla biodegradable para el tratamiento de úlceras diabéticas.
Transcyte®	Aprobado en Estados Unidos y Reino Unido	Cultivo alogénico de fibroblastos sobre una malla de Nylon recubierta con una membrana fina de silicona.
Celaderm™	Aprobado en Estados Unidos y Reino Unido	Cultivo alogénico de queratinocitos para el tratamiento de quemaduras de espesor parcial.
Bioseed-C	Aprobado en Alemania	Condrocitos autólogos para defectos cartilagosos en la rodilla.
Bioseed-oral bone	Aprobado en Alemania	Injerto de hueso autólogo para la construcción de hueso de la región mandibular.
MelanoSeed	Aprobado en Alemania y Holanda	Cultivos autólogos de melanocitos para el tratamiento del vitíligo
CaReS	Aprobado en Alemania	Condrocitos autólogos en matrices de colágeno para el tratamiento de defectos del cartílago articular en rodilla.
Myskin	Aprobado en Reino Unido	Cultivos autólogos de queratinocitos en plasma tratados con una membrana de silicona para el tratamiento de quemaduras, úlceras y heridas que no sanan.
Co.don condrotransplante	Aprobado en Alemania	Suspensión células de condrocitos autólogos para el tratamiento de defectos del cartílago en la rodilla.
Co.don condroesfera	Aprobado en Alemania	Suspensión células de condrocitos autólogos para el tratamiento de defectos del cartílago en la rodilla.
Co.don disco de condrotransplante	Aprobado en Alemania	Suspensión celular de condrocitos autólogos para el tratamiento de defectos del cartílago en la rodilla.
Carticel	Aprobado en Estados Unidos	Suspensión celular de condrocitos autólogos para el tratamiento de defectos del cartílago en la rodilla.
Epichel	Aprobado en Estados Unidos	Queratinocitos autólogos para el tratamiento de quemaduras
MACI	Aprobado en Australia	Condrocitos autólogos sobre una membrana de colágeno para el tratamiento de defectos del cartílago de la rodilla.
ICX-RHY	Aprobado en Reino Unido	Cultivo autólogo de fibroblastos para el rejuvenecimiento dérmico.
Cartilink-2	Aprobado en Dinamarca y España	Suspensión celular de condrocitos autólogos para el tratamiento de defectos del cartílago articular de la rodilla
Invitra	Aprobado en Estados Unidos	Fibroblastos sobre una membrana de colágeno/vicryl con queratinocitos agregados
Autologous cellular system (ACS)	Aprobado en Reino Unido	Cultivo autólogo de fibroblastos para el rejuvenecimiento dérmico.
Apligraf	Aprobado en Canadá Y Estados Unidos	Sustituto de piel alogénico de dos capas para el tratamiento de la estasis venosa y las úlceras diabéticas.
Orcel	Aprobado en Estados Unidos	Esponja porosa de colágeno que contiene fibroblastos alogénicos que además está cubierta con queratinocitos alogénicos para el tratamiento de la epidermolisis bullosa.
Novocart	Aprobado en Alemania	Condrocitos autólogos.
Novocart	Aprobado en Alemania	Novocart3D y una combinación de células cartilaginosas autólogas y una matriz de colágeno bifásica, 3D.
laViv	Aprobado en Estados Unidos	Fibroblastos autólogos



Celution	Aprobado en Estados Unidos	Extracción celular
GEM125	Aprobado en Estados Unidos	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG-BB)
Regranex	Aprobado en Estados Unidos	PDGF-BB
Osteogenic protein-1	Aprobado en Estados Unidos	BMP-7

**Tabla 1.** Medicamentos producto de la ingeniería tisular aprobados actualmente (35,37).

## **2.1 Ingeniería tisular de las vías urinarias:**

### **2.1.1 Ingeniería tisular del uréter:**

Los procedimientos tradicionales tanto farmacológicos como quirúrgicos existentes para el tratamiento de patologías ureterales presentan limitaciones y diferentes complicaciones, en estos casos es que la ingeniería tisular surge como una opción novedosa que ofrece nuevos tratamientos para las lesiones ureterales. Actualmente, el número de publicaciones en ingeniería tisular del sistema urinario es abundante, pero en su mayoría enfocados en vejiga urinaria, en cuanto a las publicaciones sobre uréter e ingeniería tisular las publicaciones son escasas (38); lo cual, ofrece un gran campo investigativo en el cual desarrollar nuevos manejos para patologías ureterales, los cuales presentan menores complicaciones o efectos adversos que los tratamientos tradicionales.

Los actuales avances en la ingeniería tisular de uréter, se han enfocado principalmente en la reparación de defectos ureterales. Entre los estudios realizados en uréter, destacan los estudios realizados in vivo de tubos de poly L-lactic acid (PLLA) y los trabajos de descelularización y recelularización con células uroteliales de vejiga. En el caso de los tubos de PLLA se utilizó una combinación de colágeno mediante electrospun con células madre mesenquimales de tejido adiposo y células uroteliales (39,40,41). Otras



líneas de investigación de ingeniería tisular de uréter se han enfocado en la utilización de tejidos descelularizados, en este aspecto el tejido más utilizado es la submucosa intestinal, pero no ha demostrado ser óptimo para lesiones ureterales. Uno de los tejidos que ha mostrado potencial para su utilización en ingeniería de tejidos de uréter es la membrana amniótica (42). así como los vasos y vejiga descelularizada (38,43,44).

Recientes líneas de investigación en el área de ingeniería tisular de uréter han enfocado su trabajo en el uso de células madre mesenquimales de tejido adiposo y de médula ósea (43,44) en los cuales se ha demostrado la gran capacidad que poseen estas células de estimular la proliferación y diferenciación celular cuando están presentes en los tejidos artificiales implantados disminuyendo complicaciones o efectos adversos(38,43,44).

### **2.1.2 Ingeniería tisular de la vejiga urinaria:**

En la actualidad el campo de la urología ha tenido una visión innovadora con los resultados de las investigaciones de nuevos tratamientos para patologías de vejiga urinaria, producto de la ingeniería tisular. Dichos estudios, han desarrollado diferentes capas de la vejiga, una de estas capas, ha sido desarrollada usando matrices acelulares. Estos andamiajes acelulares al ser implantados captan células madre locales y sistémicas, imitando la matriz extracelular natural de la vejiga y produciendo el proceso de regeneración (32). En este sentido, el uso de matrices extracelulares de origen natural fue uno de los primeros enfoques utilizados en ingeniería tisular de la vejiga. Entre las matrices acelulares más utilizadas destacan las submucosas de intestino delgado (SIS) y las matrices acelulares de la vejiga (BAMG) (45,46). Sin embargo, a pesar de lo prometedor de las estrategias con matrices acelulares, algunos estudios realizados posteriormente demostraron que la capa de musculo liso creció solo un 30% (47). Entre las causas de regeneración inadecuada se cree que esta el rápido contacto de las matrices acelulares con la orina, que lleva a su degradación. Además dichos injertos son de origen xenogénicos y no autólogos(48).



Como idea general debemos entender que hasta el momento se realizan investigaciones donde se utilizan procedimientos de reparación de vejiga denominados cistoplástias, las cuales son técnicas quirúrgicas cuyo objetivo es el aumentar la capacidad de la vejiga urinaria disminuyendo de esta forma las presiones intravesicales. En estos procedimientos de reparación de vejiga se han utilizado materiales los cuales no contienen células, con el objetivo de sustituir zonas de la vejiga lesionadas por diversas patologías. Se ha demostrado que el uso de estas matrices acelulares, en pequeños defectos de la pared vesical son capaces de repararlos; pero no son capaces de reparar o regenerar completamente defectos extensos. Estos hallazgos demostraron la regeneración de la capa muscular aunque no de manera comparable con la capa muscular de la vejiga normal (49,50)

Posteriormente y debido a la limitada regeneración de la vejiga utilizando matrices acelulares. Se abordó el uso de matrices extracelulares enriquecidas con células (49). Estos estudios, revelaron un incremento del 100% de regeneración de la pared de la vejiga, comparado con el 30% de las matrices acelulares. Por otra parte, la incorporación de factores de crecimiento reveló un aumento en la regeneración y el desarrollo de la pared vesical en todas sus capas.

Uno de los estudios más importantes sobre la reconstrucción de vejiga en humanos utilizando la ingeniería tisular fue realizado en 2006 (51). En este estudio se utilizaron injertos compuestos de matrices extracelulares, las cuales estaban constituidos de colágeno-PGA (ácido poliglicólico), a las cuales se les agregó células autólogas tomadas previamente mediante biopsia de la vejiga de 7 pacientes con mielomeningocele, dichas células autólogas fueron células uroteliales además de células musculares las cuales se expandieron en cultivos y posteriormente se separaron de los frascos de cultivo, siendo colocadas las células uroteliales en la porción interna y las células musculares en la porción externa de las matrices extracelulares de colágeno-PGA. Finalmente los injertos artificiales fueron colocados mediante cistoplastia en la cúpula de las vejigas urinarias de los 7 pacientes con



mielomeningocele. Los resultados indicaron que estas matrices extracelulares disminuyeron las presiones finales de llenado y aumentaron las capacidades y los periodos secos demostraron ser más largos en el tiempo (51).

Otras de las líneas de investigación en el área de ingeniería tisular de vejiga radican en el uso del trasplante celular. El objetivo de esta estrategia es promover las condiciones favorables para que las células del trasplante logren sobrevivir, diferenciarse y proliferar. Una de las principales fuentes de células para estos manejos, provienen del propio paciente. Además, recientemente se han realizado importantes investigaciones utilizando células madre principalmente mesenquimales; ya sea del cordón umbilical, del líquido amniótico, de la medula ósea o del tejido adiposo. Estos estudios han realizado cultivos de células madre mesenquimales, con la utilización de medios condicionados y en algunos casos adicionando factores de crecimiento; obteniendo como resultados el mejor crecimiento y diferenciación celular. La adición de estos medios condicionados y factores de crecimiento promueven con mayor rapidez el crecimiento y diferenciación (52,53,54).

En general, los resultados de los estudios de ingeniería tisular para la regeneración de uréter y vejiga urinaria son prometedores, principalmente por que la evolución de la ingeniería tisular en el campo de la urología especialmente en la regeneración y tratamiento de patologías ureterales y vesicales a pesar de ir lentamente, nos ofrece una alternativa real de nuevos tratamientos diferentes a los convencionales. En este contexto, la utilización de matrices, factores de crecimiento y numerosas fuentes celulares alternativas ofrecen una nueva visión al tratamiento de las diversas patologías de tipo urológicas.

## **2.2 Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (HWJSC):**

Como vimos previamente, una opción de la ingeniería tisular en el manejo de patologías es la utilización de las células madre mesenquimales. Dentro de las células madre mesenquimales; las células mesenquimales de la gelatina de Wharton (HWJSC) muestran un gran potencial como una fuente alternativa de células uroteliales. Esto se debe a sus capacidades inmunomoduladoras, de diferenciación además de su fácil obtención.

Para poder comprender el potencial de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton profundizaremos en ellas. Las células madre de la gelatina de Wharton, se encuentran ubicados dentro de la zona llamada la gelatina de Wharton (55), la cual se encuentra dentro del cordón umbilical. El cordón umbilical tal como su nombre indica, es un cordón encargado de unir al feto con su madre; y tiene como función permitir el ingreso de nutrientes hacia el feto y la expulsión de los desechos fetales. Esta capacidad de ingresar o expulsar sustancias es posible, ya que el cordón umbilical en su interior es atravesado por dos arterias umbilicales y una vena umbilical. Alrededor de estas arterias y venas se encuentra la gelatina de Wharton (Figura 22). La gelatina de Wharton es una matriz mucosa rica en proteoglicanos (55), que además posee, ácido hialurónico y gran cantidad de fibras de colágeno especialmente tipo I, III y V (56), en la cual se encuentran inmersas células estromales de origen mesenquimal.

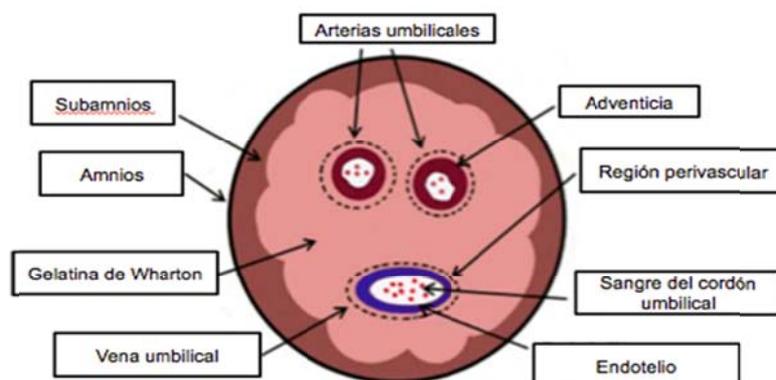


Figura 22. Compartimientos anatómicos del cordón umbilical humano (55).



El aislamiento de dichas células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton debe ser muy riguroso. Para poder aislarlas adecuadamente existen zonas ya preestablecidas donde se encuentran ubicadas, como son la zona perivascular, intervascular y subamniótica. Dependiendo de la zona donde se encuentren las células madre de la gelatina de Wharton presentaran propiedades diferentes de una región a otra, aquellas células madre de la gelatina de Wharton que se encuentren ubicadas cerca de la superficie del amnios presentaran mayor capacidad de proliferación mientras que aquellas que se encuentran próximas a los vasos umbilicales tendrán mayor diferenciación (55). Las células madre de la gelatina de Wharton, son de origen mesenquimal, por lo tanto presentan las mismas características, que poseen todas las células madre mesenquimales; expresando sus mismos marcadores, los cuales son útiles para identificarlas del resto linajes celulares. Entre los marcadores que expresan se encuentran: CD90, CD105, CD44, CD73. Por otro lado también es necesario conocer cuáles son aquellos marcadores que no expresan los cuales son CD45, CD34 estos pertenecen más a células de linaje hematopoyético (57).

Otra de las características de estas células madre radica en su capacidad multipotencial. En los últimos años esta característica de potencialidad se ha colocado en duda (58). Su capacidad de diferenciación hacia tejidos óseos, condrogénicos y adipogénicos demuestra su linaje mesodérmico. Pero algunos estudios muestran que tiene capacidad de diferenciación en el linaje ectodérmico principalmente de tipo neural y epitelial (59,60). Por otra parte, también se ha encontrado que presenta capacidad de diferenciación hacia el linaje endodérmico lográndose diferenciarlas hacia células pancreáticas e incluso hepáticas (57).

Además de su capacidad potencial de diferenciarse a los tres linajes embrionarios, tiene otra característica que la convierte en una célula con alto potencial para la creación de tejidos artificiales. Esta capacidad, es su capacidad inmunomoduladora, ya que con esta característica se evita el rechazo del tejido artificial además de que se produzcan secuelas e incluso



la muerte del paciente secundarias a dicho rechazo (55,58). Una de las razones por las cuales las células madre de la gelatina de Wharton son capaces de inmunomodular la respuesta del organismo está en que los niveles que poseen de HLA clase I se encuentran en niveles muy bajos mientras que no se encuentra ningún nivel de HLA clase II ni tampoco de coestimuladoras como el CD80 y CD86, Encargados de activar a los linfocitos T y B para iniciar la respuesta inmunológica (55). Biológicamente, la explicación de estos niveles de HLA I, se debe a un mecanismo de protección contra las lisis de las “*natural killer*”. Otra característica importante que las diferencia de otras células madre mesenquimales es que poseen una capacidad de producir IL-10, IFN- $\beta$  y HLA-G, inhibidores de las respuestas inmunológicas (40). También junto con el resto de las células madre mesenquimales posee la capacidad de inhibir CD4, CD8, CD2 y CD3 (55,61), de esta forma impiden la activación de la respuesta y replicación de los linfocitos T y por consiguiente una respuesta inmunológica que produzca rechazo del tejido implantado. Con las anteriores características inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton entendemos el porqué de su gran potencial para la realización de trasplantes alogénicas, lo cual abre una oportunidad para tratamientos de regeneración o curación de patologías de vías urinarias.

En las últimas décadas estudios sobre las de las células madre mesenquimales y su capacidad de renovación, replicación y diferenciación, nos ha revelado su elevada actividad de la telomerasa. Actualmente se considera que esta enzima se encarga de replicar los telómeros los cuales son secuencias que se encuentran en el ADN. Los telómeros se encargan de que no se presente mutaciones de tipo cancerígeno en las divisiones celulares. Con cada división celular se presenta un acortamiento de los telómeros y cuando finalmente se acaba el telómero, como defensa celular se frenan las mitosis. En este contexto, en las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton sucede un fenómeno diferente en el cual la actividad de la enzima telomerasa se encuentra muy elevada por lo que su proliferación se encuentra muy elevada, siendo esto muy útil para los cultivos celulares ya que le permite una adecuada expansión (62). Aunque en un



principio se pensaba que dicha expansión producía la posibilidad de mutaciones, estudios demostraron lo contrario siendo incluso posible realizar múltiples subcultivos sin que se presenten dichas alteraciones.

Existe otra característica que poseen las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton con gran potencial a nivel clínico el cual a sido poco estudiado, y es la capacidad que poseen de producir componentes de matriz extracelular y posteriormente generar membranas biológicas derivadas de células in vitro.

Como hemos visto las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton con sus capacidades inmunomoduladoras, su capacidad de diferenciación en los tres linajes embrionarios, su capacidad antitumoral, su alta capacidad de expansión, su capacidad de generar matrices derivadas de células, además del fácil acceso se convierten en candidatas ideales para su uso en protocolos de ingeniería tisular. A diferencia de las células madre de la medula ósea, líquido amniótico, pulpa dentaria y tejido adiposo, las células de Wharton no requieren de procesos incómodos e intervenciones invasivas. Por todo lo anterior podrían tener un alto potencial para el desarrollo de tejidos e incluso órganos tales como uréter y vejiga urinaria. Los cuales son órganos, de gran importancia en el ser humano, cuyas patologías, de no ser tratadas conllevan graves consecuencias, cuyos manejos actuales aún no responden a las amplias expectativas clínicas. Por este motivo, la utilización de técnicas de ingeniería tisular para regenerar dichos órganos mediante el uso de biomateriales, factores de crecimiento y células madre de la gelatina de Wharton representan una potencial opción terapéutica. Por lo tanto la investigación de tejidos artificiales de uréter y vejiga urinaria humana con estas células es relevante porque posibilitara la generación de tejidos del aparato urinario sin la necesidad de obtener biopsias de mucosa urinaria de difícil manejo en cultivo.

Por todo lo expuesto anteriormente, en la presente Tesis Doctoral se han desarrollado dos modelos de mucosa urinaria artificial. El primero de los modelos es fabricado con células ortotópicas obtenidas de la mucosa urinaria



humana nativa. El segundo modelo se genera utilizando como fuente alternativa de células las HWJSC. Ambos modelos se evaluaron a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico con el objetivo de determinar su posible utilidad como sustitutos de los distintos órganos del aparato urinario para su posible traslación clínica.



# OBJETIVOS



**OBJETIVO GENERAL:** Obtener un sustituto de pared vesical humana utilizando técnicas de ingeniería tisular.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Estandarizar las condiciones de cultivo de células de la mucosa urinaria humana a partir de biopsias tisulares y diseñar métodos que permitan la diferenciación urotelial de las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical.
2. Evaluar in vitro las células madre de la gelatina de Wharton como fuente celular alternativa de epitelio de la mucosa urinaria mediante marcadores de diferenciación celular, inmunohistoquímica y ensayos de viabilidad celular.
3. Construir sustitutos urinarios tridimensionales ortotípicos y heterotípicos utilizando para ello, matrices extracelulares de fibrina y agarosa nanoestructuradas, células uroteliales y células mesenquimales de la gelatina de Wharton diferenciadas a urotelio.
4. Evaluar in vitro los sustitutos ortotípicos y heterotípicos de mucosa urinaria mediante análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico.



# MATERIALES Y MÉTODOS



# **1. Generación de cultivos primarios de células de mucosa urinaria humana y de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton**

En la presente Tesis Doctoral se generaron cultivos primarios de células epiteliales (uroteliales) y células estromales (fibroblastos) de mucosa urinaria humana, así como cultivos primarios de células madre mesenquimales humanas de la gelatina de Wharton.

Para la generación de los cultivos primarios de células epiteliales (uroteliales) y estromales (fibroblastos) de mucosa urinaria humana, se utilizaron pequeños fragmentos de uréter y vejiga humana obtenidos bajo anestesia general en pacientes sometidos a intervención quirúrgica programada por parte de los facultativos del Servicio de Urología del hospital Universidad Virgen de las Nieves. Asimismo, las biopsias de uréter y vejiga fueron utilizadas dentro de este estudio, como controles de tejido nativo normal. Para la utilización de las muestras biológicas fue necesario la firma de un consentimiento informado por parte de todos los pacientes.

En el caso de los cultivos primarios de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (HWJSC), los cultivos primarios fueron obtenidos a partir de pequeños fragmentos de cordón umbilical humano procedente de cesáreas programadas de mujeres gestantes a término, contando con el consentimiento informado de la gestante. Los cultivos de dichas células están actualmente disponibles en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada, donde se mantienen almacenados a -180,0 °C en nitrógeno líquido.

A continuación, se describen con detalle los métodos y técnicas utilizados para la obtención de células humanas de la mucosa urinaria y células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton.



### **1.1. Cultivo de células epiteliales procedentes de mucosa urinaria**

Para obtener cultivos primarios de células epiteliales de la mucosa urinaria fue necesario utilizar la técnica de explante, ampliamente descrita por diferentes autores (63,64,65). Para la utilización de esta técnica, las biopsias de mucosa urinaria humana fueron fragmentadas en múltiples porciones de 5mm aproximadamente. Una vez realizado dicho procedimiento, se procedió al cultivo celular mediante frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>; y se utilizó medio de cultivo específico para células epiteliales denominado (QC) constituido por HAM-F12: 150 ml; DMEM: 300 ml; suero bovino fetal: 50 ml; penicilina-estreptomicina: 50 UI/ml; adenina: 24 µg/ml; insulina: 5 µg/ml; triyodotironina: 1.3 ng/ml; toxina colérica: 8.3 ng/ml; hidrocortisona: 0.4 µg/ml y factor de crecimiento epidérmico: 10 ng/ml.

### **1.2. Cultivo de células estromales procedentes de mucosa urinaria**

Para generar cultivos primarios de células estromales de mucosa urinaria (fibroblastos), se llevó a cabo digestión enzimática con colagenasa tipo I. Una vez se llevó a cabo la disociación celular, las muestras fueron centrifugas y el pellet celular fue resuspendido en 5ml de medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (ref. D6429 de Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos. Todas las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### **1.3. Cultivo de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (HWJSC)**

Las células mesenquimales de la gelatina de Wharton se obtuvieron a partir de pequeñas biopsias de cordón umbilical de recién nacidos por cesárea los cuales se encontraban a término. Después del parto, los cordones



umbilicales se manejaron en condiciones estériles en un banco de tejidos. Las arterias y las venas se eliminaron quirúrgicamente con el objetivo de evitar la contaminación con glóbulos rojos. Una vez, seccionada la porción arterial y venosa, las biopsias se cortaron en pequeños fragmentos obteniendo de esta manera, explantes de 0,5 por 0,5 cm de diámetro. A continuación, los explantes fueron digeridos enzimáticamente utilizando colagenasa tipo I (Gibco BRL Life Technologies) y tripsina-EDTA (ácido L-etilendiaminotetraacético) (Gibco BRL). Una vez llevada a cabo la digestión enzimática que permitió el aislamiento y separación de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, dichas células fueron cultivadas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> y mantenidas en condiciones de cultivo estándar con medio de cultivo Amniomax-C100 (ref. 17001-074 de Gibco BRL) a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub> (57,59).

Para la caracterización de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, se siguieron los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (66). En este contexto, las HWJSC fueron caracterizadas mediante citometría de flujo, para lo cual las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS e individualizadas mediante métodos enzimáticos y centrifugadas durante 5 minutos a 1500rpm. Cada tubo de ensayo contenía 250.000 HWJSC, las cuales fueron incubadas durante 30 minutos con 5 µl de anticuerpo primario marcado con FITC (Mouse Anti-human CD90, PE Mouse Anti-Human CD44, PerCP-Cy Mouse Anti-human CD105, APC Mouse Anti-Human CD73) o con 20 µl de cada anticuerpo control (hMSC Positive Isotype Control Cocktail, PE hMSC negative Isotype Control Cocktail), todos ellos pertenecientes al kit comercial Human MSC Analysis kit (BD Stemflow™). Pasado el tiempo de incubación, cada tubo fue centrifugado y el sobrenadante fue eliminado para resuspender el pellet celular en 300 µl de PBS. Finalmente, los siete tubos de citometría fueron analizados mediante un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, NJ, EEUU).



Por otra parte, las células HWJSC cultivadas en Amniomax se mantuvieron en cultivo durante 10 días hasta alcanzar el máximo nivel de confluencia, momento en el cual formaron una estructura tisular homogénea sobre la cual se llevaron a cabo experimentos de caracterización celular y de componentes de la matriz extracelular (Figura 23).



Figura 23. Estructura producida por las HWJSC mantenidas en cultivo confluyente teñida con eosina.

## **2. Generación de sustitutos de mucosa urinaria humana mediante Ingeniería Tisular**

En la presente tesis doctoral se fabricaron dos tipos de sustitutos tridimensionales de la mucosa urinaria humana: sustitutos ortotípicos y sustitutos heterotípicos. En ambos casos, en primer lugar, se generaron sustitutos estromales con biomateriales de fibrina-agarosa y fibroblastos estromales de mucosa urinaria humana. Posteriormente, en el caso de la mucosa urinaria ortotípica, se utilizaron células uroteliales humanas para generar el sustituto epitelial sobre el sustituto estromal. En el caso de los sustitutos de mucosa urinaria heterotípicos, se utilizó una fuente alternativa de células (HWJSC). Para la fabricación de los sustitutos tridimensionales de mucosa urinaria ortotípica y heterotípica se utilizaron protocolos de cultivo



celular en sistemas tridimensionales previamente descritos por el grupo de investigación CTS-115 para la generación de piel, córnea y mucosa oral humana (57,67,68), En ambos casos, se utilizaron como controles experimentales las muestras de mucosa urinaria nativa.

## **2.1 Generación de un sustituto estromal de mucosa urinaria**

Para la generación de sustitutos estromales de mucosa urinaria, fue necesaria la utilización de cultivos primarios de fibroblastos previamente aislados mediante la utilización de técnicas enzimáticas. Una vez los cultivos primarios alcanzaron niveles de confluencia superiores al 70%, las células fueron aisladas de la superficie de cultivo utilizando tripsina-EDTA (0,25%) (Thermo Fisher- Scientific), tomándose  $5 \times 10^5$  células procedentes de cultivos primarios, las cuales fueron resuspendidas en 2ml de medio de cultivo DMEM. Tras ello, se agregaron 21 ml de plasma sanguíneo humano recogido en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería. Con el objetivo de evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina, se agregaron 200  $\mu$ L de ácido tranexámico y 2ml de  $Cl_2Ca$  al 1% para precipitar la reacción de formación del coágulo de fibrina. Previamente se añadió agarosa al 2% (p/v) diluida en PBS y precalentada hasta fusión. Estos sustitutos se colocaron en incubador a 37 °C y se mantuvieron con medio de cultivo DMEM con el objetivo de promover la proliferación de las células estromales de mucosa urinaria (Figura 24) (69, 70, 71, 72, 73).



Figura 24. Imágenes representativas de sustitutos estromales de la mucosa urinaria generados con biomateriales de fibrina-agarosa y fibroblastos de mucosa urinaria.



## **2.2. Generación de un sustituto epitelial de mucosa urinaria**

Una vez generado el sustituto estromal de mucosa urinaria, tal y como se describió en el apartado anterior, se procedió a generar un equivalente epitelial ortotípico o heterotípico de mucosa urinaria sobre la superficie estromal. Para la elaboración de dichos sustitutos epiteliales, fue necesaria la utilización de técnicas de cultivo secuenciales. Para esto, fue necesario utilizar sistemas de cultivo transwell® con membranas porosas de 0,4µm de diámetro (Costar, Corning Inc., Corning, New York, EEUU). Estos sistemas están compuestos por una placa de 6 pocillos en los cuales cada uno contiene una membrana porosa de policarbonato que permite el flujo de nutrientes y evita la migración celular.

- Generación de un sustituto epitelial de mucosa urinaria ortotípico.

Para la generación de los sustitutos epiteliales ortotípicos mediante Ingeniería Tisular, 24 horas más tarde de la fabricación del sustituto estromal, se tripzinizaron los cultivos primarios de células uroteliales de mucosa urinaria humana, cultivándose las células individualizadas (250.000 células en cada caso) sobre la superficie de los sustitutos estromales en medio de cultivo QC. Los sustitutos epiteliales se mantuvieron en medio de cultivo durante 7 y 14 días.

-Generación de un sustituto epitelial de mucosa urinaria heterotípico.

Para la generación de los sustitutos epiteliales heterotípicos mediante Ingeniería Tisular, se utilizó la misma técnica descrita previamente en la generación de los sustitutos ortotípicos, utilizando en este caso HWJSC como fuente alternativa de células (250.000 células en cada caso). Al igual que los sustitutos de mucosa urinaria heterotípicos, las HWJSC se mantuvieron en inmersión en medio de cultivo QC durante 7 y 14 días.



### **2.3. Inducción del proceso de diferenciación urotelial de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton en los sustitutos epiteliales de mucosa urinaria**

En cada sustituto de la mucosa urinaria humana, se utilizaron fibroblastos de la mucosa urinaria inmersos en el biomaterial, los cuales ejercen una importante acción inductora mediante un proceso de interacción epitelio-mesénquima. Además, para favorecer el proceso de diferenciación epitelial en los sustitutos tridimensionales de mucosa urinaria, se utilizaron diferentes medios inductores. Todos los sustitutos tridimensionales se dividieron en cuatro grupos (Figura 25):

- Sustitutos de mucosa urinaria ortotípicos mantenidos con medio de cultivo QC específico de células epiteliales.
- Sustitutos tridimensionales heterotípicos mantenidos con medio de cultivo Amniomax–C100 (medio básico para las células HWJSC utilizado como control).
- Sustitutos de mucosa urinaria heterotípicos cultivados con medio de cultivo QC.
- Sustitutos tridimensionales de mucosa urinaria que se mantuvieron en cultivo con medio condicionado MC (74). El medio MC se generó cultivando las células de epitelio urinario humano (uroteliales) en medio QC hasta que éstas alcanzaron semiconfluencia (aproximadamente, a los 9 días). Posteriormente, se cambió el medio por QC fresco, el cual se dejó en cultivo durante 2 días, recogándose tras ese tiempo. Tras ello, el medio recogido se filtró utilizando un filtro de 0,2 µm de diámetro de poro y se añadió un 10% de suero bovino fetal, un 1% de antibióticos y un 0,1% de factor de crecimiento epidérmico EGF.

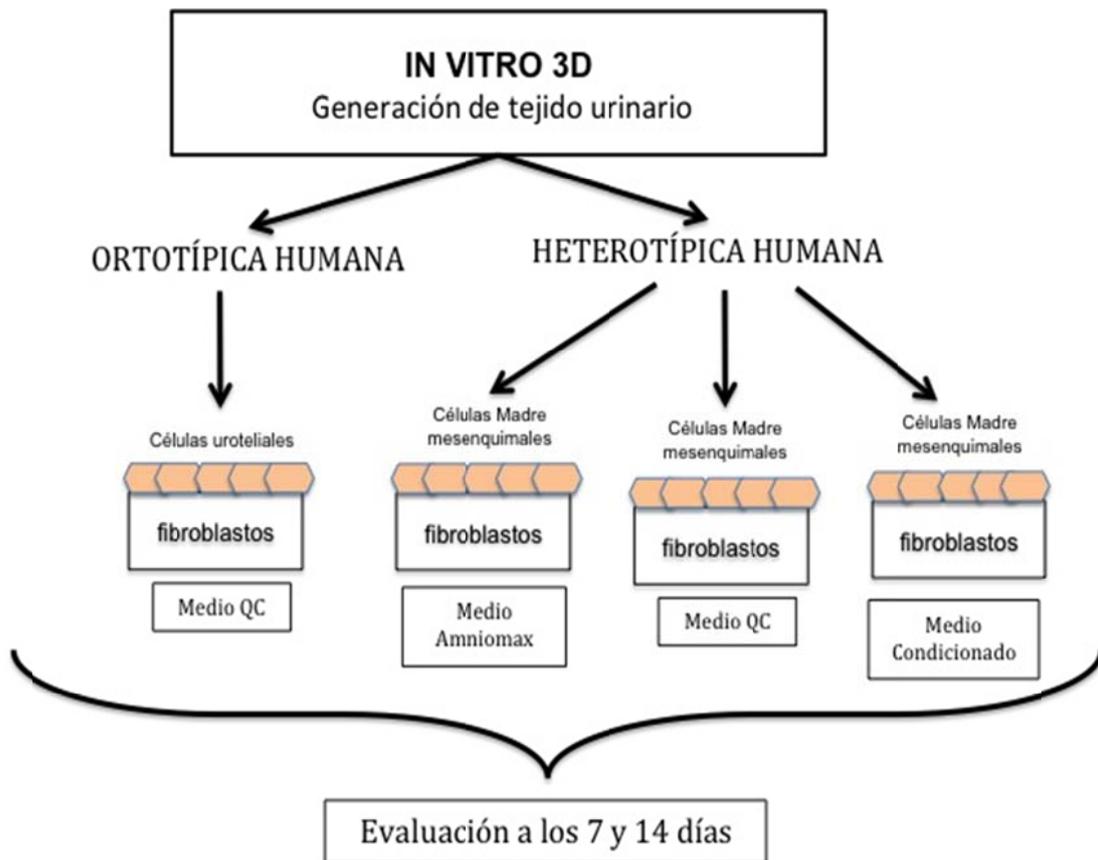


Figura 25. Grupos de inducción de diferenciación de los sustitutos tridimensionales ortotípicos y heterotípicos

## 2.4. Nanoestructuración y generación de estructuras tubulares

Una vez generados, los sustitutos tridimensionales ortotípicos y heterotípicos fueron sometidos a un proceso de nanoestructuración previamente desarrollado por el grupo de investigación con el objeto de mejorar las propiedades biomecánicas de estos sustitutos (75,76,77,78). Para ello, se extrajo cuidadosamente cada sustituto tisular de la superficie de cultivo, depositándose sobre un filtro poroso de nylon estéril. Sobre la superficie del constructo, se depositó una malla quirúrgica de poliéster estéril para evitar dañar el epitelio localizado a este nivel. Posteriormente, se aplicaron dos láminas de papel de filtro Whatman 3MM por debajo y otras dos por encima del conjunto y se depositó un fragmento de vidrio de 500 g de peso en la



superficie para aplicar presión controlada durante 3 minutos. Tras ello, se extrajo el tejido cuidadosamente y se introdujo en PBS para evitar su desecación.

Para la generación de estructuras tubulares similares a los órganos huecos del aparato urinario (uréter y uretra, por ejemplo), se procedió a recortar el tejido nanoestructurado con una cuchilla hasta obtener una forma cuadrada de aproximadamente 2x1 cm. Posteriormente, se colocó un tubo de silicona sobre la superficie epitelial del constructo, suturándose ambos extremos con sutura de seda de 8/0 con el objetivo de obtener una estructura tubular (Figura 26).

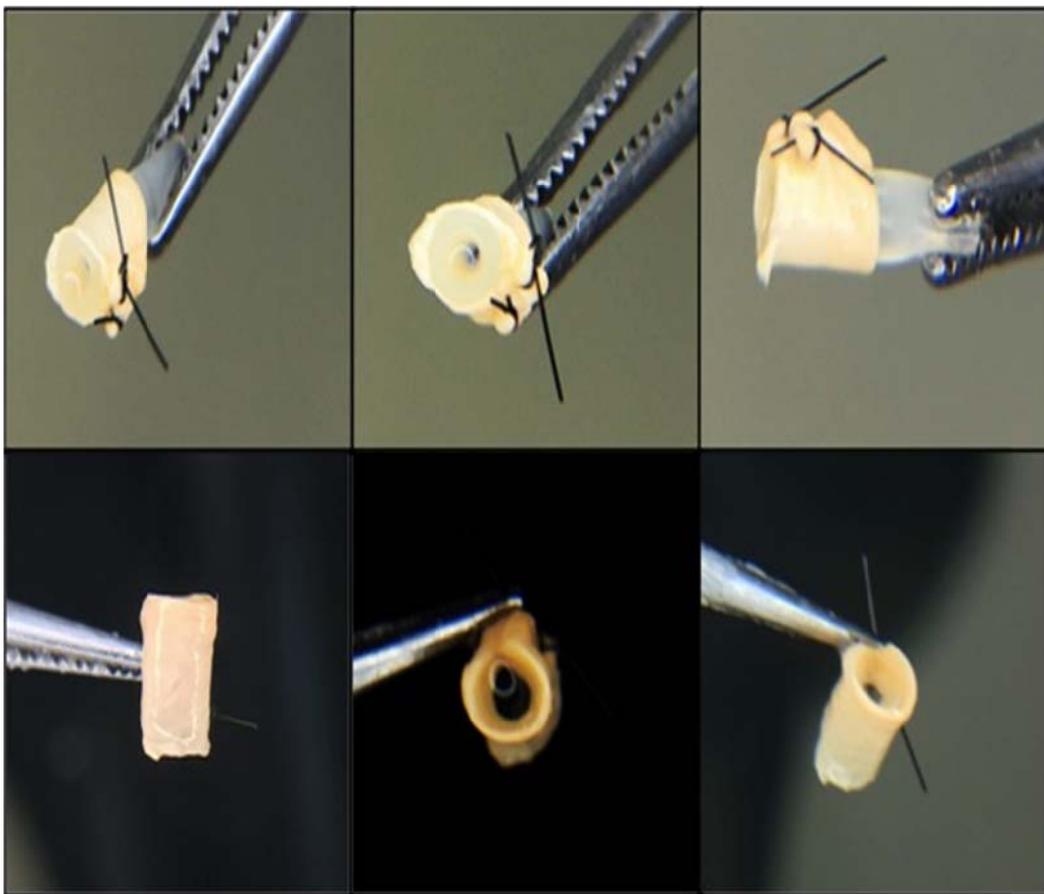


Figura 26. Constructo nanoestructurado suturado sobre un tubo de silicona.



### **3. Análisis histológico**

#### **3.1. Microscopía óptica**

Para el análisis mediante microscopía óptica, tanto las muestras de control nativo de mucosa urinaria como las muestras de estructuras derivadas de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton y los sustitutos de mucosa urinaria ortotípicos y heterotípicos fueron fijados en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80% ,96% y 100%). A continuación, el etanol se sustituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina siguiendo técnicas estándar. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4  $\mu\text{m}$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante microscopio óptico.

#### **3.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras de estudio correspondientes a los controles nativos de mucosa urinaria, las estructuras derivadas de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton y los sustitutos tridimensionales de mucosa urinaria fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1M (pH 7.4) a 4°C durante 4-6 horas, lavándose a continuación tres veces en tampón cacodilato. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona y se desecaron mediante la técnica de punto crítico (79,80). Tras ello, las muestras se recubrieron con átomos de oro y paladio y se analizaron mediante un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 (FEI, Eindhoven, The Netherlands) en modo de alto vacío.



### **3.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Para el análisis ultraestructural de las estructuras derivadas de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron tal y como se describió en el apartado anterior de microscopía electrónica de barrido. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de postfijado en tetróxido de osmio al 1% y deshidratado en acetona. Las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 horas a 4°C, obteniéndose secciones ultrafinas que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se analizaron en un microscopio EM902 (Carl Zeiss Medi-tec, Oberkochen, Alemania).

## **4. Análisis histoquímico**

Para el análisis histoquímico de los componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de las diferentes muestras estudiadas en la presente Tesis Doctoral (muestras de control nativo de mucosa urinaria, muestras de estructuras derivadas de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, sustitutos de mucosa urinaria ortotípicos y sustitutos de mucosa urinaria heterotípicos), en primer lugar se obtuvieron secciones de los tejidos previamente fijados e incluidos en parafina como se detalló para microscopía óptica. Estas secciones tisulares fueron desparafinizadas en xileno durante 15 minutos (dos veces) y rehidratadas mediante diluciones crecientes de etanol hasta agua destilada. Tras ello, las muestras se tiñeron utilizando la técnica de picrosirius y reticulina de Gomori para evaluar la presencia de componentes fibrilares de la matriz extracelular o de azul alcian y ácido periódico de Schiff (PAS) para evaluar los componentes no fibrilares de la matriz extracelular según se describe a continuación.



#### **4.1. Método histoquímico de Picrosirius**

La tinción mediante picrosirius es una técnica altamente utilizada para identificar fibras de colágeno maduras, componentes fibrilares muy importantes de la matriz extracelular del tejido conectivo de la mucosa urinaria. Para tal objeto, las secciones histológicas rehidratadas se tiñeron durante 30 minutos en una solución de Sirius Red F3B (Sigma-Aldrich), contrastándose después con hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron sometidas a deshidratación con alcoholes de concentración ascendente y xileno, montándose con cubreobjetos utilizando bálsamo de montaje histológico.

#### **4.2. Método histoquímico reticulina de Gomori**

Para la detección de fibras reticulares, otro de los componentes fibrilares fundamentales de la matriz extracelular, se utilizó el método de Gomori. En primer lugar, se llevó a cabo una impregnación con sales de plata, las cuales reducen sobre las fibras reticulares. Para tal efecto, las muestras de estudio fueron sumergidas en permanganato de potasio al 1% durante 1 minuto. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a sensibilización con alumbre de hierro al 2% durante 2 minutos e incubadas durante 15 minutos en oscuridad en plata amoniacal y formaldehído al 20% durante 3 minutos. Finalmente, la diferenciación se realizó en cloruro de oro al 2% durante 5 minutos y tiosulfato durante 1 minuto, contrastándose brevemente con hematoxilina. Finalmente, las muestras fueron sometidas a deshidratación utilizando alcoholes ascendentes, para su posterior impregnación en xileno y montaje.

#### **4.3. Método histoquímico azul alcian**

Con el objetivo de identificar el contenido de proteoglicanos presentes en las muestras de estudio, se utilizó el método de azul alcian. Para ello, las muestras fueron preparadas histológicamente hasta rehidratación como se



describió en apartados anteriores y se incubaron en solución de azul alcian a pH 2,5 durante 30 minutos. Una vez teñidas, se contrastaron con *nuclear fast red* para su posterior deshidratación, aclaramiento y montaje histológico.

#### **4.4. Método histoquímico con ácido periódico de Schiff (PAS)**

La tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) permitió la identificación de glicoproteínas y mucosustancias neutras en los tejidos estudiado en la presente Tesis Doctoral. Tras su rehidratación, las secciones tisulares fueron sumergidas en una solución de ácido periódico al 0,5% durante 5 minutos. Una vez realizada dicha inmersión, las muestras fueron incubadas en reactivo de de Schiff durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron contrastadas, deshidratadas, aclaradas y montadas con cubreobjetos.

### **5. Análisis mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

La detección de proteínas específicas en los tejidos estudiados se realizó mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos. Para llevar a cabo estos procedimientos, se obtuvieron secciones tisulares de 4  $\mu\text{m}$ , las cuales se desparafinizaron en xileno y se rehidrataron como se describió para el análisis histológico.

A continuación, en las muestras sometidas a inmunohistoquímica, se inactivaron las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrogeno y se procedió a realizar la recuperación antigénica utilizando buffer citrato o EDTA según se detalla en la tabla 2. Una vez realizada la recuperación antigénica, se lavaron las muestras y se procedió a bloquear sitios antagónicos inespecíficos utilizando *CAS-Block™ Histochemical Reagent* para su posterior incubación con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 2), lavándose en PBS e incubándose con el anticuerpo secundario. Una vez



llevada a cabo la reacción inmunológica, contando con la presencia de controles positivos y controles negativos, las muestras se contrastaron brevemente con hematoxilina de Harris y se montaron utilizando cubreobjetos de vidrio.

En el caso de las muestras analizadas mediante inmunofluorescencia (pancitoqueratina, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 13, desmoplaquina y *zonula occludens*), las secciones histológicas desparafinizadas y rehidratadas fueron sometidas a recuperación antigénica y bloqueo de los sitios inespecíficos como se detalló anteriormente y se recoge en la Tabla 2. Tras hibridar con el correspondiente anticuerpo primario y lavar, se aplicó un anticuerpo primario anti-anticuerpo de ratón o anti-anticuerpo de conejo marcado con un pigmento fluorescente (FITC o Cy3) lavándose con PBS a continuación. Tras contrateñir los núcleos con DAPI, las muestras se cubrieron con cubreobjetos y se analizaron mediante un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i.

Los análisis semicuantitativos se realizaron determinando la presencia o ausencia de señal obtenida mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para marcadores específicos utilizando la siguiente escala de medida:

- Señal negativa: -
- Señal levemente positiva: ±
- Señal positiva: +
- Señal altamente positiva: ++
- Señal intensa: +++



<b>ANTICUERPO</b>	<b>DILUCIÓN/ INCUBACIÓN</b>	<b>PRETRATAMIENTO</b>	<b>REFERENCIA</b>
Policlonal de conejo anti-colágeno tipo I	1:200 Toda la noche	Buffer EDTA pH 8 durante 25 min. a 95°C	Acris antibodies (Herford, Alemania) R1038
Monoclonal de ratón anti-PCNA	1:1000 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EEUU) P8825
Monoclonal de conejo anti-CD90 (Thy)	1:500 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Novus Biological (Littleton, CO, EEUU) EPR-2926
Monoclonal de ratón anti-CD105	1:50 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Laboratorio Vector (Burlingame, CA, EEUU) VP-C371
Monoclonal de ratón anti-citoqueratina 7 (clon: OV-TL 12/30)	Prediluido Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Master Diagnóstica (Granada, España) MAD-001004QD3
Monoclonal de conejo anti-citoqueratina 8	Prediluido Toda la noche	Buffer EDTA pH 8 durante 25 min. a 95°C	Master Diagnóstica (Granada, España) MAD-000693QD3
Monoclonal de ratón Anti-citoqueratina 13	1:400 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EEUU) C0791
Monoclonal de ratón anti-pancitoqueratina Clone C11	1:100 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EEUU) C2931
Monoclonal de ratón anti-desmoplaquina IgG2b	Prediluido Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Acris antibodies (Herford, Alemania) AM09122SU-N
Policlonal de conejo Anti-tjp1(ZO1)	1:75 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EEUU) HPA001637
Policlonal de conejo Anti-TJP2(ZO2)	1:75 Toda la noche	Buffer citrato pH 6 durante 25 min. a 95°C	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EEUU) HPA001813

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en esta Tesis Doctoral. Para cada anticuerpo, se muestra la referencia, la dilución utilizada y las condiciones específicas para recuperación antigénica aplicadas en cada caso.



## **6. Análisis de viabilidad celular**

Para determinar la viabilidad de las células localizadas en la estructura tisular generada por las HWJSC mantenidas en cultivo confluyente, se utilizó el kit comercial Live/Dead (calcein/AM-ethidium homodimer-1 viability/cytotoxicity assay kit, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Para poder evaluar la viabilidad celular, las estructuras derivadas de HWJSC se lavaron en PBS tres veces. Posteriormente, fueron incubadas en la mezcla de calceína y homodímero de etidio del kit diluida en PBS durante 15 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras ello, las muestras fueron lavadas tres veces más en PBS y colocadas sobre un cubreobjetos para su análisis, evaluando la viabilidad como porcentaje de células teñidas en color verde (células viables) respecto al total de células teñidas en verde y en rojo (células no viables) utilizando un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 90i.



# RESULTADOS



# 1. Generación y caracterización histológica de sustitutos ortotípicos de mucosa urinaria humana utilizando células nativas

La utilización del biomaterial de fibrina-agarosa descrito en el apartado Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral permitió elaborar sustitutos ortotípicos de la mucosa urinaria utilizando las células nativas del tracto urinario -células uroteliales y fibroblastos-, cuyas características histológicas se describen brevemente a continuación.

## - Análisis mediante microscopía óptica

Los resultados obtenidos mediante análisis con microscopía óptica reflejan una estructura formada por una única capa de células en la superficie del biomaterial que presentaba escasos niveles de diferenciación celular. Los estudios inmunohistoquímicos de marcadores típicos de este tipo de epitelio (uroplaquina III) y de uniones intercelulares tipo *zonula occludens* (ZO) confirman la escasa diferenciación y maduración del modelo ortotípico tanto a los 7 como a los 14 días de evolución (Figura 27).

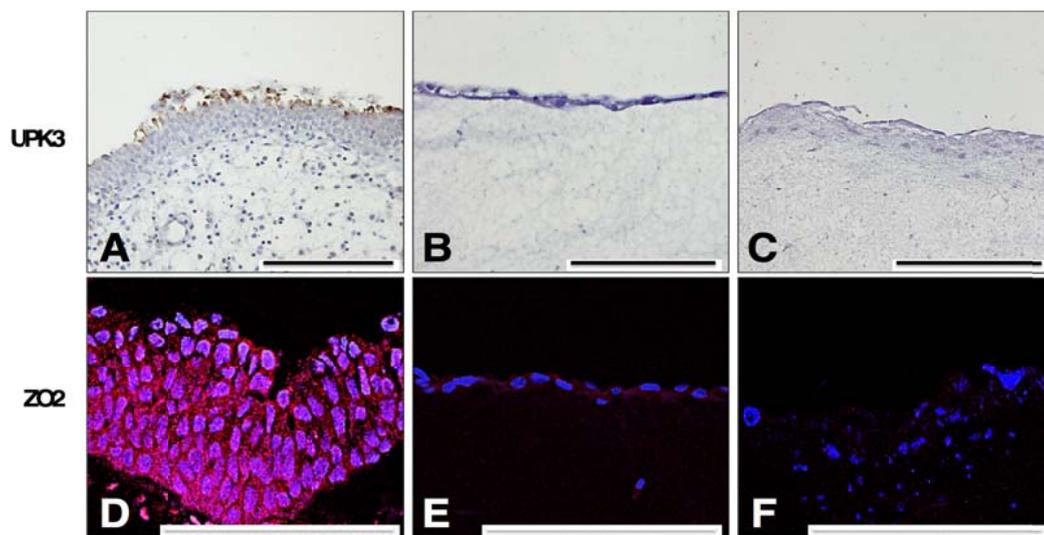


Figura 27. Análisis mediante inmunohistoquímica de uroplaquina III (UPK3) y de la proteína de unión *zonula occludens* 2 (ZO2) de los sustitutos ortotípicos de mucosa urinaria humana. **A:** análisis de UPK3 en vejiga humana de control. (**B-C**) análisis de UPK3 en sustitutos de mucosa urinaria a los 7 y 14 días. **D:** análisis de de ZO3 en vejiga humana de control. (**E-F**) Análisis de ZO3 en sustitutos de mucosa urinaria a los 7 y 14 días. Barras de magnificación: 25  $\mu$ m.



- Análisis mediante microscopía electrónica

La ultraestructura del modelo ortotípico confirmó el carácter simple del epitelio formado (Figura 28B), así como la escasa presencia de sistemas de unión intercelular. Por otra parte, los fibroblastos inmersos en el hidrogel de fibrina-agarosa no ofrecen la morfología fusiforme característica de las células estromales, si bien muestran un aparato biosintético muy desarrollado (Figura 28A).

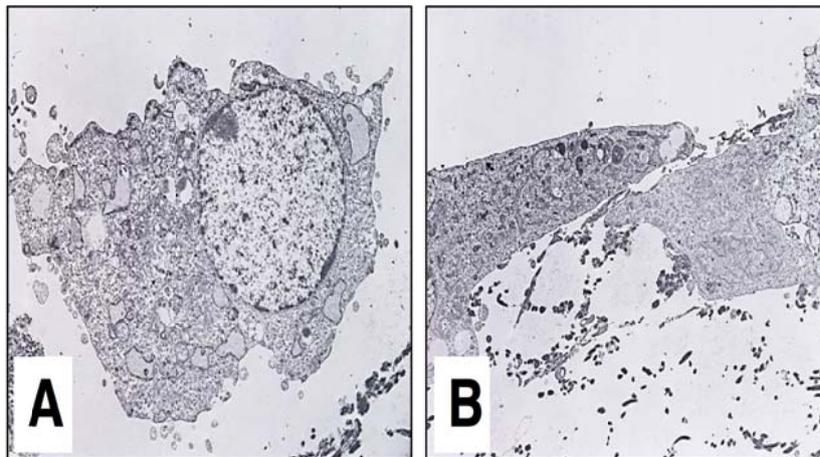


Figura 28. Análisis ultraestructural de las células de los sustitutos ortotípicos de mucosa urinaria humana. A: Célula estromal inmersa en el sustituto artificial; B: células uroteliales sobre lamina propia del sustituto artificial de mucosa urinaria.

## **2. Caracterización de la fuente alternativa utilizada de células madre mesenquimales (células mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical -HWJSC-)**

### **2.1. Citometría de flujo**

El análisis mediante citometría de flujo, de la población de HWJSC a estudio reveló, que el 94,73% de la población celular era positivo para marcador CD90, se demostró además que el 94,46% de la población celular era



positiva para marcador CD105 y finalmente, se encontró que el 99,43% de la población celular era positiva para marcador CD73 (Figura 29).

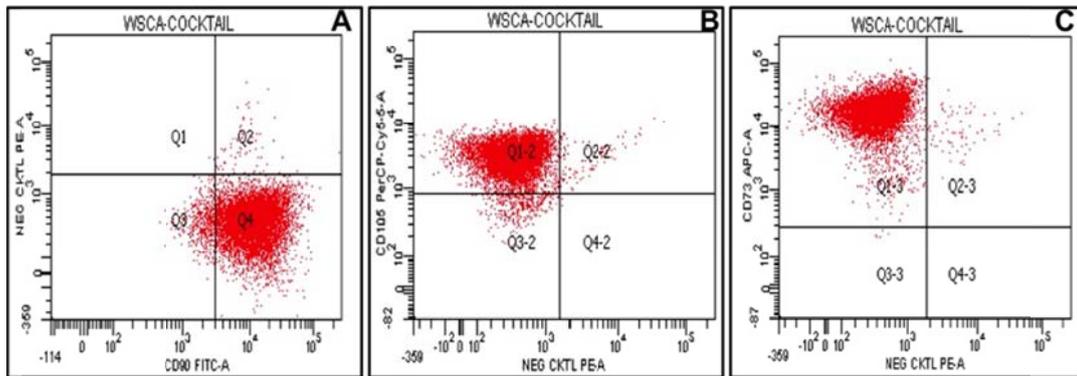


Figura 29. Panel obtenido mediante citometría de flujo del porcentaje de expresión de marcadores de células mesenquimales detectados en la población celular a estudio (WHJSC)

A: CD90, B: CD105, C: CD73.

## 2.2. Caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica de las HWJSC mantenidas en cultivo

Para su caracterización, las HWJSC se cultivaron hasta confluencia según se describió en el apartado Materiales y Métodos. Bajo estas condiciones de confluencia, las células formaron a una delgada membrana adherida al frasco de cultivo, la cual empezó a despegarse del frasco de cultivo aproximadamente dos días después de su formación. A nivel macroscópico, se encontró que las estructuras formadas por las HWJSC presentaban una morfología rectangular de aproximadamente 2 x 1,5cm.

### - Análisis mediante microscopía óptica

El análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina reveló la presencia de un gran número de células inmersas en su interior (Figura 30A, B, C). Además, se encontraron numerosas zonas de matriz extracelular en las que la presencia de células era muy escasa (zonas pobres en células). Estas zonas estaban distribuidas al azar a lo largo de toda la estructura, rodeadas y delimitadas por abundante presencia celular (zonas ricas en células) (Figura 30B, C).



Los análisis con métodos histoquímicos revelaron, mediante tinción de azul alcian, la presencia de proteoglicanos predominantemente en las zonas de matriz extracelular pobre en células (Figura 30D). Del mismo modo, el análisis de las fibras de colágeno utilizando tinción de picrosirius, mostró que el colágeno estaba presente en toda la estructura, pero era más abundante en las zonas pobres en células (Figura 30E).

Posteriormente, los análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-colágeno tipo I mostraron señal altamente positiva en toda la estructura, especialmente en las zonas pobres en células (Figura 30F). Además de los anteriores hallazgos, el análisis de proliferación celular realizado mediante inmunotinción para PCNA demostró que la mayoría de las células expresaban este marcador de proliferación (Figura 30G). Cuando se analizó la expresión de citoqueratinas, se encontró que menos del 50% de las células resultaron positivas para CK8 (Figura 30I), mientras que la mayor parte de las células presentaban expresión del marcador pancitoqueratina (Figura 30J). Asimismo, el análisis inmunohistoquímico de marcadores de indiferenciación celular de estirpe mesenquimal mostró que la mayoría de las células eran positivas para CD90 y CD105 (Figura 30K, L).

Finalmente, el análisis de la viabilidad celular reveló que el 99% de las células eran viables, apareciendo de color verde en la tinción con el marcador Live-Dead (Figura 30H).

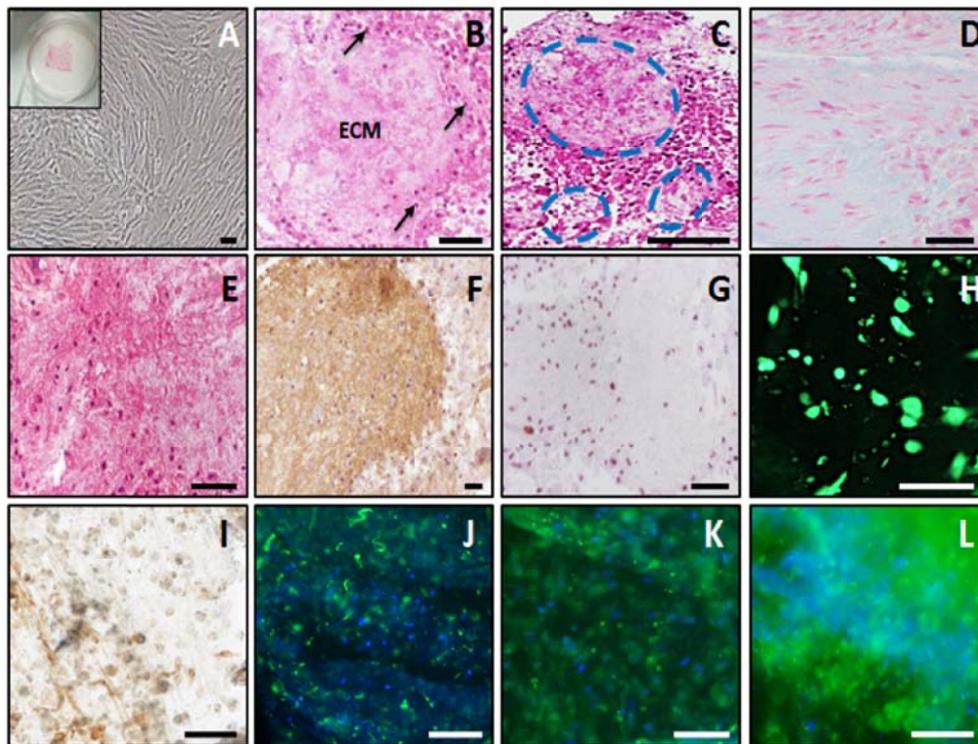


Figura 30. Análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de las estructuras formadas por las células HWJSC cultivadas hasta confluencia. **A:** cultivo de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton; **B-C:** tinción de hematoxilina-eosina; **D:** tinción de azul alcian; **E:** tinción de picrosirius **F:** inmunohistoquímica anti-colágeno tipo I; **G:** inmunohistoquímica anti-PCNA, **H:** prueba de viabilidad Live-dead; **I:** inmunohistoquímica anti-Citoqueratina 8; **J:** inmunofluorescencia anti-pancitoqueratina; **K:** inmunofluorescencia anti-CD90; **L:** inmunofluorescencia anti-CD105 Barra de magnificación: 50  $\mu$ m

#### - Análisis mediante microscopía electrónica

La microscopía electrónica de barrido de las HWJSC cultivadas hasta confluencia demostró que la superficie de estas estructuras consistía en una mezcla de células y fibras de matriz extracelular (Figura 31A, B). En su mayor parte, las fibras cubrían la superficie de las estructuras analizadas, encontrándose dispersas aleatoriamente en diferentes orientaciones. Además, estas estructuras eran altamente porosas, con un  $40,5 \pm 11,4\%$  de la superficie correspondiente a área de porosidad.

El microscopio electrónico de transmisión confirmó la abundante presencia de células rodeadas de gran cantidad de material extracelular (Figura 31). El material encontrado en la matriz extracelular contenía componentes fibrilares y no fibrilares, siendo más abundantes los no fibrilares y las áreas de material



pseudofibrilar. Cabe destacar que no se pudieron identificar fibras maduras en esta matriz extracelular (Figura 31). Además, se observó que las células presentaban un núcleo eucromático con evidente nucléolo central. Más detalladamente, la mayoría de las células mostraban la presencia de organelas de síntesis bien desarrolladas, incluyendo retículo endoplásmico rugoso, retículo endoplásmico liso, ribosomas libres y asociados al retículo endoplásmico rugoso, así como mitocondrias y vesículas de exocitosis (Figura 31D, E, F).

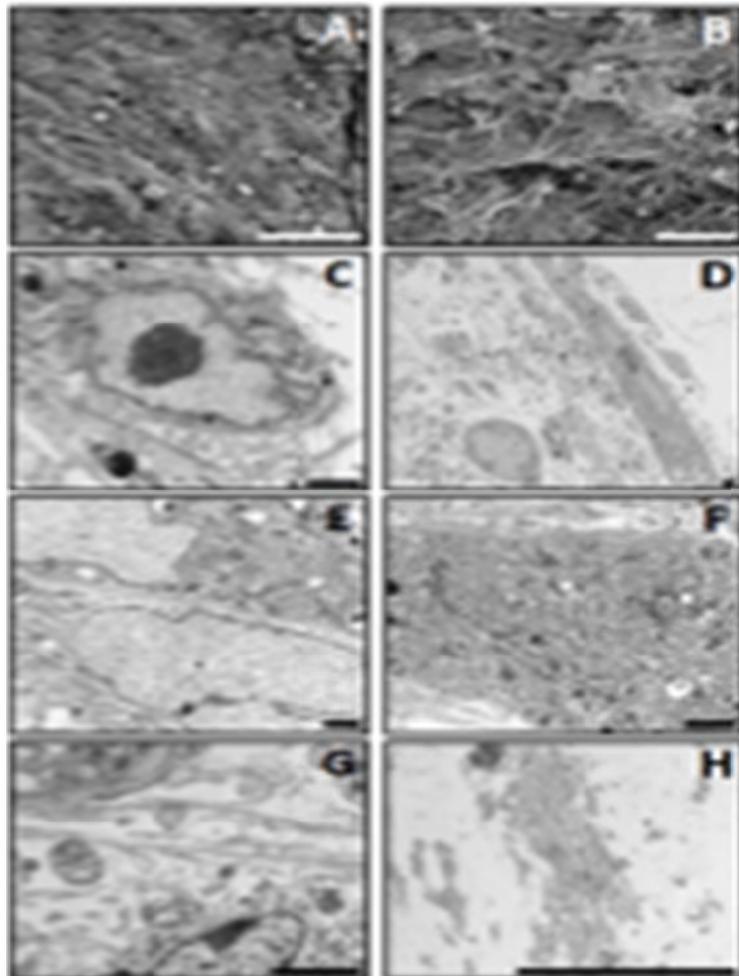


Figura 31. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras formadas por las células HWJSC cultivadas hasta la confluencia.



### **3. Caracterización histológica de los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana utilizando HWJSC como fuente celular alternativa**

La aplicación de los métodos y protocolos de biofabricación descritos en el apartado Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral permitió la eficiente generación de estructuras tubulares consistentes en una luz central rodeada de una pared tisular constituida por un el biomaterial nanoestructurado con fibroblastos y HWJSC. Como se puede apreciar en la (Figura 32C, F, I) los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana adquieren y conservan una forma circular en parte comparable a la morfología normal de algunos órganos del aparato urinario humano (Figura 32A, B), aunque carente de los pliegues internos de la mucosa típicos del tejido nativo.

El análisis mediante hematoxilina-eosina reveló que el tejido nativo (Figura 32A, B) presentaba diversas capas tisulares constituidas por músculo liso, tejido conectivo y tejido epitelial. El epitelio de la mucosa urinaria nativa humana presentaba núcleos a distintas alturas conformando la estructura típica de un epitelio transicional de tipo pseudoestratificado. Por el contrario, el estroma nativo estaba constituido por abundantes células, fundamentalmente fibroblastos, inmersas en una matriz extracelular muy rica en fibras.

Cuando se analizó el sustituto heterotípico de mucosa urinaria humana correspondiente al grupo cultivado con Amniomax (medio control) durante 7 días, se encontró un sustituto epitelial formado por dos o tres capas de células de estructura nuclear homogénea sin signos de diferenciación, localizado sobre el biomaterial de fibrina-agarosa en cuyo interior se observaba la presencia de fibroblastos dispersos. El análisis a los 14 días reveló un aumento del número de capas del sustituto epitelial, llegó a cinco a siete capas (Figura 32D, E).



En el grupo de sustitutos ureterales cultivados con medio QC, los análisis revelaron la presencia de un sustituto epitelial con aproximadamente diez capas celulares tanto a los siete como a los catorce días de evolución. Estas capas celulares estaban distribuidas de manera homogénea sobre la superficie estromal, encontrando, además, que las células más superficiales presentaron una morfología más aplanada, siendo más redondeada o prismática la de las células basales (Figura 32G, H). A nivel del sustituto estromal, se encontraron numerosos fibroblastos dispersos por un biomaterial homogéneo de aspecto fibroso.

Finalmente, los sustitutos ureterales cultivados con MC revelaron la presencia de un sustituto epitelial de dos a tres capas celulares al día 7 de cultivo, las cuales se mantuvieron o aumentaron levemente hasta las tres o cuatro capas al día 14. En general, el sustituto epitelial encontrado a los 7 días fue muy similar al de los 14 días, no encontrándose diferencias entre las células de las capas más superficiales con las de la capa basal. En lo que se refiere al sustituto estromal, se encontró un biomaterial fibrilar de aspecto homogéneo en el cual se distribuían al azar los fibroblastos ureterales (Figura 32J y K).

Por otro lado, los análisis del tejido control y de la mucosa urinaria humana generada mediante ingeniería tisular confirmó la estructura tubular de los sustitutos artificiales suturados sobre sí mismos para generar una estructura hueca con amplia luz en su interior (Figura 33). Aunque estos sustitutos mostraron ser circulares a la sección transversal, el diámetro de la luz existente en su interior fue sensiblemente inferior al encontrado en los controles de uréter humano nativo.

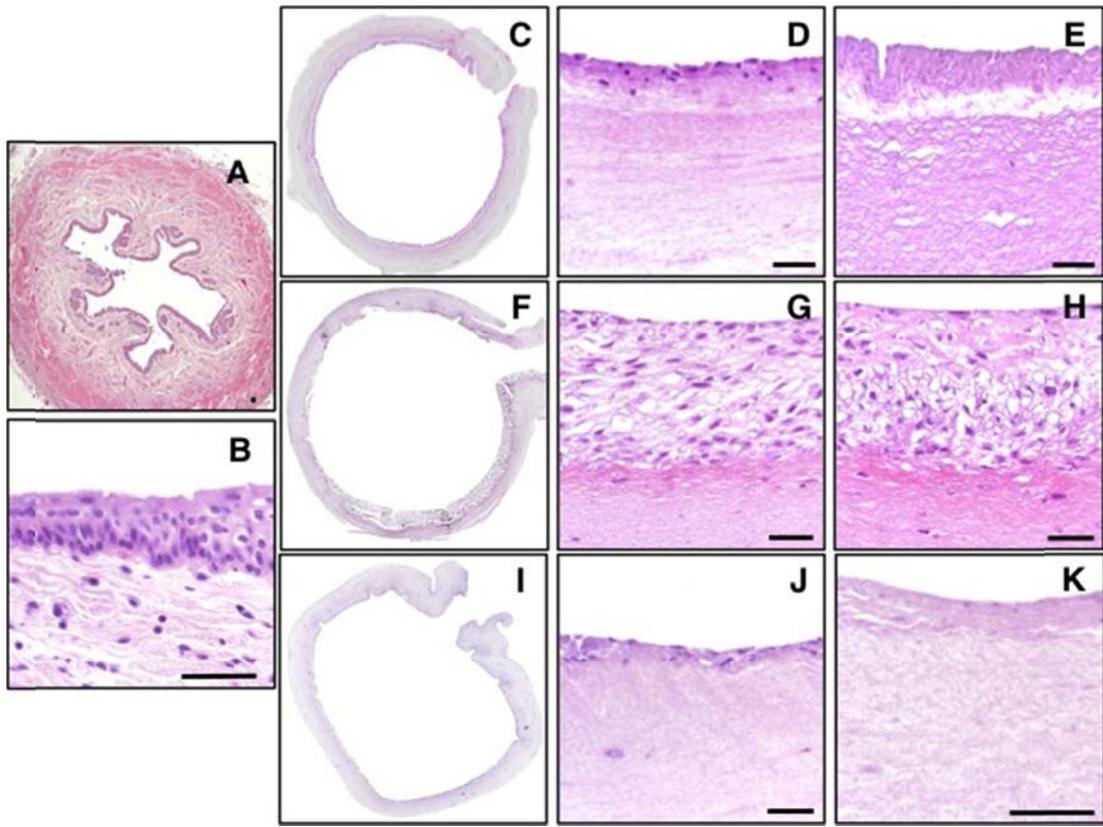


Figura 32. Análisis histológico mediante hematoxilina y eosina. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C y D: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; E: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; F y G: Cultivo en medio QC durante 7 días; H: Cultivo en medio QC durante 14 días; I y J: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; K: Cultivo en medio condicionado durante 14 días. Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.

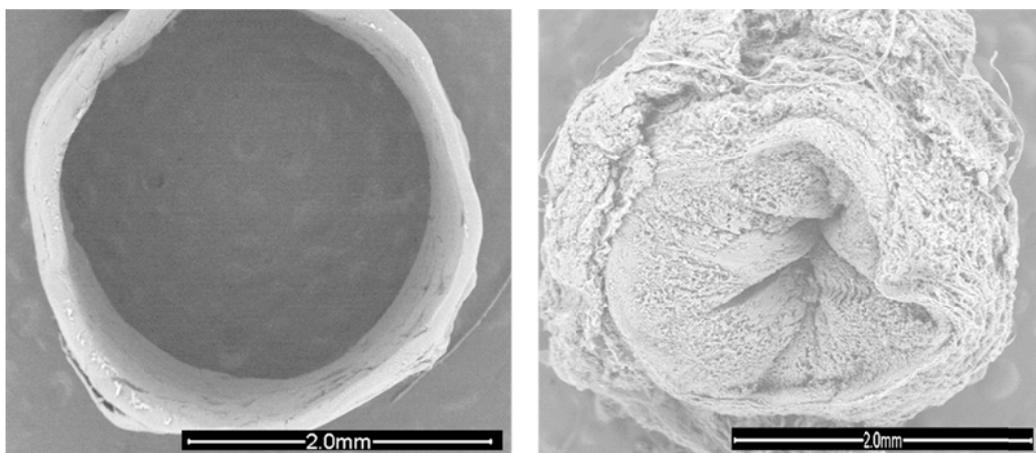


Figura 33. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de uno de los sustitutos de mucosa urinaria humana (izquierda) y del uréter humano nativo utilizado como control (derecha).



## **4. Caracterización histoquímica de los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana utilizando HWJSC como fuente celular alternativa**

### **4.1. Componentes fibrilares**

#### - Identificación de fibras de colágeno mediante tinción de *picrosirius*

El análisis de la mucosa urinaria nativa control mediante la tinción de *picrosirius* mostró una señal intensa (+++) del colorante, lo cual indica la presencia de abundantes fibras de colágeno maduro a nivel del estroma y de las capas de tejido conectivo asociadas al tejido muscular (Figura 34A, B).

El análisis de los sustitutos ureterales cultivados en medio Amniomax mostró señal negativa (-) a los 7 días y señal altamente positiva (++) a los 14, especialmente en el estroma artificial más cercano al sustituto epitelial (Figura 34C, D).

Los tejidos artificiales cultivados en medio QC presentaron señal positiva (+) igualmente en la región estromal más cercana al sustituto epitelial, tanto a los 7 como a los 14 días (Figura 34E, F).

Asimismo, las muestras cultivadas con MC mostraron señal negativa (-) a los 7 días, aumentando a positiva (+) a los 14 días (Figura 34G, H). Ver Tabla 3.

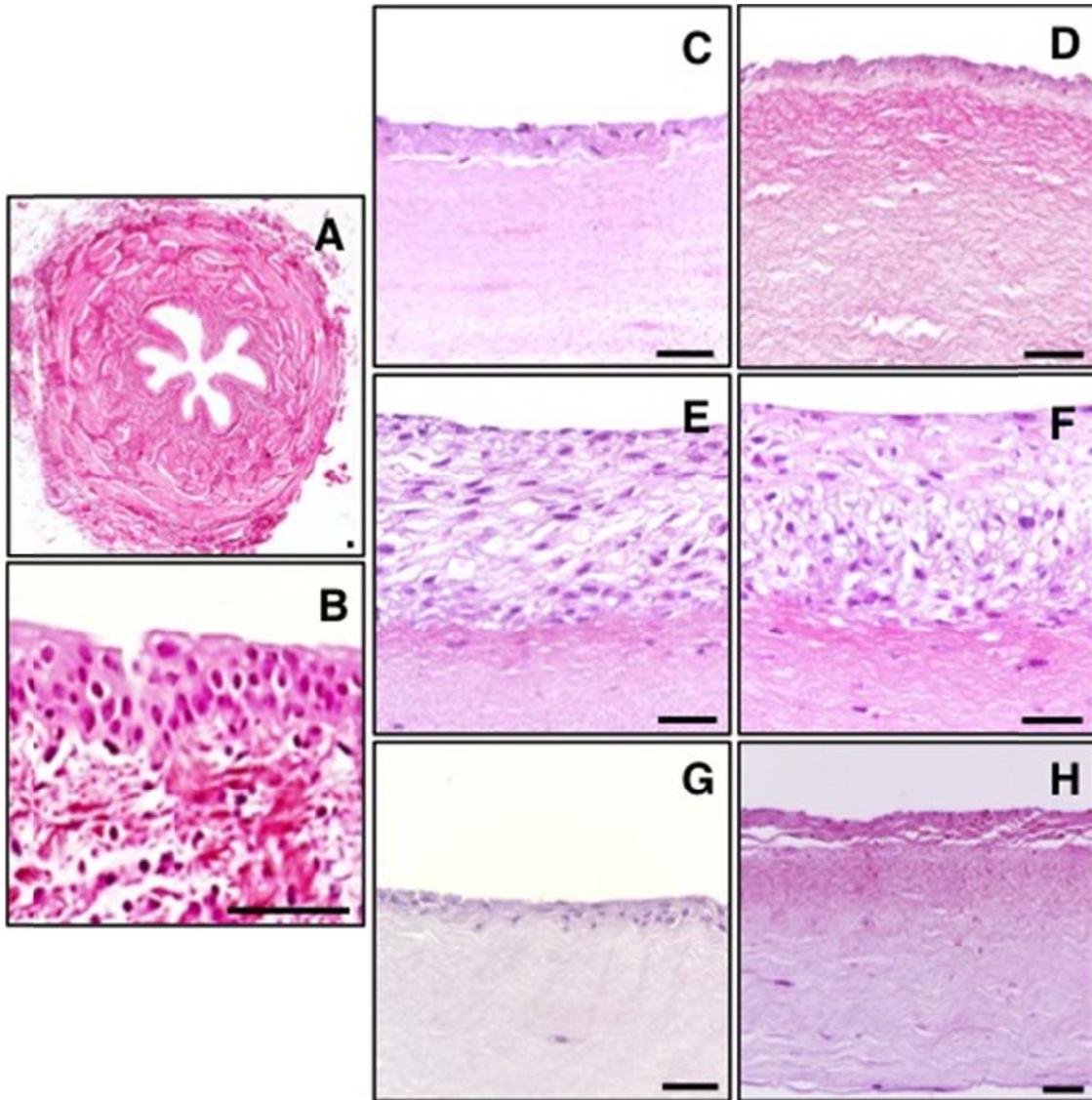


Figura 34. Análisis de la presencia de fibras de colágeno mediante tinción *picrosirius*. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días. Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.



- Identificación de fibras reticulares mediante *reticulina de Gomori*

El análisis histoquímico de fibras reticulares del estroma del tejido nativo mostró la presencia de este componente fibrilar en todo el tejido conjuntivo del estroma ureteral, siendo especialmente abundantes las fibras reticulares en el estroma más cercano a la capa epitelial, donde se encontró una señal intensa (+++) (Figura 35A, B).

En contra, la mayor parte de los sustitutos ureterales mostró una señal completamente negativa (-), con la única excepción de los sustitutos cultivados en medio QC durante 14 días, que presentó una señal levemente positiva ( $\pm$ ) (Figura 35C, D, E, F, G, H). Ver Tabla 3.

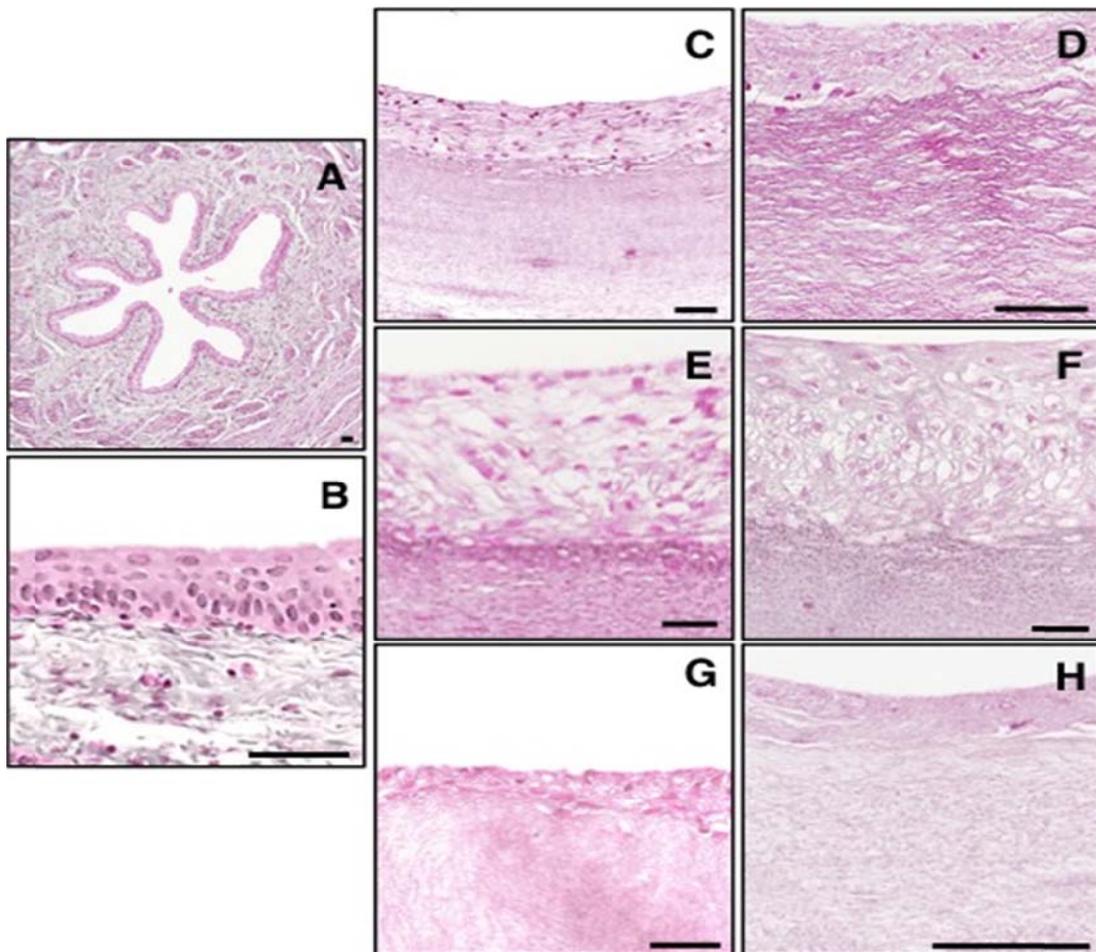


Figura 35. Análisis de la presencia de fibras reticulares mediante tinción reticulina de Gomori. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días. Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.



## **4.2. Componentes no fibrilares**

### **- Identificación de proteoglicanos mediante tinción con azul alcian**

El análisis histoquímico de los componentes no fibrilares de la matriz extracelular mediante tinción con azul alcian reveló la presencia de proteoglicanos en el tejido nativo distribuidos a lo largo del tejido conectivo del estroma ureteral y de la capa muscular, existiendo una señal intensa (+++) a nivel del estroma más próximo al epitelio y altamente positiva (++) en el resto del tejido conectivo (Figura 36A, B).

Cuando se analizaron los sustitutos tridimensionales mantenidos en medio control Amniomax durante 7 días, se encontró una marcación intensa (+++) a nivel del sustituto epitelial, siendo la marcación positiva (+) en el estroma más cercano a este sustituto epitelial (Figura 36C). A los 14 días, sin embargo, la señal epitelial fue altamente positiva (++) y negativa (-) en el estroma subyacente (Figura 36D).

En los sustitutos mantenidos en medio QC, se encontró señal altamente positiva (++) en el sustituto epitelial de los tejidos artificiales cultivados durante 7 días, mientras que los tejidos de 14 días de evolución presentaban señal intensa (+++) en el sustituto epitelial. En ambos casos, no se observó tinción de azul alcian en el sustituto estromal (Figura 36E, F).

Por último, los tejidos artificiales cultivados en medio MC presentaron señal positiva (+) en el sustituto epitelial tanto a los 7 como a los 14 días de desarrollo, siendo negativa (-) a nivel estromal (Figura 36G, H). Ver Tabla 3.

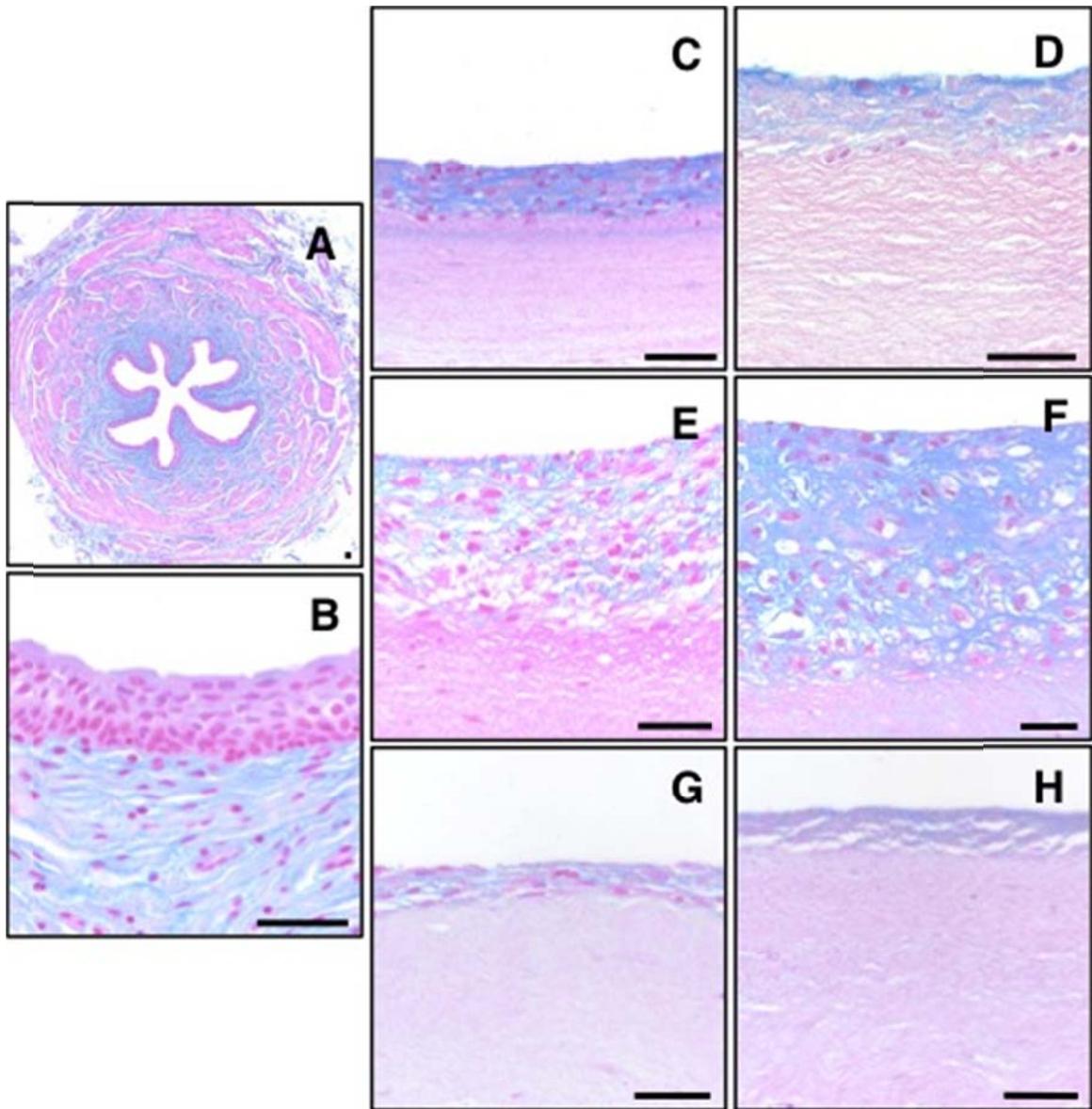


Figura 36. Análisis de la presencia de proteoglicanos mediante tinción con azul alcian. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días. Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.



- Identificación de glicoproteínas mediante tinción con ácido periódico de Schiff (PAS)

Los análisis histoquímicos mediante la tinción PAS revelaron la presencia de glicoproteínas e hidratos de carbono complejos en la capa más superficial del epitelio del tejido nativo (señal positiva +), así como una señal levemente positiva ( $\pm$ ) a nivel basal (Figura 37A, B).

En contraste, los sustitutos ureterales cultivados con Amniomax y con MC a los 7 y 14 días presentaron señal negativa (-) (Figura 37C, D, G, H).

Asimismo, los sustitutos cultivados con medio QC presentaron señal levemente positiva ( $\pm$ ) tanto a los 7 como a los 14 días en las capas superficial y basal del sustituto epitelial (Figura 37E, F). Ver Tabla 3.

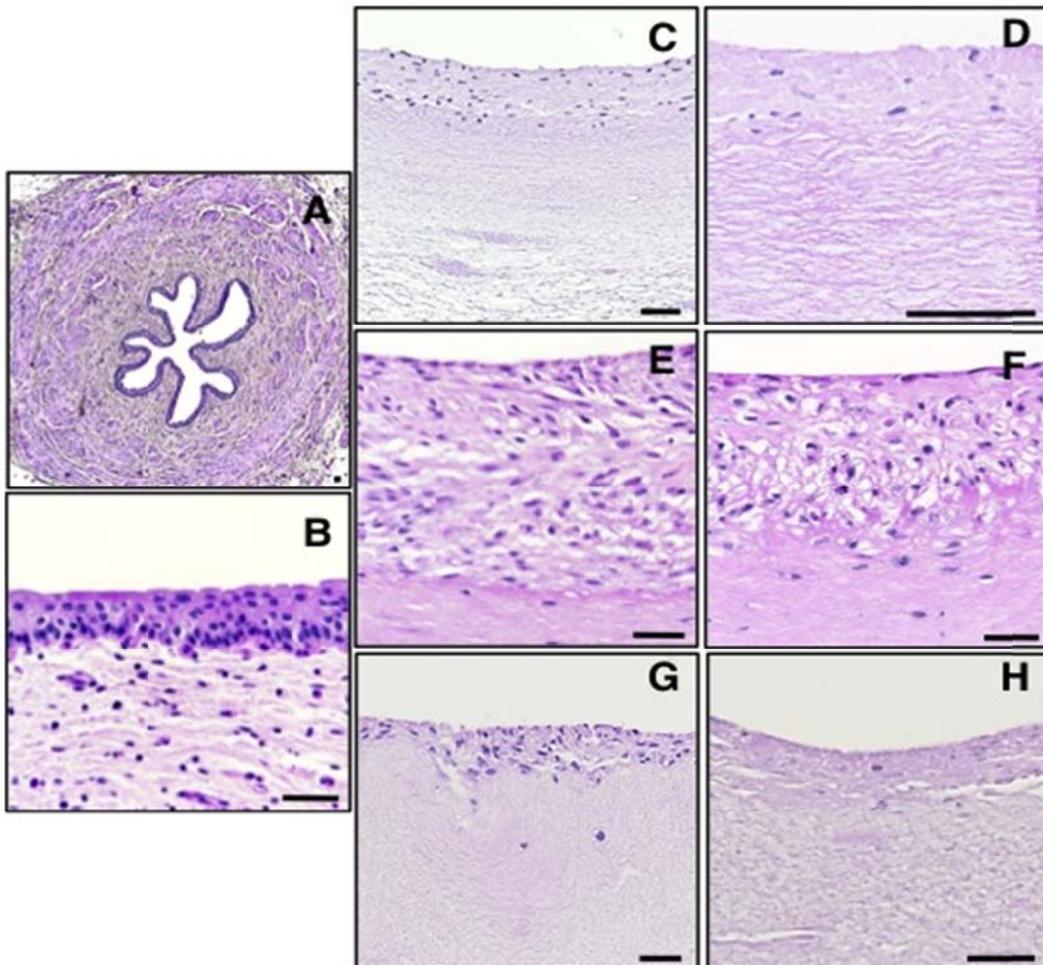


Figura 37. Análisis de la presencia de glicoproteínas mediante tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días. Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.



	<b>Picrosirius</b>	<b>Reticulina</b>	<b>Alcian blue</b>	<b>Acido periódico de schiff</b>
<b>Tejido Nativo</b>	+++	+++ subepitelial	+++ subepitelial ++ resto del tejido	+ nivel superficial ± nivel basal
<b>Amniomax 7 días</b>	-	-	+++ epitelial + subepitelial	-
<b>Amniomax 14 días</b>	++ subepitelial	-	++ epitelial	-
<b>QC 7 días</b>	+ subepitelial	-	++ epitelial	±
<b>QC 14 días</b>	+ subepitelial	± subepitelial	+++ epitelial	±
<b>MC 7 días</b>	-	-	+ epitelial	-
<b>MC 14 días</b>	+ subepitelial	+	+ epitelial	-

Tabla 3. Resultados del análisis semicuantitativo de los diferentes componentes reticulares y no reticulares de la matriz extracelular en la mucosa urinaria humana control y en los sustitutos tridimensionales cultivados en medio Amniomax, QC y MC durante 7 y 14 días. +++: señal intensa; ++: señal altamente positiva; +: señal positiva; ±: señal levemente positiva; -: señal negativa.



## **5. Caracterización inmunohistoquímica e inmunofluorescente de los sustitutos heterotípicos de mucosa urinaria humana utilizando HWJSC como fuente celular alternativa**

### **5.1. Expresión de citoqueratinas**

#### **- Pancitoqueratina**

En primer lugar, el análisis de expresión de citoqueratinas mediante el anticuerpo pancitoqueratina, capaz de reconocer un amplio grupo de citoqueratinas, reveló la presencia de una señal intensa (+++) en el epitelio de la mucosa urinaria nativa (Figura 38A, B). En segundo lugar, la señal obtenida en los sustitutos ureterales cultivados con Amniomax y MC fue altamente positiva (++) tanto a los 7 como a los 14 días de evolución (Figura 38C, B, G, H). Finalmente, en los sustitutos cultivados con medio QC se encontró una señal positiva (+) a los 7 y 14 días (Figura 38E, F). Ver Tabla 4.

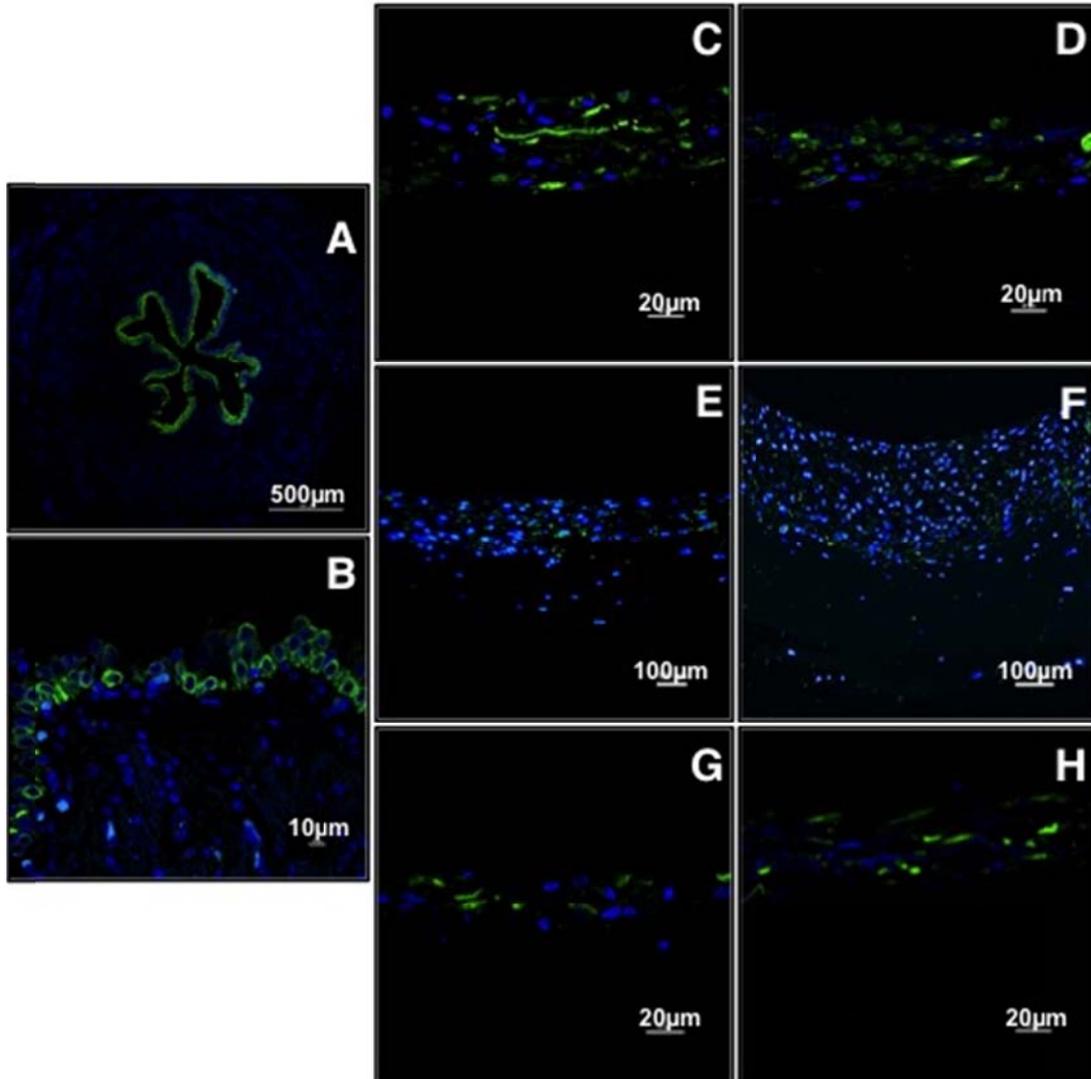


Figura 38. Análisis mediante inmunofluorescencia de pancitoqueratina. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.



- Citoqueratina 7

El análisis de citoqueratina 7 en el epitelio del tejido control nativo mostró una señal intensa (++++) en todo el epitelio (Figura 39A, B). Por el contrario, la mayoría de los sustitutos ureterales resultaron negativos para este marcador, con la única excepción de los sustitutos mantenidos en QC durante 14 días, que mostraron una señal levemente positiva ( $\pm$ ) (Figura 39C, D, E, F, G, H). Ver Tabla 4.

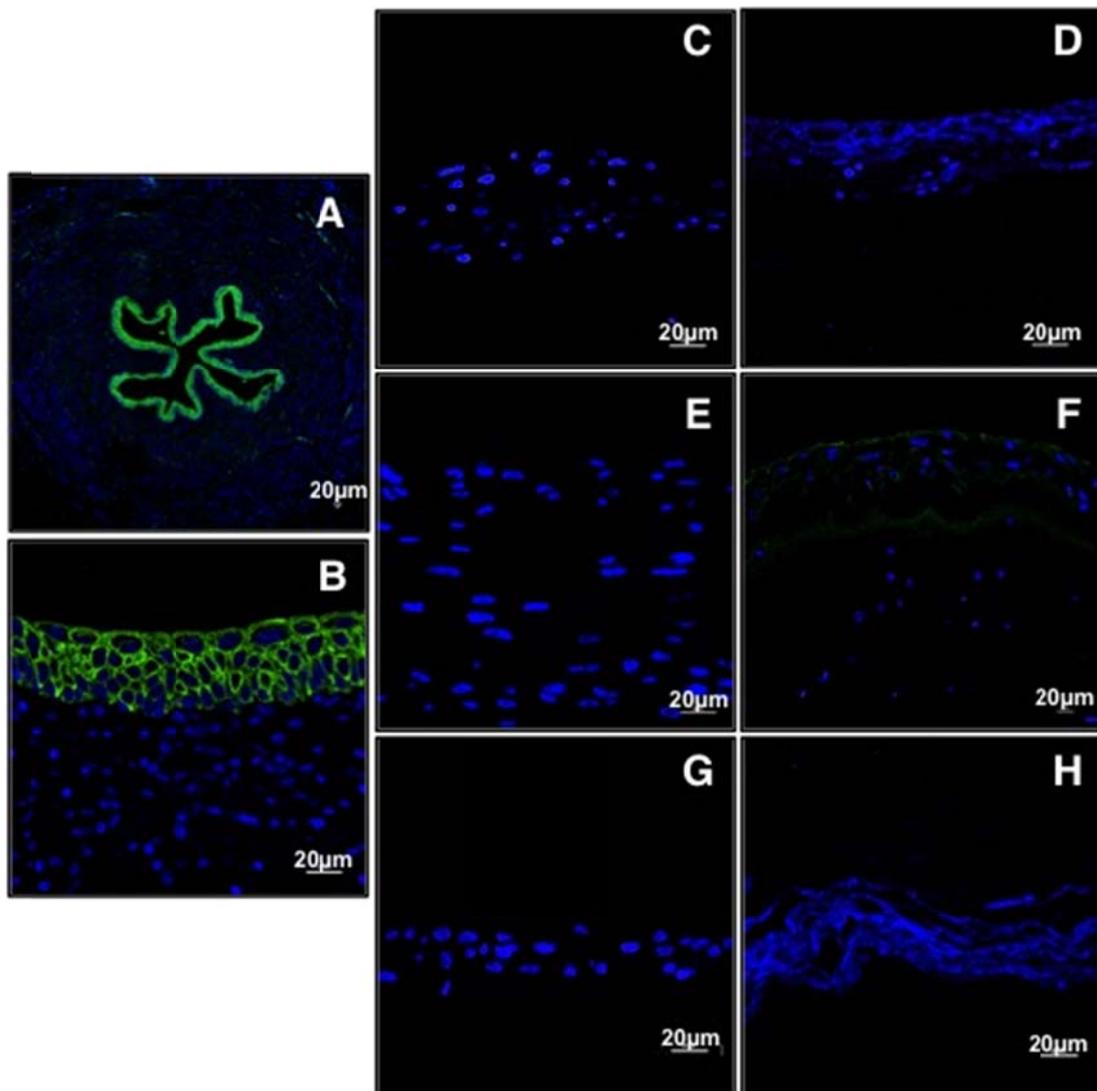


Figura 39. Análisis mediante inmunofluorescencia de citoqueratina 7. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.



### - Citoqueratina 8

Del mismo modo, la detección inmunohistoquímica de la citoqueratina 8 mostró señal intensa (+++) en todo el epitelio de la mucosa urinaria nativa (Figura 40A, B). El análisis de citoqueratina 8 en el grupo de sustitutos ureterales cultivados con medio Amniomax (Figura 40C, D) mostró señal levemente positiva ( $\pm$ ) tanto a los 7 como a los 14 días. En los sustitutos cultivados con medio QC durante 7 días, no encontramos expresión de citoqueratina 8 (señal negativa -), aunque a los 14 días la señal fue levemente positiva ( $\pm$ ) (Figura 40E, F). Por último, se encontró una señal altamente positiva (++) en los sustitutos correspondientes al día 7. Sin embargo, a los 14 días esta señal disminuye siendo levemente positiva ( $\pm$ ) (Figura 40G, H). Ver Tabla 4.

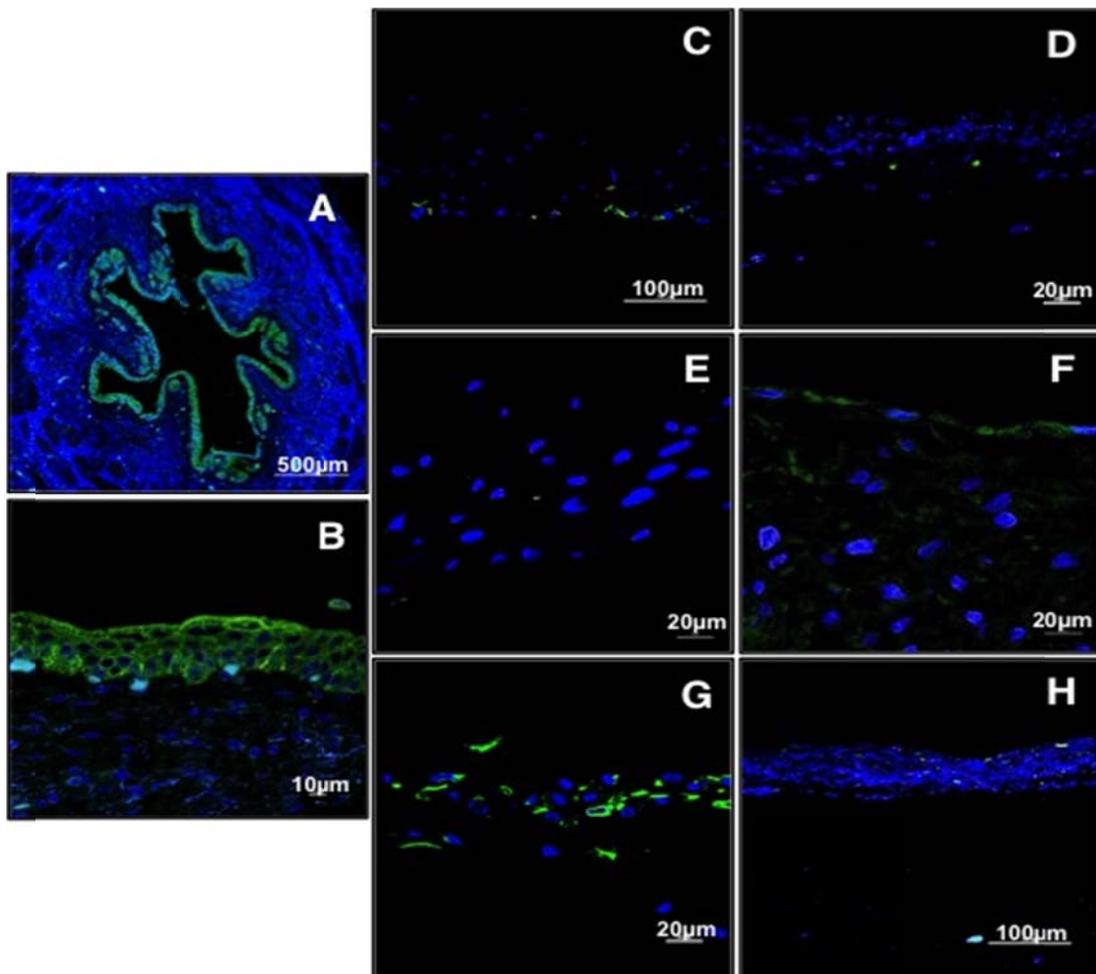


Figura 40. Análisis mediante inmunofluorescencia de citoqueratina 8. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.

### -Citoqueratina 13

Al igual que en los casos anteriores, los análisis inmunohistoquímicos para citoqueratina 13 demostraron que el epitelio de la mucosa urinaria humana nativa presenta señal intensa (+++) para este marcador (Figura 41A, B). Sin embargo, la señal fue negativa en el sustituto epitelial de los tejidos artificiales cultivados con medio Amniomax y con MC a todos los tiempos (Figura 41C, D, G, H). Aunque la señal fue negativa en los sustitutos ureterales cultivados durante 7 días en QC, la inmunofluorescencia para citoqueratina 13 reveló una señal positiva (+) en los tejidos artificiales cultivados en QC durante 14 días (Figura 41E, F). Ver Tabla 4.

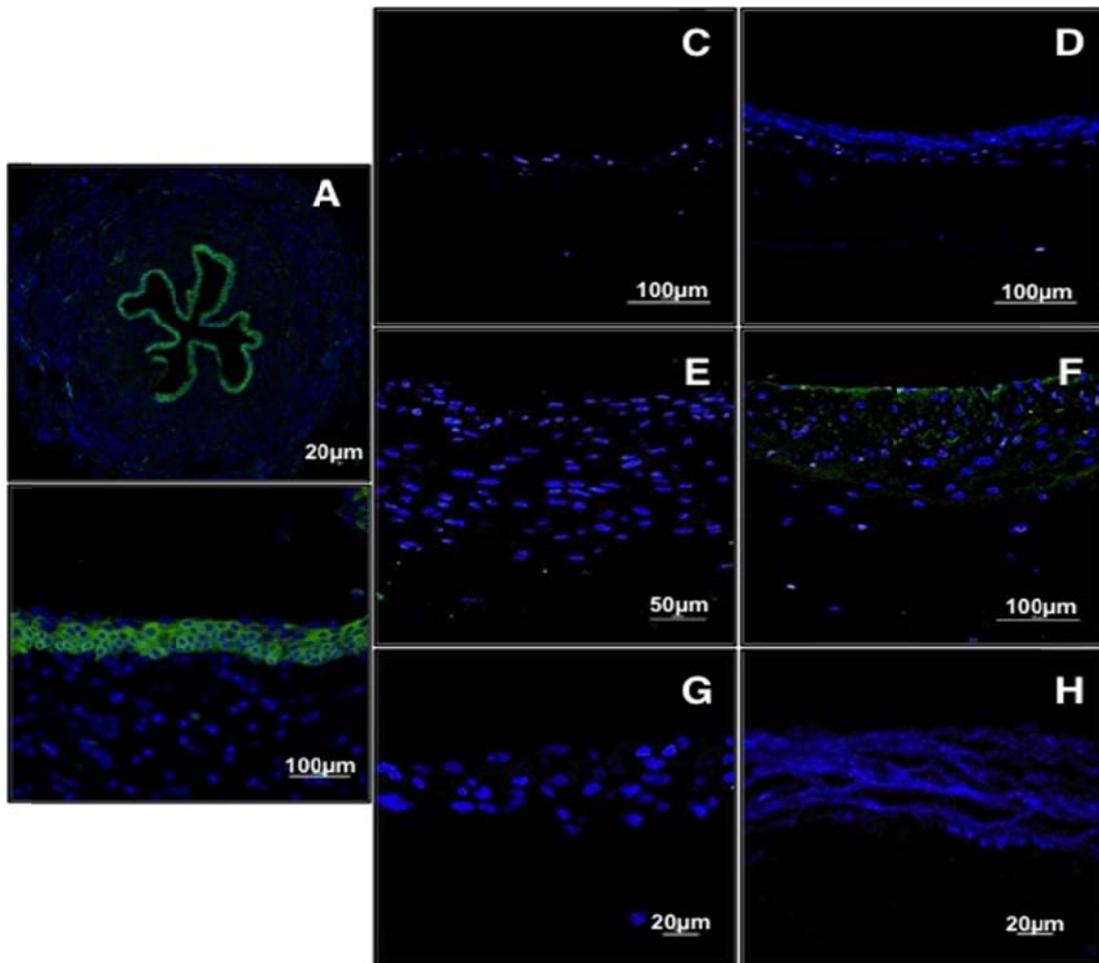


Figura 41. Análisis mediante inmunofluorescencia de citoqueratina 13. A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.

## 5.2. Expresión de proteínas de unión intercelular

### - Desmoplaquina (DSP)

Los análisis realizados mediante inmunofluorescencia para evaluar la presencia de desmoplaquina, componente de los desmosomas, mostraron una señal altamente positiva (++) en el epitelio del tejido nativo (Figura 42A, B). Cuando se analizaron las muestras cultivadas en medio Amniomax, se encontró una señal positiva (+) a los 7 y 14 días, estando esta señal dispersa en algunas células del sustituto epitelial (Figura 42C, D). En lo que respecta a los tejidos cultivados en medio QC y MC, encontramos señal levemente positiva ( $\pm$ ) a los 7 días, la cual aumentó ligeramente hasta hacerse positiva (+) a los 14 días en ambos casos (Figura 42E, F, G H). Ver Tabla 4.

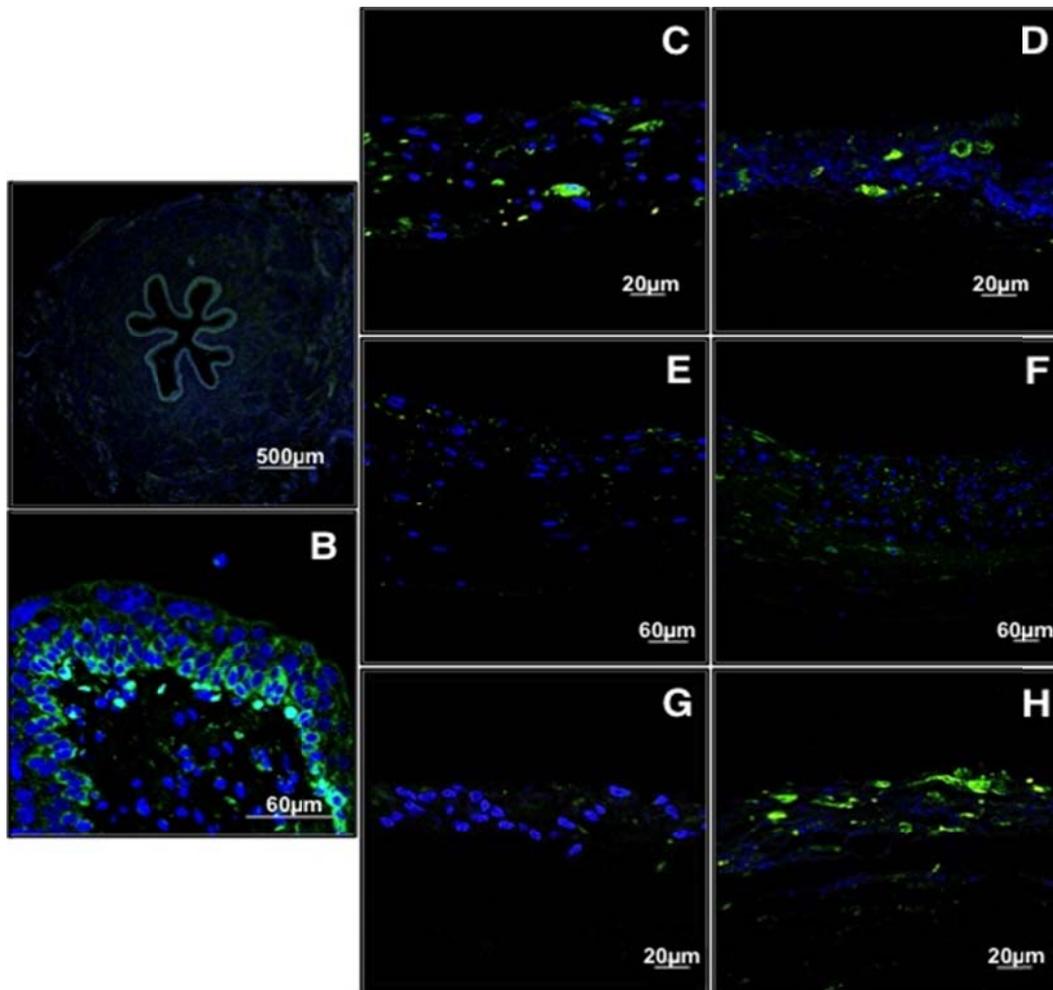


Figura 42. Análisis mediante inmunofluorescencia de desmoplaquina (DSP). A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.



- Zonula occludens 1 (ZO1)

El análisis de la proteína de unión *zonula occludens 1* (ZO1) en los controles de mucosa urinaria nativa reveló la presencia de este marcador en el epitelio del tejido nativo, presentando una señal intensa (+++) (Figura 43A, B). En contraste, la señal obtenida en los sustitutos cultivados con Amniomax y con MC fue negativa (-) tanto a los 7 como a los 14 días (Figura 43C, D, G, H). Sin embargo, en los sustitutos cultivados con medio QC, la señal fue altamente positiva (++) a los 7 y a los 14 días (Figura 43E, F). Ver Tabla 4.

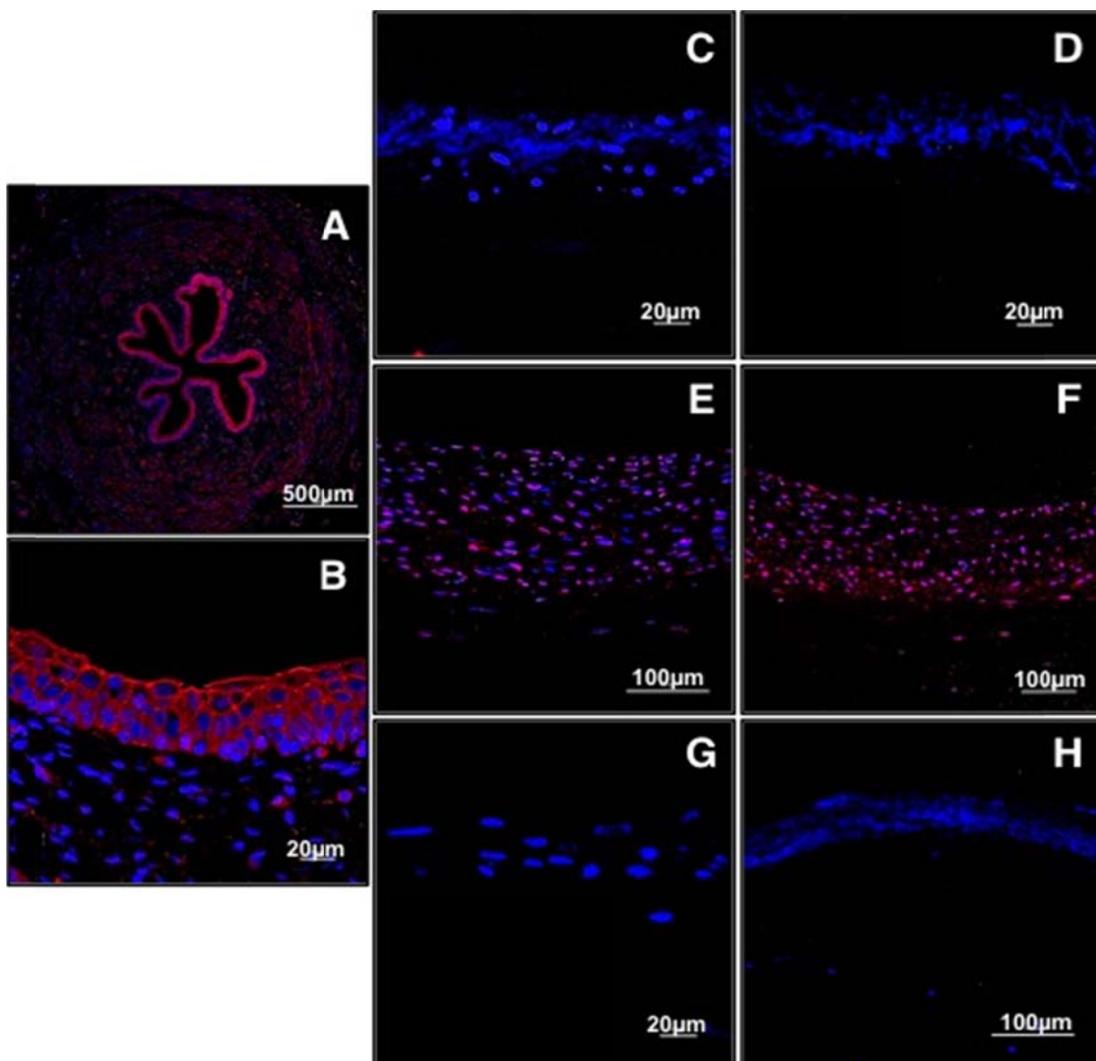


Figura 43. Análisis mediante inmunofluorescencia de la proteína de unión *zonula occludens 1* (ZO1). A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.



- Uroplaquina II (UPK2)

Los métodos de inmunohistoquímica para uroplaquina II mostraron señal intensa (+++) en todas las capas del epitelio correspondiente al control nativo, principalmente en su superficie (Figura 44A, B). Cuando se estudiaron los sustitutos ureterales cultivados en medio Amniomax, se encontró una señal altamente positiva a los 7 y 14 días en el sustituto epitelial, aunque no en todas sus células (Figura 44C, D). Sin embargo, la señal obtenida en el sustituto epitelial de los tejidos artificiales cultivados con QC y con MC fue negativa (-) tanto a los 7 como a los 14 días de desarrollo (Figura 44E, F, G, H). Ver Tabla 4.

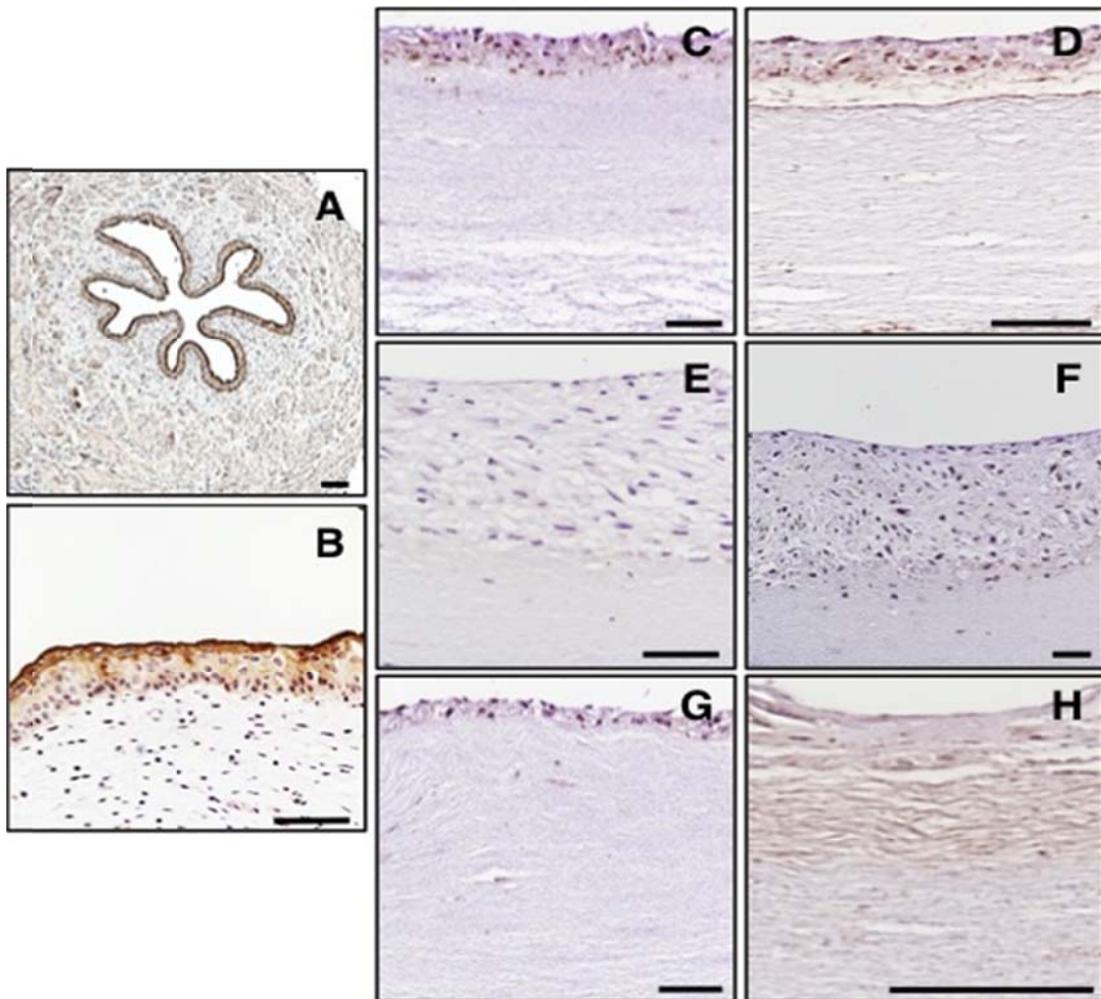


Figura 44. Análisis mediante inmunohistoquímica de uroplaquina II (UPK2). A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.

Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.



- Uroplaquina III (UPK3)

Finalmente, los estudios inmunohistoquímicos realizados para el marcador uroplaquina III volvieron a arrojar una señal intensa (+++) en la superficie epitelial del tejido nativo (Figura 45A, B). Sin embargo, el sustituto epitelial de todos los tejidos artificiales estudiados fue negativo (señal -) tanto a los 7 como a los 14 días de evolución (Figura 45C, D, E, F, G, H). Ver Tabla 4.

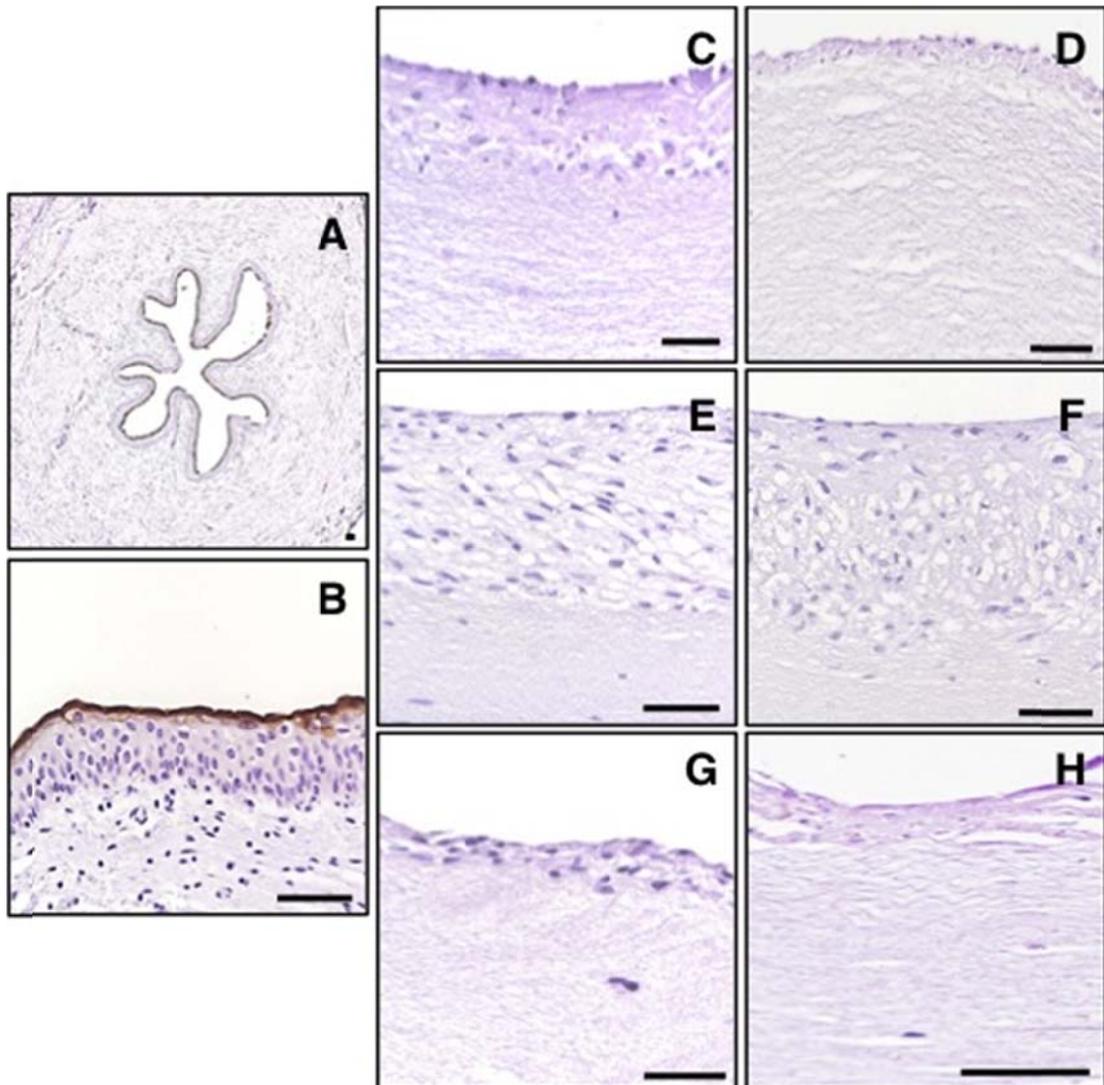


Figura 45. Análisis mediante inmunohistoquímica de uroplaquina III (UPK3). A, B: Muestras de mucosa urinaria humana control; C: Cultivo en medio Amniomax durante 7 días; D: Cultivo en medio Amniomax durante 14 días; E: Cultivo en medio QC durante 7 días; F: Cultivo en medio QC durante 14 días; G: Cultivo en medio condicionado durante 7 días; H: Cultivo en medio condicionado durante 14 días.

Barras de magnificación: 50  $\mu$ m.



	PCK	CK7	CK8	CK13	DSP	ZO1	UPK2	UPK3
<b>Tejido Nativo</b>	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
<b>Amniomax 7 días</b>	++	-	±	-	+	-	++	-
<b>Amniomax 14 días</b>	++	-	±	-	+	-	++	-
<b>QC 7 días</b>	+	-	-	-	±	++	-	-
<b>QC 14 días</b>	+	±	±	+	+	++	-	-
<b>MC 7 días</b>	++	-	++	-	±	-	-	-
<b>MC 14 días</b>	++	-	±	-	+	-	-	-

Tabla 4. Resultados del análisis semicuantitativo de los diferentes marcadores epiteliales en la mucosa urinaria humana control y en los sustitutos tridimensionales cultivados en medio Amniomax, QC y MC durante 7 y 14 días. +++: señal intensa; ++: señal altamente positiva; +: señal positiva; ±: señal levemente positiva; -: señal negativa.



# DISCUSIÓN



El reciente desarrollo de métodos y técnicas de ingeniería tisular ha posibilitado la generación de diferentes tipos de órganos y tejidos humanos con posible utilidad clínica, incluyendo la córnea, la piel, la mucosa oral, el nervio periférico y otros órganos artificiales (81,82). En el campo del aparato urinario, existen numerosos trabajos relacionados con la fabricación de sustitutos renales humanos mediante ingeniería tisular, habiéndose obtenido resultados prometedores mediante el uso de técnicas de descelularización y recelularización, formación de organoides renales derivados de células madre pluripotentes, regeneración a partir de xenoembriones y complementación blastocística (83,84). Asimismo, se han descrito numerosos modelos de los diferentes órganos que constituyen la vía urinaria humana, desde la pelvis renal hasta la uretra, generados mediante ingeniería tisular (38, 48). Sin embargo, ninguno de los modelos descritos hasta la fecha ha arrojado resultados plenamente satisfactorios a nivel clínico, lo cual ha impedido el uso clínico de los mismos salvo en casos puntuales (85).

Uno de los retos fundamentales que encuentran los investigadores es el desarrollo de un modelo biomimético de la mucosa urinaria humana capaz de reproducir la compleja estructura histológica y funcionalidad de esta estructura. Por un lado, aún no se ha desarrollado un biomaterial plenamente biocompatible capaz de soportar y promover el crecimiento de las células estromales de la mucosa urinaria. Por otro lado, la generación de un epitelio funcional similar al existente en los diferentes órganos de la vía urinaria (pelvis renal, uréter, vejiga, uretra) es un reto aún no resuelto. Por otro lado, la mayoría de los modelos actualmente disponibles utilizan células uroteliales obtenidas a partir de biopsias de la propia mucosa urinaria, lo cual genera importantes perjuicios para el paciente y limita enormemente la posibilidad de obtener grandes cantidades de células en cultivo. Por todo ello, se hace necesario buscar nuevas fuentes celulares alternativas capaces de generar mucosa urinaria humana sin la necesidad de utilizar biopsias de tejidos nativos.

En la presente Tesis Doctoral, en primer lugar hemos generado un modelo ortotípico de mucosa urinaria a partir de biomateriales de fibrina-agarosa y



células estromales y epiteliales de la mucosa urinaria humana nativa. Este modelo, que ya fue generado y descrito en trabajos previos del grupo de investigación demostró que la mucosa vesical ortotípica presenta escasos niveles de diferenciación y maduración *ex vivo* (73). Para completar dichos estudios previos, en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo estudios inmunohistoquímicos que confirman la idea de que la mucosa urinaria generada en laboratorio a partir de células de la vejiga urinaria humana presenta un epitelio muy poco desarrollado que no expresa marcadores típicos de la mucosa madura tales como uroplaquina III y *zonula occludens*, estando ambos relacionados con el desarrollo de complejos de unión célula-célula que garantizan la estanqueidad de dicho epitelio y, por tanto, la funcionalidad de la barrera epitelial (12,86) Asimismo, los estudios realizados mediante microscopía electrónica demostraron que las células ortotípicas de mucosa vesical presentaron signos de viabilidad una vez incorporadas al tejido artificial, pero sus niveles de diferenciación eran muy escasos. Estos resultados coinciden con los estudios previos antes mencionados y confirman la necesidad de elaborar otros modelos de mucosa vesical a partir de fuentes celulares alternativas que, además, sean fáciles de obtener (73). Aunque numerosos trabajos previos sugieren la idoneidad del modelo de vejiga artificial generado a partir de células de urotelio vesical aisladas de la vejiga urinaria humana (87), es bien sabido que las células epiteliales presentan grandes dificultades para su cultivo y mantenimiento en laboratorio (59). Por ello, se hace necesario investigar nuevas fuentes celulares fáciles de obtener y de cultivar en laboratorio para su futura utilización en ingeniería tisular de los diferentes órganos que componen el aparato urinario humano.

Una de las fuentes celulares alternativas más prometedoras son las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (HWJSC). Estas células son altamente accesibles, fáciles de cultivar debido a su elevada tasa de proliferación *ex vivo* y presentan bajos índices de rechazo inmunológico cuando son implantadas en un individuo de forma alogénica motivo por el cual se han utilizado ampliamente en ingeniería tisular (88). Su capacidad de diferenciación pluripotencial ha permitido la generación de sustitutos de diferentes tipos de epitelios a partir de HWJSC,



incluyendo el epitelio corneal (68), el endotelio vascular (89), la epidermis de la piel y la mucosa oral (59,90), e incluso estructuras similares al bulbo piloso (91). Además, estas células expresan diversos marcadores de tipo epitelial tanto en cultivo como in situ, en el propio cordón umbilical (68), lo cual las convierte en una prometedora fuente celular alternativa al uso de epitelio humano procedente de biopsias (92).

A pesar de sus propiedades, las HWJSC han sido muy escasamente utilizadas en ingeniería tisular del aparato urinario. De hecho, apenas existen algunos estudios en animales de laboratorio que han demostrado la utilidad potencial de estas células para generar un epitelio vesical funcional (93), siendo aún necesario realizar estudios en tejidos humanos. En la presente Tesis Doctoral, hemos utilizado las HWJSC como fuente alternativa para la fabricación de un sustituto de la mucosa urinaria con una capa estromal y un sustituto epitelial en su superficie. Para ello, en primer lugar hemos realizado una completa caracterización de estas células mantenidas en su medio básico de cultivo para confirmar las propiedades de estas células cuando son mantenidas en laboratorio.

A este respecto, los resultados demuestran que las HWJSC cumplen todos los criterios requeridos para las células mesenquimales humanas, incluyendo su carácter adherente con morfología fusiforme y la expresión de los marcadores de indiferenciación mesenquimal CD90, CD105 y CD73. Todo ello, de acuerdo con los criterios establecidos por el Comité para las Células y Tejidos Mesenquimales de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (94), sugiere que las células utilizadas en este estudio son células madre mesenquimales y, por tanto, poseen potencialidad diferenciativa hacia diferentes estirpes celulares.

Una vez comprobado su carácter mesenquimal como células madre indiferenciadas, se procedió a caracterizar los cultivos confluentes de HWJSC para determinar su capacidad para sintetizar importantes componentes de los tejidos humanos adultos, su viabilidad celular, capacidad proliferativa y, en suma, su posible utilidad potencial en ingeniería tisular. A



este respecto, nuestros resultados demuestran que las HWJSC mantenidas en cultivo son capaces de generar una gran cantidad de los principales componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular. La utilización de técnicas de cultivo en confluencia permitió a estas células generar unas estructuras constituidas por células embebidas en su propia matriz extracelular, las cuales se despegaban espontáneamente del frasco de cultivo y podían ser utilizadas para diferentes aplicaciones, tal como se describió previamente para otros tipos celulares (95). Cuando se analizaron histológicamente, estas estructuras generadas por las HWJSC confluentes mostraron áreas ricas en células y áreas pobres en células, las cuales se encontraron distribuidas al azar por toda la estructura. Además, mediante métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos, se demostró que las áreas pobres en células presentaban una gran cantidad de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular. Aunque las zonas ricas en células no estaban desprovistas de estos componentes, su presencia era menor en estas zonas en comparación con las zonas pobres en células. Estos hallazgos revelan que las estructuras producidas por HWJSC son histológicamente heterogéneas y contienen tanto un componente celular como un componente no celular, al igual que ocurre con tejidos humanos nativos.

Cuando se analizó en detalle el componente celular de estas estructuras formadas por las HWJSC cultivadas en confluencia, se demostró que estas células contenían abundantes organelas de síntesis tales como ribosomas, retículo endoplasmático o mitocondrias, lo cual sugiere, que se trata de células viables, metabólicamente activas y biológicamente funcionales, lo cual les permitió sintetizar el abundante componente extracelular encontrado en estas estructuras. La escasez de células en las áreas más ricas en material extracelular sugiere que las HWJSC podrían haber sintetizado y excretado los componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular en un punto concreto de la superficie de cultivo, y que estas células habrían migrado posteriormente hacia la periferia de estas zonas para generar las zonas ricas y zonas pobres en células. El hecho de que la gran mayoría de las células estudiadas presentaba elevada viabilidad celular, como demuestran los estudios realizados con calceína y derivados de etidio



(método Live-Dead) sugiere que la escasez de células en las zonas pobres en células no se debe a un proceso de muerte celular, sino más bien, a su desplazamiento o migración hacia las zonas ricas en células. Asimismo, la expresión positiva de PCNA, marcador de proliferación celular, y la existencia de gran cantidad de organelas de síntesis al microscopio electrónico, apoyan la idea de que las células que constituyen estas estructuras son, en su mayoría, células viables y metabólicamente activas. Otro aspecto relevante del estudio de las HWJSC para su futura utilización en el desarrollo de sustitutos heterotípicos de la mucosa urinaria es su carácter como célula madre mesenquimal indiferenciada y, por tanto, con capacidad de diferenciación hacia urotelio una vez generados los constructos mediante ingeniería tisular. Por ello, en los cultivos confluentes se evaluaron cuatro marcadores típicos de las HWJSC mantenidas en cultivo. Los dos primeros marcadores fueron CD90 y CD105. Su presencia en las células cultivadas en confluencia confirma que el carácter pluripotencial de estas células madre se mantiene en estas estructuras y que la presencia de un abundante material extracelular generado por las células no disminuye su potencial diferenciativo en lo que a estos marcadores se refiere. Es bien sabido que las células madre mesenquimales indiferenciadas que pierden dicho carácter en cultivo y pasan a diferenciarse a algún tipo celular concreto disminuyen significativamente la expresión de marcadores de indiferenciación previamente expresados (96). Los dos últimos marcadores analizados fueron pancitoqueratina y citoqueratina CK8, cuya presencia fue recientemente demostrada en HWJSC tanto en cultivo como *in situ* en el cordón umbilical (97). El hecho de que la mayoría de las células se mostraron positivas para ambos marcadores apoya de nuevo la idea de que las células mantienen su fenotipo como células madre mesenquimales en condiciones de cultivo confluyente.

Por otro lado, el análisis del componente no celular de estas estructuras formadas por las HWJSC mantenidas en confluencia sugiere que la matriz extracelular de estas estructuras podría ser análoga a la existente en algunos tejidos humanos nativos. En concreto, nuestros resultados demuestran que la matriz extracelular generada por las HWJSC es rica en colágeno y



proteoglicanos, los cuales constituyen, respectivamente, los principales componentes fibrilares y no fibrilares de la piel humana, la mucosa oral, la córnea, el intestino y otras estructuras nativas humanas (98). El hecho de que las zonas pobres en células presentaban mayor concentración de colágeno y proteoglicanos está en línea con la idea anteriormente sugerida de que estas estructuras presentan zonas de abundante matriz extracelular en las que las células que allí existían originariamente migraron hacia otras zonas, y zonas ricas en células con menor cantidad de material extracelular. Aunque aún no se han llevado a cabo estudios funcionales de las estructuras generadas por las HWJSC, su carácter biomimético nos hace prever que éstas podrían cumplir algunas de las propiedades fisiológicas de la matriz extracelular nativa y, por tanto, podrían ser utilizadas eventualmente para el tratamiento o la sustitución de tejidos nativos.

Tras caracterizar las HWJSC mantenidas en cultivo, y tras comprobar su capacidad biosintética, adecuada viabilidad celular y potencialidad diferenciadora, se procedió a elaborar sustitutos de la mucosa urinaria utilizando HWJSC como fuente celular alternativa. A este respecto, nuestros resultados apoyan la idea de que estas células son capaces de diferenciarse, al menos parcialmente, hacia células de estirpe urotelial, aunque las condiciones exactas de cultivo parecen ejercer gran influencia sobre esta capacidad diferenciadora. Por un lado, los resultados demuestran la capacidad de las HWJSC para crecer, proliferar y, en parte, diferenciarse sobre la superficie de un estroma artificial de fibrina-agarosa con fibroblastos estromales de la mucosa urinaria humana inmersos en su interior. Previos estudios demostraron que, a pesar de su carácter mesenquimal y su localización en el interior de la gelatina de Wharton del cordón umbilical en su estado nativo, las HWJSC son también capaces de desarrollarse en la superficie de un constructo tisular de este tipo, mostrando signos de diferenciación ectodérmica (59,91,97). Para inducir la diferenciación epitelial de estas células mesenquimales, en el presente estudio se utilizaron dos aproximaciones metodológicas: la inducción mediante factores paracrinos sintetizados y secretados por los fibroblastos de la mucosa urinaria inmersos



en el biomaterial y el cultivo en medios específicos con distintos factores inductores.

En primer lugar, todas las muestras de mucosa urinaria artificial generadas en esta Tesis Doctoral fueron fabricadas con un sustituto estromal que contenía fibroblastos vesicales o ureterales inmersos en el biomaterial de fibrina-agarosa. De este modo, el epitelio o el sustituto epitelial generado mediante el cultivo de células epiteliales uroteliales o de la población celular alternativa de HWJSC en la superficie del biomaterial estuvieron sometidos a la acción inductora del estroma subyacente. Diversos trabajos previos demostraron el importante papel inductor que juegan las células estromales sobre el epitelio en modelos de interacción epitelio-mesénquima (99), así como en diferentes modelos de órganos y tejidos generados mediante ingeniería tisular (59,68). De hecho, El-Ghalbzouri y colaboradores demostraron en 2002 que los tejidos artificiales constituidos por células epiteliales ortotípicas cultivadas sobre un hidrogel carente de células presentaban muy escasos niveles de diferenciación, encontrándose un epitelio muy poco desarrollado con escasos signos de maduración. En cambio, los sustitutos que contenían fibroblastos en el biomaterial se desarrollaban adecuadamente por efecto de la interacción entre las células del estroma artificial y las del epitelio en desarrollo (100). Todo ello confirmaba la necesidad de utilizar células en el sustituto estromal y de que estas células presenten carácter ortotípico con el tejido a desarrollar. Por ese motivo, en la presente Tesis Doctoral se han utilizado fibroblastos aislados a partir de biopsias obtenidas de la mucosa urinaria nativa humana, ya fuera vesical o ureteral, los cuales se han demostrado capaces de participar en el proceso de inducción del epitelio suprayacente en todas las muestras estudiadas.

En segundo lugar, se utilizaron diferentes medios inductores con el objeto de determinar el papel del medio de cultivo sobre el proceso de diferenciación celular hacia epitelio de la vía urinaria. En este sentido, el efecto de los medios de cultivo enriquecidos en factores inductores ha sido demostrado durante largo tiempo, habiéndose demostrado, por ejemplo, el eficiente papel



inductor de agentes como la dexametasona, el  $\beta$ -glicerol fosfato y el ácido ascórbico como agentes osteoinductores, el piruvato, la prolina, el TGF- $\beta$ , el ácido ascórbico y el ITS (insulina, transferrina y selenio) como agentes condroinductores o la dexametasona y el 3-isobutil-1-metilxantina y el ITS como agentes inductores de la línea celular adipogénica (101). En el caso que nos ocupa, desafortunadamente no existe aún un medio de cultivo capaz de inducir específicamente la diferenciación urotelial de las células madre mesenquimales mantenidas en cultivo. Por ese motivo, se evaluaron tres posibles medios inductores: el medio de cultivo utilizado de forma rutinaria para el mantenimiento de las células HWJSC (medio Amniomax), el medio de cultivo enriquecido en factores de crecimiento y diferenciación epitelial utilizado comúnmente para el desarrollo de sustitutos ortotípicos de la piel y la córnea humana (medio QC) y un medio similar al QC que fue previamente condicionado mediante cocultivo con células uroteliales humanas mantenidas en cultivo (medio MC).

En este caso, nuestros resultados revelaron que, en general, las HWJSC constituyen una población potencialmente útil capaz de adherirse y proliferar en la superficie de los sustitutos estromales de fibrina-agarosa con fibroblastos de mucosa urinaria en su interior. Sin embargo, los niveles de diferenciación de estas células fueron muy limitados en los constructos de mucosa urinaria mantenidos en cultivo ex vivo, no existiendo en ninguno de los grupos de estudio signos de diferenciación celular terminal comparables a los de la mucosa vesical o ureteral nativa. En lo que se refiere al medio de cultivo utilizado para la inducción epitelial de las HWJSC, nuestros estudios revelan la existencia de importantes diferencias entre los distintos protocolos evaluados en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, parece evidente que los sustitutos epiteliales cultivados en medio inductor QC presentaban un mayor número de capas celulares que el grupo control y que el grupo en el que se utilizó medio condicionado MC, mostrando ciertos niveles de organización diferencial de las capas más superficiales respecto a las capas medias e inferiores. Aunque su estructura histológica no lograba reproducir la del urotelio humano, podemos concluir que el medio QC es capaz de inducir hasta cierto modo la diferenciación parcial de las HWJSC en la superficie del



biomaterial de fibrina-agarosa con fibroblastos de mucosa urinaria, no existiendo apenas diferencias a los 7 y los 14 días de desarrollo. Por el contrario, los sustitutos epiteliales cultivados en medio Amniomax o en MC mostraron muy pocas capas de células en el epitelio, las cuales carecían de los incipientes signos de diferenciación encontrados en los sustitutos mantenidos en QC.

Asimismo, los estudios histoquímicos, inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes realizados sobre el epitelio en desarrollo sugieren que el medio QC es capaz de inducir ciertos niveles de diferenciación epitelial en las HWJSC mantenidas sobre la superficie de los diferentes sustitutos estromales con más eficacia que el medio Amniomax y el medio MC. Aunque la diferenciación urotelial resultó muy incipiente incluso en los sustitutos mantenidos con QC, nuestros estudios sugieren que los constructos que podrían mostrar mayor similitud con la mucosa urinaria humana control podrían ser los mantenidos en QC durante 14 días, siendo éstos los que presentaron niveles más altos de expresión de citoqueratina 7 y 13, desmoplaquina y ZO1. Sin embargo, la expresión de pancitoqueratina, citoqueratina 8 y uroplaquina 2 resultaron más bajas que en otros tipos tisulares. A este respecto, es importante tener en cuenta que las citoqueratinas 7, 8 y 13 están íntimamente relacionadas con la fisiología de las células uroteliales y su presencia parece necesaria para el funcionamiento de estas células (18).

Aunque en bajos niveles comparados con los controles, los sustitutos de mucosa urinaria humana mantenidos en QC mostraron los niveles más elevados de expresión de algunas de estas citoqueratinas, lo cual sugiere que el medio inductor QC podría inducir cierto nivel de diferenciación epitelial en las HWJSC. Junto a ello, es muy importante tener en cuenta que todos los epitelios humanos presentan un gran número de uniones intercelulares que posibilitan la función de barrera de los epitelios de revestimiento. A este respecto, la expresión positiva de desmoplaquina y de ZO1 en los tejidos artificiales cultivados con QC podría indicar que los epitelios artificiales allí presentes estarían en disposición de formar uniones adherentes y uniones



estrechas, aunque sus niveles comparativamente inferiores a los del control aún apuntan hacia una inmadurez funcional de ambas estructuras. Para comprobar este hecho, en el futuro habrá que llevar a cabo estudios de permeabilidad a través de estos epitelios. En cualquier caso, la mayor expresión de estas proteínas en comparación con el epitelio de los sustitutos ortotípicos (que apenas expresaban ZO2) apoya la idea de que es posible utilizar fuentes celulares alternativas para generar un sustituto eficiente de la mucosa urinaria humana.

Otro aspecto importante de los epitelios de la vía urinaria es la presencia y funcionalidad de las uroplaquinas, relacionadas con la formación de las mencionadas barreras. En nuestro caso, es interesante comprobar que la mayor expresión de uroplaquina 2 corresponde a los constructos mantenidos en medio basal Amniomax, carente de factores inductores específicos para la estirpe epitelial, y que ninguno de los tejidos artificiales mostró expresión de uroplaquina 3. Aunque el hecho de que el medio basal induzca la expresión de uroplaquina 2 en mayor medida que los medios inductores es difícil de explicar, es importante recordar que estos constructos estaban sometidos a la acción inductora de los fibroblastos de mucosa urinaria existentes en el sustituto estromal, los cuales podrían contribuir a la inducción epitelial en los tres grupos de estudio.

El hecho de que el medio QC sea capaz de inducir ciertos niveles de diferenciación en el sustituto epitelial generado con HWJSC podría explicarse por la presencia en este medio de diversos factores de crecimiento, hormonas y factores inductores tales como el factor de crecimiento epitelial o EGF (102). De hecho, este medio de cultivo ha demostrado su capacidad para mantener los niveles de diferenciación de células epiteliales nativas de la córnea (69,71), la mucosa oral (70,103,104,105) y la piel (72,102) mantenidas en cultivo y para inducir parcialmente la diferenciación epitelial de células madre mesenquimales hacia las estirpes corneal (68) y queratinocítica (59,90). Estos antecedentes explicarían el hecho de que este medio de cultivo sea capaz de inducir la diferenciación epitelial de las HWJSC utilizadas en esta Tesis Doctoral.



Por otro lado, nuestros resultados revelan la escasa capacidad del medio MC para inducir la diferenciación epitelial. De hecho, los sustitutos de mucosa urinaria cultivados con este medio no presentaron expresión de citoqueratinas 7 y 13, ZO1 y uroplaquinas 2 y 3, existiendo pocas diferencias entre las muestras cultivadas durante 7 y 14 días. La utilización de este tipo de medios condicionados mediante cocultivo con diferentes tipos celulares ha sido propuesta recientemente como método eficaz para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales (53,106). El condicionamiento de un medio de cultivo sometido a la acción de células cultivadas en éste podría tener varios efectos sobre dicho medio. Por un lado, las células podrían sintetizar y liberar al medio agentes solubles similares a los que se relacionan con la interacción epitelio-mesénquima que, a su vez, podrían influir sobre el proceso diferenciativo de las células cultivadas posteriormente en este medio. Por otro lado, recientes trabajos descubrieron que las células mantenidas en cultivo son capaces de liberar diferentes tipos de microvesículas y nanovesículas en forma de exosomas, los cuales contienen gran cantidad de factores celulares bioactivos (factores de crecimiento, micro-ARNs, etc.) e incluso organelas celulares con función bioinductora (107). En el caso que nos ocupa, sin embargo, parece que el medio MC no sería capaz de mejorar las propiedades del medio QC, presentando incluso peores resultados probablemente derivados del hecho de que el MC contiene, además de factores inductores y de diferenciación, productos tóxicos y de desecho procedentes de las células uroteliales en las que se generó este medio. Futuros trabajos deberán determinar la acción inductora de estos medios generados tras diferentes tiempos en cultivo sobre células uroteliales.

Curiosamente, los niveles de diferenciación epitelial encontrados en cada sustituto de mucosa urinaria se correlacionaron con los niveles de diferenciación del sustituto estromal. Así, los constructos mantenidos en medio QC durante 14 días mostraron niveles relativamente elevados de fibras (sobre todo, reticulares), proteoglicanos y glicoproteínas, aunque, de nuevo, no se alcanzaron los niveles encontrados en los controles nativos.



Probablemente, la mayor eficacia del proceso inductivo encontrada en estas muestras y, por tanto, los mayores niveles de diferenciación epitelial del sustituto epitelial de las muestras mantenidas con QC durante 14 días podrían relacionarse con un proceso inductivo de la diferenciación estromal iniciado por parte del epitelio en desarrollo, el cual liberaría factores paracrinos solubles capaces de inducir la función estromal de los fibroblastos inmersos en el biomaterial de fibrina-agarosa subyacente. De este modo, el proceso de inducción epitelio-mesénquima (108) iniciado por las células estromales tendría un camino de ida y vuelta en el que el epitelio, a su vez, sería capaz de inducir al estroma.

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de diferenciación de los sustitutos de mucosa urinaria humana son muy limitados en todos los casos, incluidos los grupos tratados con QC. A este respecto, estudios previos demostraron que los tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular tienden a presentar escasos niveles de maduración y diferenciación mientras éstos se mantienen en cultivo (70,71,72,103,104,105). Sin embargo, trabajos en los que estos tejidos artificiales son posteriormente implantados in vivo en modelos animales demuestran que los sustitutos tisulares son capaces de madurar y diferenciarse hasta niveles terminales una vez sometidos a los factores inductores existentes in vivo y que aún son muy desconocidos (59,90). El futuro desarrollo de experimentos in vivo en los que los diferentes sustitutos de mucosa urinaria humana sean implantados in vivo nos permitirá determinar si estos sustitutos son capaces de diferenciarse terminalmente para alcanzar niveles equiparables a los del uréter y la vejiga humana.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos generado sustitutos artificiales de la mucosa urinaria humana mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina-agarosa y fuentes celulares alternativas. La utilidad potencial de estos tejidos artificiales es evidente. Aunque aún habrá que llevar a cabo exhaustivos estudios que avalen la bioseguridad y funcionalidad de estos tejidos artificiales, la posibilidad de generar tejidos que puedan reemplazar la mucosa urinaria humana abre la puerta al tratamiento de numerosas lesiones que afectan a la vía urinaria, incluyendo malformaciones



congénitas, tumores, traumatismos y otras patologías que requieran la sustitución de la pelvis renal, el uréter, la vejiga o la uretra humana.



# CONCLUSIONES



De acuerdo con los objetivos planteados en la presente tesis doctoral concluimos que:

1. La metodología desarrollada en la presente tesis doctoral permite caracterizar y estandarizar las condiciones de cultivo de las células uroteliales, estromales y de la gelatina de Wharton para la posterior elaboración de constructos ortotípicos y heterotípicos de mucosa urinaria humana.
2. La evaluación in vitro de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton como fuente celular alternativa del epitelio de la mucosa urinaria, mediante marcadores de diferenciación inmunohistoquímica y ensayos de viabilidad pone en relieve que dichas células sintetizan componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular, análogos a los existentes en la matriz de la mucosa urinaria y que dichas células expresan marcadores de indiferenciación mesenquimal (CD90 y CD105), marcadores típicos de urotelio humano (CK8) y un alto nivel de proliferación y viabilidad celular.
3. Los métodos de biofabricación desarrollados en la presente Tesis Doctoral utilizando células de la mucosa urinaria humana y células de la gelatina de Wharton, biomateriales de fibrina y agarosa, procesos de nanoestructuración y modelos inductores de diferenciación urotelial, permiten la generación de sustitutos de mucosa urinaria ortotípicos y heterotípicos susceptibles de configurar patrones anatómicos compatibles con los existentes en el aparato urinario.
4. La evaluación de los modelos de mucosa urinaria ortotípicos y heterotípicos generados en la presente Tesis Doctoral muestran diferencias significativas en relación con los tejidos nativos, observándose una mayor diferenciación del sustituto epitelial en el modelo heterotípico. Los niveles más elevados de diferenciación tanto epitelial como estromal se alcanzaron cuando en el modelo



heterotípico el proceso de biofabricación utiliza medio específico epitelial (QC). Estos resultados ponen en relieve la posibilidad de generar mucosa urinaria artificial compatible con mucosa urinaria nativa con independencia de los resultados in vivo a desarrollar en el correspondiente estudio preclínico.



# REFERENCIAS



1. Aparato genitourinario. En Moore K.L. y Persuad T.V.N. (2008). Embriología Clínica de Moore. España: Elsevier.
2. Sistema Urinario. En Latarjet M. y Liard A.R. (2004). Anatomía humana. Madrid, España:Panamericana.
3. Sistema urinario. En Ross M.H y Pawlina W. (2013). Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Buenos aires, Argentina: Médica Panamericana.
4. Aparato genitourinario. En Moore K.L. y Persuad T.V.N. (2008). Embriología Clínica de Moore. España: Elsevier.
5. Sistema Urinario. Ulrich Welsch (2014). Sobotta histología. Madrid, España:Panamericana.
6. Sistema urinario. En Gartner L.P. y Hiatt J.L. (2002). Texto atlas de histología segunda edición. Mexico:McGraw-Hill.
7. Aparato urinario. En Junqueira L.C. y Carneiro J. (2000). Histología Básica texto y atlas. Quinta edición. Barcelona, España: Masson.
8. Yoshimura N. Y Chancellor M.B. Fisiología y farmacología de la vejiga y de la uretra.
9. Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier. Traffic. 2004 Mar;5(3):117-28.
10. Lewis SA; Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask; Am J Physiol Renal Physiol. 2000; Jun 278(6): F867-74.
11. Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, Zeidel M, Stoffer D, Apodaca G; Stretch regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells; Mol Biol Cell 2002; 13:830–846.
12. Matuszewski MA, Tupikowski K, Dołowy Ł, Szymańska B, Dembowski J, Zdrojowy R; Uroplakins and their potential applications in urology; Cent European J Urol. 2016; 69: 252-257.
13. Lis J, Kałnik-Prastowska I, Tupikowski K, Matejuk A; Uroplakins as markers of diseases of the urinary system. Postepy Hig Med Dosw. 2015;69:98–113.
14. Tupikowski K, Dołowy Ł, Szymańska B, Dembowski J, Zdrojowy R; Uroplakins and their potential applications in urology; Cent European J Urol. 2016; 69: 252-257.
15. Kong XT, Deng FM, Hu P, et al. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. J Cell Biol. 2004;167:1195–1204.



16. Hu P, Deng FM, Liang FX, et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *J Cell Biol.* 2000;151:961–972.
17. Jiang J, Ulbright TM, Younger C, Sanchez K, Bostwick DG, Koch MO, Eble JN, Cheng L; Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis; *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jul;125(7):921-3.
18. Southgate, P. Harnden and L.K. Trejdosiewicz; Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications; *Histol Histopathol* (1999) 14: 657-664J.
19. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R; The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells; *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24.
20. Moll R, Schiller DL, Franke WW; Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns; *J Cell Biol.* 1990 Aug;111(2):567-80.
21. Achtstätter T, Moll R, Moore B, Franke WW; Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies; *J Histochem Cytochem.* 1985 May;33(5):415-26.
22. Moll R, Achtstätter T, Becht E, Balcarova-Ständer J, Ittensohn M, Franke WW; Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines. *Am J Pathol.* 1988 Jul;132(1):123-44.
23. Macarak EJ, Ewalt D, Baskin L, Coplen D, Koo H, Levin R, Duckett JW, Snyder H, Rosenbloom J, Howard PS; The collagens and their urologic implications; *Adv Exp Med Biol.* 1995;385:173-7; discussion 179-84.
24. Yoshimura N. Y Chancellor M.B. Fisiología y farmacología de la vejiga y de la uretra. En Campbell-Walsh. (2008). Urología novena edición. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
25. Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sung TT; Uroplakins in urothelial biology, function, and disease; *Kidney Int.* 2009 Jun;75(11):1153-65.
26. Genitourinary Tract. Reuter V.C (2007). En Mills-Stacey E. (2007). *Histology for pathologists* Third edition. Philadelphia, United States: Lippincott Williams & Wilkins.
27. Reisner DC, Elgethun MT, Heller MT, Klepchick PR, Hartman MS.; Congenital and Acquired Disorders of Ureteral Course; *Curr Probl Diagn Radiol.* 2016 Apr 14. pii: S0363-0188(16)30016-0.



28. Berrocal T, Alonso A., Bravo A, Gutiérrez J, Pablo L; Estudio radiológico de las duplicaciones del tracto urinario; Radiologia 2005;47:55-71.
29. Tripathi S, Ahmad A, Mathew V.V; Spontaneous partial rupture of the upper renal tract; Brunei Int Med J. 2011; 7 (4): 215-219.
30. Mcaninch J.W., Santucci R.A., Traumatismos renales y ureterales. En Campbell-Walsh. (2008). Urología novena edición. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
31. Douglas M.D., Mcdougal W.S., Uso de segmentos intestinales en la derivación urinaria. En Campbell-Walsh. (2008). Urología novena edición. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
32. Yoo JJ, Olson J, Atala A, Kim B; Regenerative Medicine Strategies for Treating Neurogenic Bladder; Int Neurourol J. 2011 Sep;15(3):109-19.
33. Orive G, Hernández R.M., Garcón A.R., Igartúa M., José L., Pedráz M; ingeniería tisular: retos y realidades; Vitae, vol. 10, núm. 2, 2003, pp. 46-51; Universidad de Antioquia; Colombia.
34. Garrido F.M.; ; Tissue engineering and regenerative medicine in pediatric surgery; Rev. Chilena de Cirugía. Vol 63 - N° 6, Diciembre 2011; pág. 635-640.
35. Kemp P.; History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards; Regenerative Med. (2006) 1(5), 653–669
36. Meyer U. The history of Tissue Engineering and Regenerative medicine in perspective. En Meyer U., Meyer Th., Handschel J. and Wiesmann H.P. (2009). Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine. Berlin, Germany: Springer
37. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions; Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Nov 24;112(47):14452-9.
38. Jonge PK, Simaioforidis V, Geutjes PJ, Oosterwijk E, Feitz WF; Recent advances in ureteral tissue engineering; Curr Urol Rep. 2015 Jan;16(1):465.
39. Xu Y, Fu W, Li G, Shi J, Tan H, Hu K, Cui F, Lin Q, Zhang X; Autologous urothelial cells transplantation onto a prefabricated capsular stent for tissue engineered ureteral reconstruction. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(4):1119–28.
40. Shi JG, Fu WJ, Wang X, Xu YD, Li G, Hong BF, Wang Y, Du ZY, Zhang X; Tissue engineering of ureteral grafts by seeding urothelial differentiated hADSCs onto biodegradable ureteral scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2012;100(10):2612–22.
41. Fu WJ, Xu YD, Wang ZX, Li G, Shi JG, Cui FZ, Zhang Y, Zhang X; New ureteral scaffold constructed with composite poly(L-lactic acid)-collagen and



urothelial cells by new centrifugal seeding system. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(7):1725–33.

**42.** Salehipour M, Mohammadian R, Jahanbini S, Emadmarvasti V, Geramizadeh B, Tanideh N; Is amniotic membrane a suitable biomaterial for reconstruction of long ureteral defects? *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2013;24(1):135–8.

**43.** Zhao Z, Yu H, Xiao F, Wang X, Yang S, Li S; Differentiation of adipose-derived stem cells promotes regeneration of smooth muscle for ureteral tissue engineering. *J Surg Res*. 2012;178(1):55–62.

**44.** Liao W, Yang S, Song C, Li X, Li Y, Xiong Y; Construction of ureteral grafts by seeding bone marrow mesenchymal stem cells and smooth muscle cells into bladder acellular matrix. *Transplant Proc*. 2013;45(2):730–4.

**45.** Kropp B.P, Cheng E.Y, Lin H.K, and Zhang Y; Reliable and reproducible bladder regeneration using unseeded distal small intestinal submucosa; *Journal of Urology*, vol. 172, no. 4, pp.1710–1713, 2004.

**46.** Wefer J, Sievert K, Schlote N; Time dependent smooth muscle regeneration and maturation in a bladder acellular matrix graft: histological studies and in vivo functional evaluation; *Journal of Urology*, vol. 165, no. 5, part 1, pp. 1755–1759, 2001.

**47.** Adamowicz J, Juszczak K, Bajek A; Morphological and urodynamic evaluation of urinary bladder wall regeneration: muscles guarantee contraction but not proper function a rat model research study; *Transplantation Proceedings*, vol. 44, no. 5, pp. 1429–1434, 2012.

**48.** Orabi H, Bouhout S, Morissette A, Rousseau A, Chabaud S, Bolduc S; Tissue engineering of urinary bladder and urethra: advances from bench to patients; *ScientificWorldJournal*. 2013 Dec 24;2013:154564.

**49.** Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 1998; 51:221-5.

**50.** Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha GR. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol* 1996;156(2 Pt 2):571.

**51.** Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006; 367: 1241-6.

**52.** Shuai W, Zhongliang C, Guohua L, Xinfeng Z, Liang Z, Yingjian Z, Jiang Z; Urothelial differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in vitro; *Analytical Cellular Pathology* 36 (2013) 63–69.



53. Kang HH, Kang JJ, Kang HG, Chung SS; Urothelial differentiation of human amniotic fluid stem cells by urothelium specific conditioned médium; Cell Biol Int 9999 (2014) 1–7 2013.
54. Tia H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma P, Atala A, Zhang Y; Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Bladder Cells: Potential for Urological; Tissue Engineering Volume 16, Number 5, 2010.
55. Kim D.W., Staples M., Shinozuka K., Pantcheva P., Kang S.D., Borlongan C.V.; Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells:Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications; Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 11692-11712.
56. Sobolewski K, Bańkowski E, Chyczewski L, Jaworski S.; Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly; Biol Neonate.; 1997;71(1):11-21.
57. Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Buján J, Campos A, Alaminos M; Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy; Tissue Eng Part C Methods. 2012 Jun;18(6):408-19.
58. Prasanna S.J and Jahnvi V.S.;Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells as Off-The-Shelf Cellular Therapeutics: A Closer Look into their Regenerative and Immunomodulatory Properties; The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal; 2011, 4, 28-38.
59. Garzón I, Miyake J, González-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sánchez-Quevedo Mdel C, Campos A, Alaminos M; Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. Stem Cells Transl Med. 2013 Aug;2(8):625-32
60. Zhang L, Zhang HT, Hong SQ, Ma X, Jiang XD, Xu RX.; Cografted Wharton's jelly cells-derived neurospheres and BDNF promote functional recovery after rat spinal cord transection; Neurochem Res 2009; 34(11): 2030-9.
61. Aggarwal S, Pittenger MF; Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses; Blood 2005; 4: 1815-1.
62. Mitchell K.E, Weiss M.L, Mitchell B.M, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S; Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia; Stem Cells. 2003;21(1):50-60.
63. Kreisberg JI, Wilson PD; Renal cell culture; J Electron Microsc Tech. 1988 Jul;9(3):235-63.
64. Nakamura A, Kumazawa T, Lim DJ, Demaria TF, van Blitterswijk CA; Culture of middle ear epithelium: a review; Acta Otolaryngol Suppl. 1993;500:75-9.



65. Merchant DJ; Primary explant culture of human prostate tissue: a model for the study of prostate physiology and pathology; *Prostate*. 1990;16(2):103-26.
66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E; Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
67. Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira AC, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Hernández-Cortés P, Campos A, Alaminos M; Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease; *PLoS One*. 2014 Nov 7;9(11):e112457.
68. Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez C, González-Andrades M, Carriel V, Martínez-Gómez C, Campos A, Alaminos M; Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells; *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jun 6;55(7):4073-83
69. Gonzalez-Andrades M, Garzon I, Gascon MI et al. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2009; 3: 442–9.
70. )Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Moreu G et al. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J. Periodontal Res*. 2009; 44: 588–97.
71. )Alaminos M, Del Carmen S-QM, Munoz-Avila JI et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2006; 47: 3311–7.
72. Carriel V, Garzon I, Jimenez JM; Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials; *Cells Tissues Organs* 2012; 196: 1–12.
73. Jaimes-Parra BD, Valle-Díaz de la Guardia F, Arrabal-Polo MÁ, Herrera-Imbroda B, Lara MF, Machuca-Santa-Cruz FJ, Campos A, Alaminos M, Crespo PV, Garzón I; Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *Int J Urol*. 2016 Jan;23(1):85-92.
74. Osborn SL, Thangappan R, Luria A, Lee JH, Nolta J, Kurzrock EA; Induction of human embryonic and induced pluripotent stem cells into urothelium; *Stem Cells Transl Med*. 2014 May;3(5):610-9.



- 75.** Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Durán JD, Alaminos M, Campos A, López-López MT; Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model; *J Biomed Mater Res A*. 2014 Aug;102(8):2573-82.
- 76.** Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, Garzón I, Alaminos M; In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute; *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Jul 14.
- 77.** Ionescu AM, Alaminos M, de la Cruz Cardona J, de Dios García-López Durán J, González-Andrades M, Ghinea R, Campos A, Hita E, del Mar Pérez M; Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties; *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011 Nov;4(8):1963-73.
- 78.** Campos F, Bonhome-Espinosa AB, García-Martínez L, Durán JD, López-López MT, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Carriel V; Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications; *Biomed Mater*. 2016 Sep 29;11(5):055004.
- 79.** Elizabeth R. Fischer, Bryan T. Hansen, Vinod Nair, Forrest H. Hoyt, and David W. Dorward; Scanning Electron Microscopy; *Curr Protoc Microbiol*. 2012 May; CHAPTER: Unit2B.2.
- 80.** Christine G. Golding, Lindsey L. Lamboo, Daniel R. Beniác, Timothy F. Booth; The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease; *Sci Rep*. 2016; 6: 26516.
- 81.** Chiara E. Ghezzi, Jelena Rnjak-Kovacina, David L. Kaplan; Corneal Tissue Engineering: Recent Advances and Future Perspectives; *Tissue Eng Part B Rev*. 2015 Jun 1; 21(3): 278–287.
- 82.** Paquet C, Larouche D, Bisson F, Proulx S, Simard-Bisson C, Gaudreault M, Robitaille H, Carrier P, Martel I, Duranceau L, Auger FA, Fradette J, Guérin SL, Germain L; Tissue engineering of skin and cornea: Development of new models for in vitro studies; *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jun;1197:166-77.
- 83.** Lin YQ, Wang LR, Pan LL, Wang H, Zhu GQ, Liu WY, Wang JT, Braddock M, Zheng MH. Kidney bioengineering in regenerative medicine: An emerging therapy for kidney disease. *Cytotherapy*. 2016 Feb;18(2):186-97.



- 84.** Pooornejad N, Schaumann LB, Buckmiller EM, Roeder BL, Cook AD; Current Cell-Based Strategies for Whole Kidney Regeneration; *Tissue Eng Part B Rev.* 2016 Oct;22(5):358-370.
- 85.** Alberti C; Whyever bladder tissue engineering clinical applications still remain unusual even though many intriguing technological advances have been reached?; *G Chir.* 2016 Jan-Feb;37(1):6-12.
- 86.** Smith N.J, Hinley J, Varley C.L, Eardley L, Trejdosiewicz L.K, Southgate J; The human urothelial tight junction: claudin 3 and the ZO-1 $\alpha^+$  switch; *Bladder (San Franc).* 2015; 2(1): e9.
- 87.** Atala A; Tissue engineering of human bladder; *Br Med Bull.* 2011;97:81-104.
- 88.** Ilona Kalaszczynska Katarzyna Ferdyn; Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance; *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 430847.
- 89.** Aguilera V, Briceño L, Contreras H, Lamperti L, Sepúlveda E, Díaz-Perez F, León M, Veas C, Maura R, Toledo JR, Fernández P, Covarrubias A, Zuñiga FA, Radojkovic C, Escudero C, Aguayo C; Endothelium transdifferentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors;. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11):e111025.
- 90.** Alfonso-Rodríguez CA, González-Andrades E, Jaimes-Parra BD, Fernández-Valadés R, Campos A, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Garzón I; Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes; *Histol Histopathol.* 2015 Nov;30(11):1321-32.
- 91.** Jadalannagari S, Berry AM, Hopkins RA, Bhavsar D, Aljitiawi OS; Potential mechanisms underlying ectodermal differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells; *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 16;478(2):831-7.
- 92.** Garzón I, Martin-Piedra MA, Alaminos M; Human Dental Pulp Stem Cells. A promising epithelial-like cell source; *Med Hypotheses.* 2015 May;84(5):516-7.
- 93.** Yuan H, Zhuang Y, Xiong J, Zhi W, Liu L, Wei Q, Han P; Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model. *PLoS One.* 2013 Nov 20;8(11):e80959.
- 94.** Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D; Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy.* 2006;8:315e7.



95. Chan B.P, Leong K.W; Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations; *Eur Spine J* (2008) 17, 467–479.
96. Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, García-Honduvilla N, Romero B, Campos A, Buján J; Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells;. *J Cell Physiol*. 2010 Jun;223(3):640-7.
97. Garzón I, Alfonso-Rodríguez CA, Martínez-Gómez C, Carriel V, Martin-Piedra MA, Fernández-Valadés R, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M; Expression of epithelial markers by human umbilical cord stem cells. A topographical analysis; *Placenta*. 2014 Dec;35(12):994-1000.
98. Oliveira A.C., Garzón I., Ionescu A.M., Carriel V., Cardona J. de L., González-Andrades M., Pérez M. del M., Alaminos M., Campos A; Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering; *PLoS One* (2013) 8(6): e66538.
99. Liu J, Mao JJ, Chen L; Epithelial-mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration;. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Feb;17(1):25-31.
100. El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M; Effect of fibroblasts on epidermal regeneration; *Br J Dermatol*. 2002 Aug;147(2):230-43.
101. Nieto-Aguilar R, Serrato D, Garzón I, Campos A, Alaminos M; Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold; *J Biomater Appl*. 2011 Mar;25(7):743-68.
102. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F; Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels; *Burns*. 1998 Nov;24(7):621-30.
103. Garzon I, Serrato D, Roda O, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Gonzales-Jaranay M, Moreu G, Nieto-Aguilar R, Alaminos M, Campos A; In vitro cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering; *Int J Artif Organs*. 2009 Oct;32(10):711-9.
104. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Sep-Oct;1(5):350-9.



- 105.** Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A; Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering; *Histol Histopathol.* 2007 Jun;22(6):631-40.
- 106.** Jeanne Adiwinata Pawitan; Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine; *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 965849.
- 107.** Marote A, Teixeira FG, Mendes-Pinheiro B, Salgado AJ; MSCs-Derived Exosomes: Cell-Secreted Nanovesicles with Regenerative Potential; *Front Pharmacol.* 2016 Aug 3;7:231
- 108.** Shyamala K, Yanduri S, Girish HC, Murgod S; Neural crest: The fourth germ layer.; *J Oral Maxillofac Pathol.* 2015 May-Aug;19(2):221-9.