

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE MARCADORES
DE DIFERENCIACIÓN EPITELIAL EN
MUCOSA ORAL CONSTRUIDA
POR INGENIERÍA TISULAR**

TESIS DOCTORAL

Ingrid Johanna Garzón Bello
Departamento de Histología

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ingrid Johanna Garzón Bello
D.L.: GR. 3147-2009
ISBN: 978-84-692-5187-4



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Histología
Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

“ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EPITELIAL EN MUCOSA ORAL CONSTRUIDA POR INGENIERÍA TISULAR”

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 por el Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DE SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL HUMANA GENERADOS EN EL LABORATORIO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR” – PI FIS08/0615 Del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido galardonados con el V Premio Fundación Vital Dent a la Investigación en Odontostomatología (2008) y publicados en los siguientes artículos científicos:

- **In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa.** Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M. J Periodontal Res. 2009 Mar 7. [Epub ahead of print]
- **Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering.** Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A. Histol Histopathol. 2007 Jun;22(6):631-40.
- **Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa.** Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. J Tissue Eng Regen Med. 2007 Sep-Oct;1(5):350-9.

Granada, 15 de Julio de 2009.

**ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN
EPITELIAL EN MUCOSA ORAL CONSTRUIDA POR
INGENIERÍA TISULAR**

Memoria que presenta el Licenciado en Odontología
Ingrid Johanna Garzón Bello
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: Ingrid Johanna Garzón Bello

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Antonio Campos Muñoz
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dr. D^a. María del Carmen Sánchez Quevedo
Doctora en Ciencias Químicas
Universidad de Granada

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2009

A mi madre, Diana Bello.

“Basta soñar, anhelar y perseverar y el universo se encarga de
llevarlo a ti” Mom, 06/04/06.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi querida Familia, por su apoyo incondicional. A mi futuro marido, Gaby por su entusiasmo. Hemos pasado un año bastante agitado, pero sin embargo, lo logramos. Esta tesis es, ante todo, un proyecto familiar.

Como de costumbre, han sido muchas las personas que han prestado su ayuda leyendo esta tesis y comentándola: Gracias a todos mis profesores de departamento.

A mis directores de Tesis, Profesora María del Carmen Sánchez Quevedo, Profesores Antonio Campos Muñoz y Miguel Alaminos les debo mi más sincera y profunda gratitud. Es estupendo trabajar con vosotros y siento que estoy en buenas manos. Con mi maestro Miguel Alaminos, estoy especialmente satisfecha, pues él se ha encargado del trabajo ingrato de hacer limpieza entre mis extensas disgresiones armado con su lápiz rojo.

Miguel González Andrades, Deyanira Serrato, Renato Nieto, Manuel Lobo, Olga Roda ocupan un lugar destacado en esta lista de agradecimientos. Trabajar con vosotros es tan divertido como productivo.

Gracias también a mis compañeros residentes del laboratorio, habéis conseguido que aprenda de vuestros trabajos y vuestras inquietudes.

Finalmente quiero dar las gracias a la persona a quien dedico esta tesis, Mi madre, me animó, leyó mi tesis y, sobre todo, estaba orgullosa de mí. Ella fue quien redactó las bonitas palabras del inicio de esta tesis.

Mamá, eres cálida, encantadora, inteligente, considerada y una de las personas más alegres que conozco.

Gracias por tantos recuerdos entrañables. Te prometo hacer cuanto esté a mi mano por vivir según el principio que rige tu vida y la del abuelo: "La mayor felicidad posible".

TESIS DOCTORAL

Ingrid Johanna Garzón Bello

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. LA INGENIERÍA TISULAR	8
2.1 HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA TISULAR	9
2.1.1. CÉLULAS.....	9
2.1.2. MATRIZ EXTRACELULAR.....	13
2.1.3. FACTORES DE CRECIMIENTO	15
2.2. DESARROLLO Y PERSPECTIVAS DE LA INGENIERÍA TISULAR	17
3. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA MUCOSA ORAL HUMANA	
ORTOTÍPICA	19
3.1. HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL	20
3.1.1. EPITELIO DE LA MUCOSA ORAL.....	20
A.- Población intrínseca o propia del epitelio	21
B.- Población extrínseca.....	25
• Población extrínseca permanente.....	25
• Población extrínseca transitoria	27
3.1.2. MEMBRANA BASAL DE LA MUCOSA ORAL	27
3.1.3. LÁMINA PROPIA O CORION DE LA MUCOSA ORAL	28
3.1.4. SUBMUCOSA	29
3.2. CLASIFICACIÓN HISTOTOPOGRÁFICA DE LA MUCOSA ORAL	30
3.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.....	30
A.- Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado	30
B.- Epitelio plano estratificado paraqueratinizado	31
C.- Epitelio plano estratificado no queratinizado	31
3.2.2. CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA	32
A.- Mucosa de revestimiento	33
B.- Mucosa masticatoria	33
C.- Mucosa especializada	33
3.3. IMPORTANCIA DE LAS CITOQUERATINAS EN LA DIFERENCIACIÓN EPITELIAL DE LA MUCOSA ORAL.....	34

OBJETIVOS	37
• Objetivo general	38
• Objetivos específicos	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Obtención de muestras de origen humano utilizadas en este estudio.....	40
2. Desarrollo de cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos de mucosa oral	41
3. Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de mucosa oral.....	45
4. Congelación de células	47
5. Desarrollo de matrices extracelulares: elaboración de sustitutos del corion de la mucosa oral.....	48
6. Construcción de sustitutos de mucosa oral mediante ingeniería tisular	50
7. Evaluación microscópica de los sustitutos de mucosa oral	52
7.1. Microscopía óptica.....	52
7.2. Microscopía electrónica de barrido	52
7.3. Microscopía electrónica de transmisión	53
8. Evaluación <i>in vivo</i> de la mucosa oral obtenida mediante ingeniería tisular	54
9. Inmunohistoquímica	56
10. Análisis de expresión génica global mediante <i>microarrays</i>	58
RESULTADOS	60
1. Generación de cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos de mucosa oral.....	61
2. Construcción de equivalentes de mucosa oral de espesor completo obtenidos mediante ingeniería tisular	64
3. Evaluación microscópica de las muestras control y de los sustitutos de mucosa oral mantenidos <i>in vitro</i>	66
4. evaluación microscópica de las muestras de sustitutos de mucosa oral <i>in vivo</i>	75
5. Evaluación del perfil de expresión de citoqueratinas en sustitutos de mucosa oral desarrollados por ingeniería tisular.....	77
6. Evaluación de la expresión de citoqueratinas y proteína de proliferación celular (PCNA) en sustitutos de mucosa oral implantados en ratones atímicos	81
7. Análisis de expresión génica de mucosa oral obtenida mediante ingeniería tisular	86
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	104

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La terapia sustitutiva de la mucosa oral basada en la utilización de piel y mucosa intestinal ha demostrado generar numerosos problemas secundarios. En efecto, la utilización de piel y mucosa de zonas ajenas a la cavidad bucal para la reparación de defectos de la mucosa oral en patologías de tipo oncológico, traumático, infeccioso o congénito, (Figuras 1,2,3,4) puede desembocar en la aparición de metaplasias, hiperqueratinización e incluso la aparición de estructuras anexales en el tejido implantado (Figura 5 y 6).

Entre las técnicas más utilizadas para la reparación de los defectos graves de la cavidad oral, se han propuesto diversas soluciones con diferentes grados de complejidad. Las más utilizadas hasta el momento son la cicatrización-granulación por segunda intención (Clark *et al.*, 2000), el uso de injertos o colgajos cutáneos de espesor parcial o total (Petruzzelli *et al.*, 1992; Butler, 2001; Urken *et al.*, 1995), la interposición de materiales biocompatibles (Paolantonio *et al.*, 2002), el trasplante heterólogo e incluso las técnicas de reconstrucción microquirúrgicas (Rosenthal *et al.*, 2004) (Figura 7, 8 y 9). Sin embargo, ninguno de estos procedimientos está libre de la posibilidad de problemas asociados y complicaciones a nivel local y general (Shah y Patel, 2004).

A pesar de estas múltiples opciones terapéuticas, aún se mantiene la necesidad de encontrar sustitutos funcionales, anatómicos y estéticamente similares al tejido a reemplazar, así como soluciones que reduzcan la morbilidad asociada a la obtención de tejido de zonas donantes.

En este contexto, los recientes avances en medicina, odontología y bioingeniería han abierto la puerta a un nuevo tipo de tratamiento que no requiere la utilización de tejidos heterólogos y que se basa en la Ingeniería Tisular.

Antes de establecer los objetivos de esta tesis doctoral, fundamentaremos el mismo, en primer lugar, en el más exacto conocimiento de la mucosa oral humana ortotópica, en el que describiremos la especial importancia de las citoqueratinas del epitelio en relación con la diferenciación topográfica regional de éste. En segundo lugar, describiremos los actuales conceptos de Ingeniería Tisular, con lo que estableceremos el fundamento necesario para la elaboración de la mucosa oral artificial destinada a una posible aplicación terapéutica.

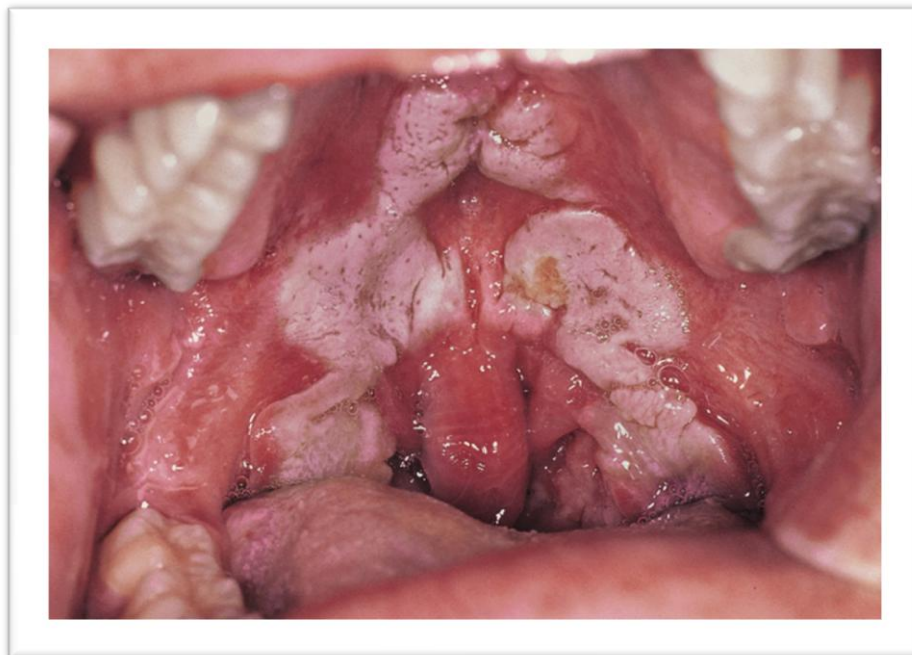


Figura 1. Lesiones y erosiones pseudomembranosa de la lengua, paladar duro y blando correspondientes a sífilis secundaria. *New Engl J Med* 347;21:1677



Figura 2. Diagnóstico de osteonecrosis. *New Engl J Med* 355;22:23

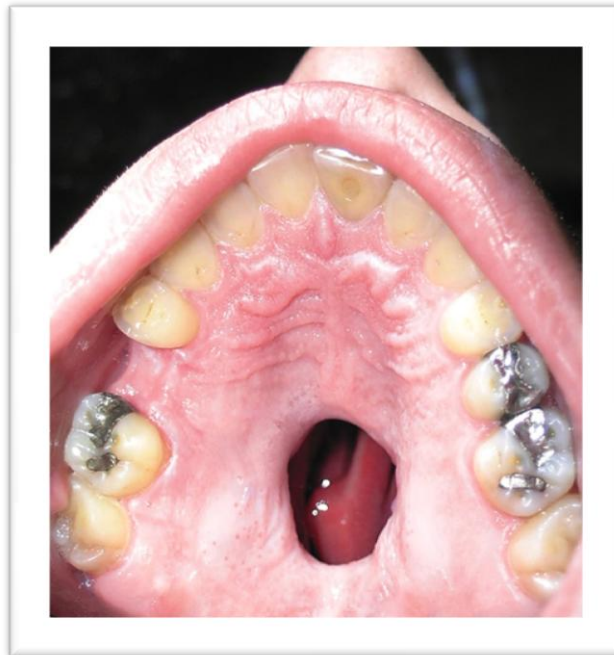


Figura 3. Perforación del septum nasal y paladar con complicaciones intranasales asociadas al uso de cocaína *New Engl J Med* 357;19:1956

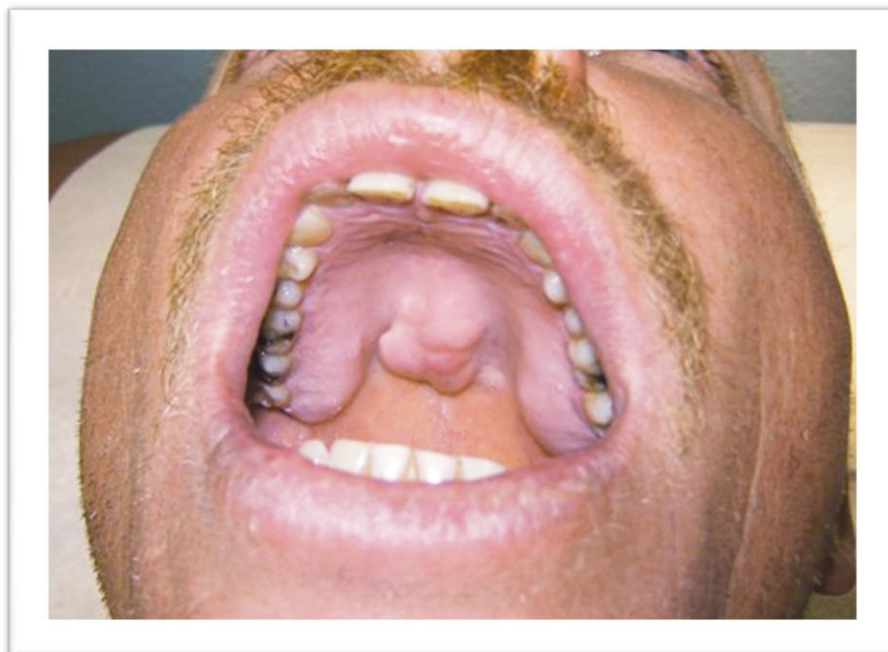
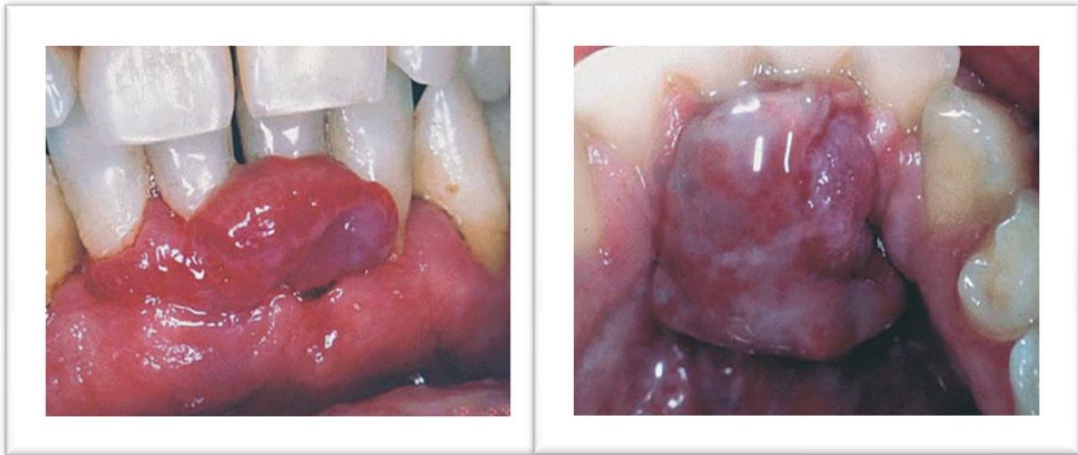


Figura 4. Masa con apariencia de torus palatino. *New Engl J Med* 356;17:1759



Figuras 5 y 6. Lesiones de hiperqueratinización secundarias a tratamientos quirúrgicos reparadores de mucosa oral.



Figura 7. Representación de técnicas reconstructivas, utilización de injertos.

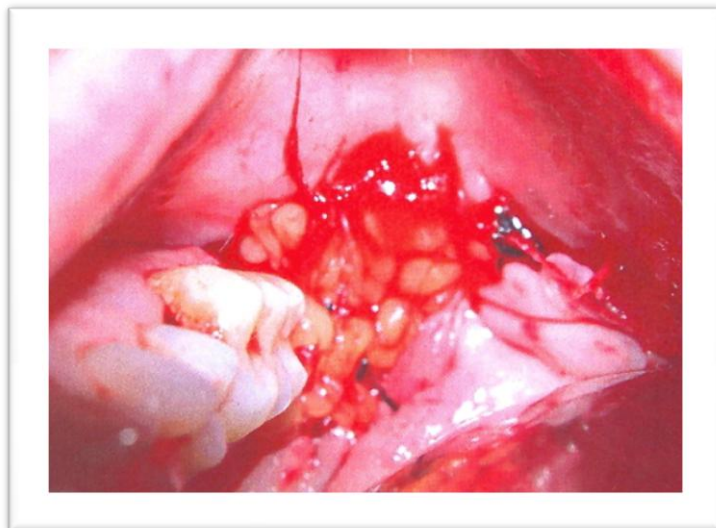


Figura 8. Empleo de colgajo del paquete adiposo bucal o bola de Bichat en transición paladar balando-paladar duro y pared faríngea. Capitán Cañadas, 2006.

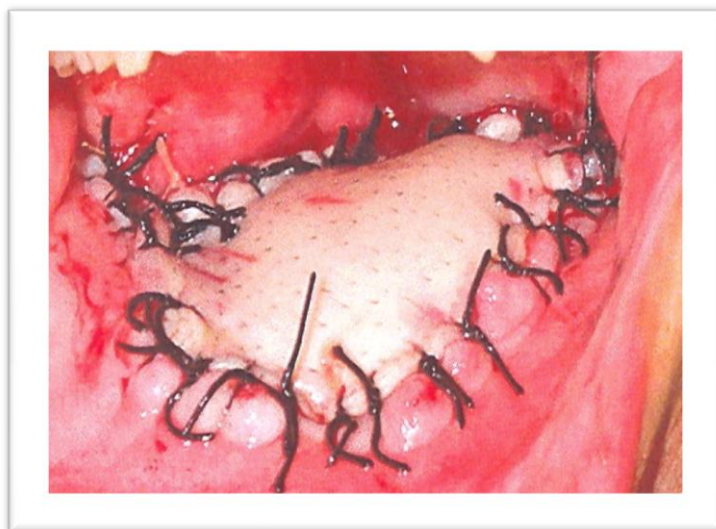


Figura 9. Colgajo radial para reconstrucción de defecto creado tras pelvi glosectomía completa. Capitán Cañadas, 2006.

2. LA INGENIERÍA TISULAR

Aproximadamente hace tres décadas nace la Ingeniería Tisular como una alternativa de acercamiento hacia la reparación de órganos y tejidos. El término ingeniería tisular ha sido definido por *la National Science Foundation* como “La aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de tejidos normales y patológicos para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la actividad de los tejidos u órganos perdidos o dañados”.

La indudable capacidad de la Ingeniería Tisular para regenerar tejidos del propio paciente a partir de células extraídas del mismo convierte a esta disciplina en una de las de mayor potencialidad dentro del campo de la medicina regenerativa.

De esta manera, la Ingeniería Tisular se nos presenta como un campo en rápido crecimiento que posiblemente representa el prototipo de los futuros desarrollos científicos. En primer lugar su multidisciplinariedad y su continua expansión durante la última década, hace de esta disciplina emergente uno de los campos de inversión más importantes en lo que se refiere a investigación básica. De este modo, Estados Unidos ha aumentado sus inversiones en el desarrollo comercial de la Ingeniería Tisular, con una tendencia claramente progresiva en lo que se refiere al desarrollo de la investigación en este campo.

2.1. HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA TISULAR

Para generar nuevos tejidos la Ingeniería Tisular utiliza tres herramientas básicas: células con capacidad de replicación, matrices extracelulares o “*scaffolds*”, y factores de crecimiento. Las células sintetizan proteínas necesarias para el desarrollo de la matriz extracelular mientras que el “*scaffold*” proporciona un ambiente adecuado para la proliferación de las células. Finalmente, la función de los factores de crecimiento es facilitar y promover la regeneración del nuevo tejido.

2.1.1. CÉLULAS

La fuente a partir de la cual se obtienen las células tiene una gran influencia en el éxito del tejido a reparar. De acuerdo con esto, es posible clasificar las células de la siguiente manera:

- Autogénicas o autólogas
- Alogénicas
- Xenogénicas

La utilización de células autólogas es la más apropiada para llevar a cabo protocolos de Ingeniería Tisular. Sin embargo, las células de origen alogénico y Xenogénico retienen su carácter inmunogénico, motivo por el cual requieren una terapia de inmunosupresión cuando un nuevo tejido es desarrollado a partir de estas células.

Actualmente nos enfrentamos a un gran problema en lo que se refiere a la utilización de las células de origen autólogo: la dificultad para obtener grandes cantidades de células, especialmente cuando el paciente presenta edad avanzada o padece una enfermedad severa.

Si la cantidad de células obtenidas no es suficiente, éstas deben ser subcultivadas en el laboratorio hasta obtener múltiples pases y mayor cantidad de células. De esta manera, se invierte mayor tiempo y se adquieren riesgos tales como la contaminación y la senescencia. Por otra parte, las células alogénicas han demostrado ser de gran utilidad en Ingeniería Tisular de la piel, funcionando mejor que otros tratamientos con materiales no biológicos. En el caso de células de origen xenogénico, su utilización como capa alimentadora de queratinocitos ha confirmado su importante rol en la actividad epidermal. Sin embargo, las células de origen xenogénico tienen un alto riesgo de rechazo una vez implantadas, así como la posibilidad de transmitir al paciente una infección viral. Todo ello las hace las menos adecuadas para su utilización clínica (Ikada, 2006).

Las células también pueden ser clasificadas según su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares y según su origen (Montalvo, 2008):

- Totipotenciales: Son aquéllas capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: sistema nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios).
- Pluripotenciales: Son aquéllas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias.

- Multipotenciales: Serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo.
- Unipotenciales: Capacidad para formar un único linaje celular. Por ejemplo: células madre epiteliales de la capa basal de la epidermis.

Según su origen, las células madre clásicamente se han dividido en:

- Embrionarias Existen únicamente durante el periodo embrionario. Se pueden obtener a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998), o bien, de la cresta gonadal (Matsui *et al.*, 1991; Resnick *et al.*, 1992; Shambloott *et al.*, 1998). Las células madre embrionarias de la masa celular interna del blastocisto son pluripotenciales, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo.
- Adultas: Existen en el adulto, el feto y el cordón umbilical. Tienen una capacidad proliferativa y un potencial de diferenciación menores que las células madre embrionarias. Son células multipotenciales o unipotenciales, y se han podido identificar en casi todos los tejidos del organismo (Raff, 2003).

Dentro de las células madre adultas, nos encontramos con las células madre mesenquimales, también llamadas células progenitoras mesenquimales, las cuales se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos y han sido utilizadas recientemente en Ingeniería Tisular con resultados exitosos, como son la médula ósea (Friedenstein *et al.*, 1974), la sangre periférica (Zvaifler *et al.*, 2000), el cordón umbilical (Troyer y Weiss, 2008), el tejido adiposo (Pittenger *et al.*, 1999), en los dientes deciduales (Miura *et al.*, 2003), en el músculo esquelético (Jankowski *et al.*, 2002) (Figura 10).

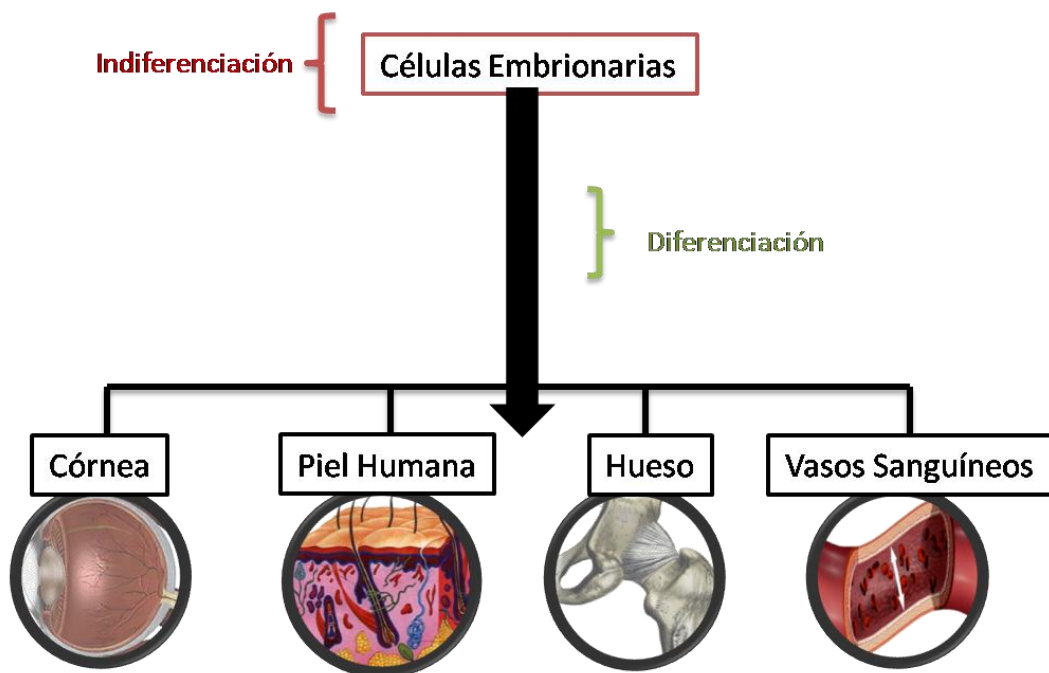


Figura 10. Células, una de las herramientas fundamentales de la Ingeniería Tisular. Vía de diferenciación de las células madre embrionarias a diferentes órganos o tejidos.

2.1.2. MATRICES EXTRACELULARES

La mayoría de los tejidos y órganos requieren de una estructura tridimensional en la cual estén inmersas las células. En el caso de los tejidos artificiales generados en el laboratorio, esta estructura tridimensional o de soporte se denomina matriz extracelular o “*scaffold*”. La función principal de esta matriz extracelular artificial debería ser similar a la de la matriz extracelular natural, promoviendo la proliferación, la diferenciación y la biosíntesis de las células inmersas en ésta.

Normalmente, las matrices extracelulares para la generación de tejidos mediante Ingeniería Tisular están compuestas por diferentes tipos de biomateriales. Los biomateriales utilizados en Ingeniería Tisular deben cumplir ciertos requisitos básicos, entre ellos: ausencia de toxicidad, biocompatibilidad, ausencia de potencial carcinogénico y tolerancia a la esterilización previamente a su uso. Además de esto, deben contar con propiedades mecánicas como la permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad que permitan fabricar diferentes formas, bien sea, láminas, geles, o estructuras tridimensionales sólidas (Yang, *et al.*, 2001). Estos biomateriales, deben permitir la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento (Walgenbach, *et al.*, 2001) (Figura 11).

En este contexto, podemos dividir los biomateriales de uso en Ingeniería Tisular en tres grupos:

- Biogénicos o biológicos
- Sintéticos
- Semisintéticos

Los materiales biogénicos incluyen matrices acelulares como: colágeno, alginato, glicosaminoglicanos y fibrina. Los polímeros sintéticos incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, y varios hidrogeles. Finalmente, los materiales semisintéticos son una combinación de materiales biogénicos y de polímeros sintéticos.

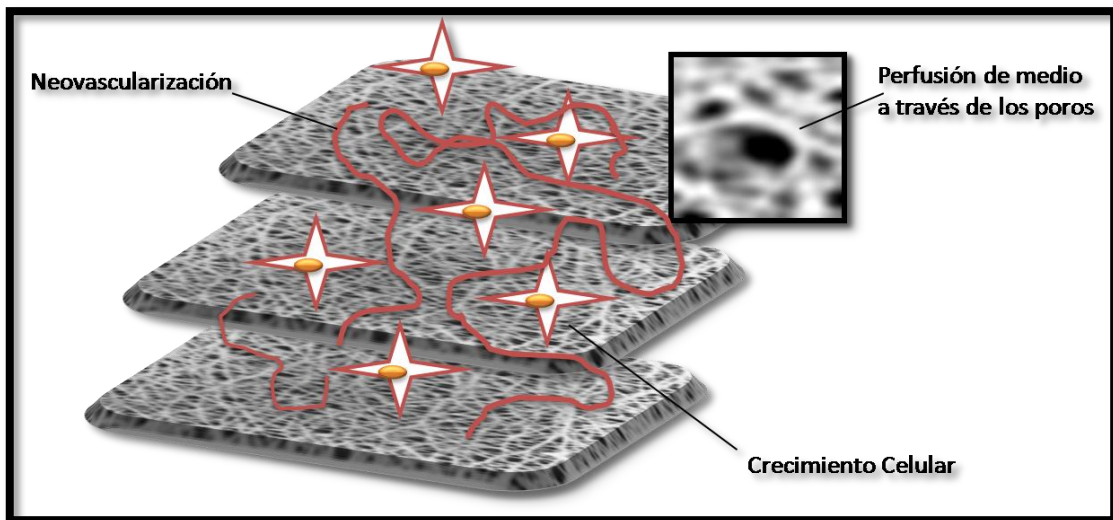


Figura 11. Esquemática de matrices extracelulares artificiales desarrolladas a partir de materiales biocompatibles que permitan la adaptación y proliferación de las células.

2.1.3. FACTORES DE CRECIMIENTO

Múltiples proteínas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células. Estas proteínas son secretadas de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. Estas proteínas, son llamadas factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento que han sido frecuentemente usados en Ingeniería Tisular son, fundamentalmente, la proteína morfogenética osea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF ó FGF-2), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante-b (TGF-b) (Lavik y Langer, 2004; Knight y Evans, 2004) (Figura 12).

Por otra parte, la adición de los factores de crecimiento adecuados a las células y a la matriz extracelular artificial, promueve la regeneración de los tejidos en comparación con aquéllos en los que no existen estos factores de crecimiento (Lavik y Langer, 2004; Knight y Evans, 2004).

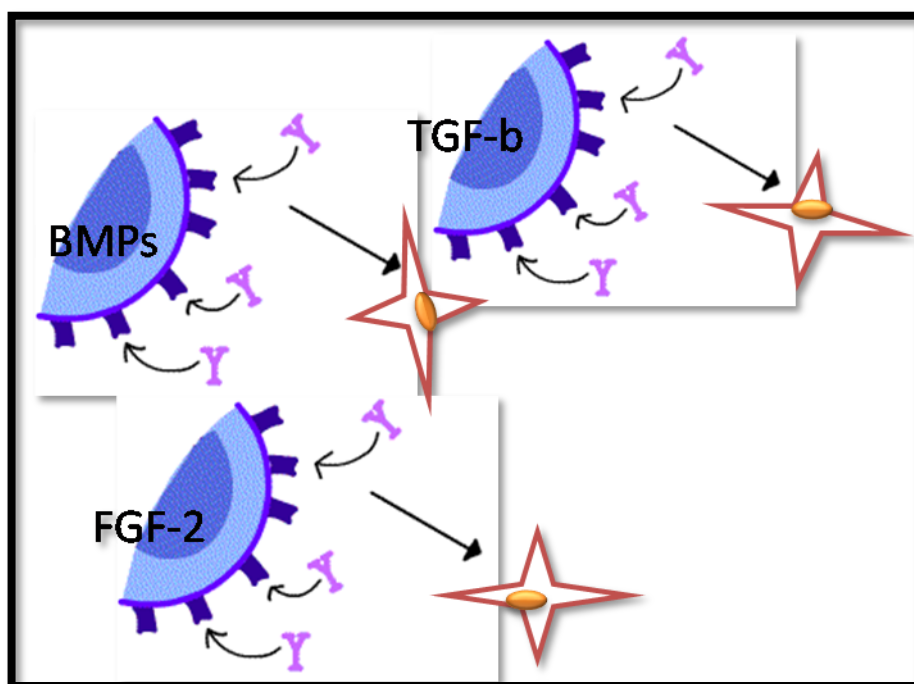


Figura 12. Factores de crecimiento de mayor uso en protocolos de obtención de tejidos artificiales mediante técnicas de Ingeniería Tisular.

2.2. DESARROLLO Y PERSPECTIVAS DE LA INGENIERÍA TISULAR

Uno de los primeros avances de la Ingeniería Tisular se produjo cuando Rheinwald y Green en 1979 lograron cultivar con éxito fibroblastos y queratinocitos humanos en el laboratorio a partir de pequeñas biopsias de piel. Posteriormente, otros investigadores desarrollaron tejido periodontal y hueso alveolar en combinación con el uso de membranas como barrera frente a la invasión de fibroblastos, lo que se ha denominado regeneración tisular guiada. Importantes trabajos desarrollados por Vacanti (Vacanti, 2006) permitieron un estudio más profundo acerca del trasplante de células utilizando polímeros sintéticos reabsorbibles como matrices extracelulares. Al mismo tiempo Wakitami en 1989 (Wakitami *et al.*, 1989) desarrollo una técnica para la reparación de superficies articulares de conejo con condrocitos inmersos en geles de colágeno. Por otro lado, recientemente el continuo desarrollo de técnicas de obtención de materiales hísticos biocompatibles, liderada por los sustitutos dermo-epidérmicos (Bannasch *et al.*, 2003), han supuesto una revolución en la búsqueda de material autólogo capaz de sustituir el tejido primario dañado.

Desde el punto de vista clínico, son cuatro los principales factores que justifican el rápido y necesario desarrollo de la Ingeniería Tisular en Odontología:

1. La posibilidad de obtener en laboratorio una fuente teóricamente inagotable de tejido útil para la reparación de estructuras orales.
2. La necesidad de encontrar sustitutos orgánicos adecuados que permitan disminuir las listas de espera de trasplante de órganos, derivadas de la escasez de donantes.
3. La eliminación del riesgo de rechazo del injerto, así como a la necesidad del empleo de inmunosupresores tras su implante.
4. La eliminación del riesgo de transmisión de enfermedades desde el donante hasta el receptor (por ejemplo: VIH, VHB, VHC).

Como toda ciencia en fase de expansión, existen numerosos problemas aún no solventados, entre los que sobresale la obtención de cultivos celulares viables, la generación de un biomaterial de soporte adecuado que permita su empleo en la clínica y el reto de obtener constructos viables con aporte vascular intrínseco (Langer y Vacanti, 1993; Campos y Cuerpo, 2004). A pesar de esto, y remitiéndonos al punto de partida, los resultados alcanzados en la obtención de mucosa oral artificial mediante técnicas de ingeniería tisular parecen esperanzadores en relación a su aplicación clínica estandarizada (Lauer *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 2003; Izumi *et al.*, 2004; Luitaud *et al.*, 2007).

3. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA MUCOSA ORAL HUMANA ORTOTÍPICA

La cavidad oral está tapizada por una membrana mucosa húmeda que forma la barrera estructural entre el cuerpo y el medio externo denominada mucosa oral. Esta humedad es aportada por la secreción de saliva por las glándulas salivares, la cual es necesaria para evitar la aparición de procesos regresivos.

La mucosa oral está integrada por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes:

1. tejido epitelial, de origen ectodérmico.
2. tejido conectivo, de origen mesenquimatoso (también llamado lámina propia, corion o estroma).

Las dos capas están conectadas por una membrana basal, en una relación ondulada y no lisa. Esto es debido a que el tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio, denominadas papilas coriales, que son invaginaciones, mientras que el epitelio emite proyecciones hacia la lamina propia, en forma de evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales, Esta disposición en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio avascular a partir del tejido conectivo que es de carácter vascular (Figura 13).

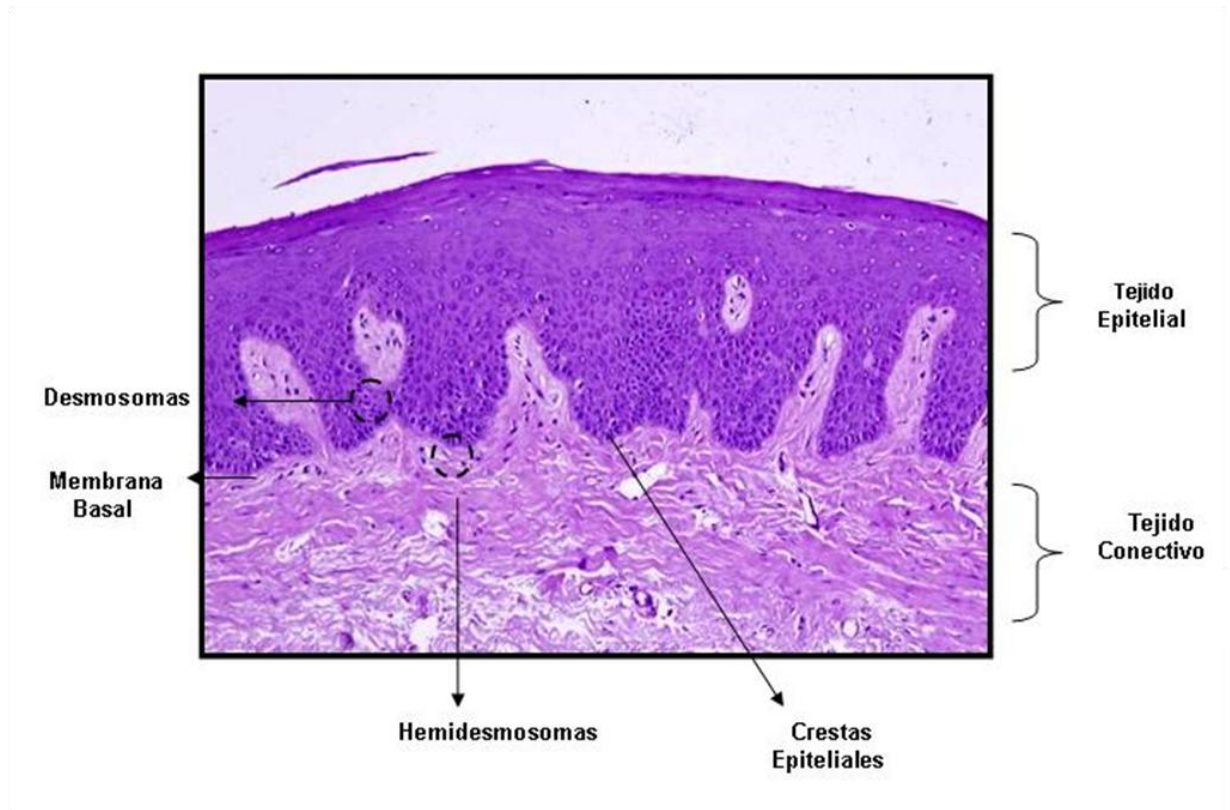


Figura 13. Mucosa Oral Humana (Técnica Hematoxilina-Eosina). Epitelio estratificado.

3.1. HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL

3.1.1. EPITELIO DE LA MUCOSA ORAL

Las células epiteliales están unidas entre sí para formar una barrera funcional de protección entre el medio bucal y el tejido conectivo subyacente.

El epitelio de la mucosa oral está constituido fundamentalmente por dos poblaciones celulares:

A.- Población intrínseca o propia del epitelio. Esta población está formada por los queratinocitos, los cuales constituyen alrededor del 90% de la población celular total del epitelio de la mucosa oral. Los queratinocitos son células del epitelio destinadas a queratinizarse, en mayor o menor grado.

En su evolución migran desde las capas más profundas del epitelio hasta la superficie del mismo. Producida la mitosis, pueden permanecer en la capa basal o dividirse y migrar de nuevo hacia el exterior, siendo así células especializadas hasta convertirse en ocasiones en una escama queratinizada (anucleada) que más tarde se descama y cae al epitelio bucal. La población epitelial queratinocítica que reviste la mucosa oral se renueva constantemente.

Este mecanismo de autorenovación, está controlado por un equilibrio de mitosis de las células de la capa basal y la descamación de células de la capa más superficial, en un ciclo que dura aproximadamente 14 días. Al igual que la piel, el epitelio de la mucosa oral está organizado en *unidades epiteliales proliferativas*.

Los queratinocitos se pueden disponer en el epitelio formando cuatro capas o estratos:

- Basal
- Espinoso
- Granuloso
- Córneo

Capa basal: Se trata de una capa única de células cúbicas con núcleo redondo y basófilo, lo cual indica su intensa actividad sintetizadora de proteínas, en la cual se localizan las células madre del epitelio. Los queratinocitos son junto con los fibroblastos del corion, los encargados de la formación de la lámina basal que une al epitelio y al corion. En esta capa comienza el proceso de renovación epitelial a partir de células madre. Los queratinocitos más inmaduros se encuentran en el estrato basal y espinoso, este tipo de queratinocito, es capaz de producir IL1, TGF, TNF, moléculas de adhesión ICAM-1, las cuales cumplen un papel importante en la migración celular, contribuyendo a la organización espacial de los epitelios en desarrollo y la reparación de heridas.

Estrato espinoso: Esta segunda capa a diferencia de la primera, está formada por varias hileras de queratinocitos, células poligonales de núcleo redondo más o menos pequeño, de cromatina laxa con citoplasma ligeramente basófilo, caracterizado por presentar abundantes tonofibrillas. Observadas bajo el microscopio, las tonofibrillas parecen atravesar los espacios intercelulares, por lo que se les llamó *puentes intercelulares*.

Posteriormente, se demostró que estos puentes intercelulares eran *desmosomas* y que las tonofibrillas eran haces de tonofilamentos constituidos por una subunidad de citoqueratina ácida y una subunidad de citoqueratina básica. Como veremos más adelante, la expresión de estas citoqueratinas en el epitelio, varía dependiendo del tipo de epitelio que se analice.

Estrato granuloso: En esta capa se encuentran 2 ó 3 capas de células aplanadas o escamosas, con un pequeño núcleo de cromatina densa. Los tonofilamentos son muy abundantes y ricos en citoqueratinas fosforiladas, y poseen más puentes disulfuro que en los estratos basal y espinoso. En este estrato se identifican los cuerpos de Odland o queratinosomas, los cuales son organoides de las células granulosas más profundas, aunque también pueden hallarse en el estrato espinoso. Estos queratinosomas no se encuentran en epitelios no queratinizados por lo cual se puede deducir que cumplen un papel importante en el proceso de queratinización.

La célula granulosa, desarrolla una importante actividad de síntesis de proteínas, lípidos, receptores y antígenos relacionados con la queratinización, para posteriormente, en un periodo de 5 a 6 horas, prepararse para destruirse y convertirse en un elemento del estrato corneo.

Estrato córneo: Examinado con microscopía óptica, el estrato córneo se caracteriza por estar constituido por células planas sin núcleo evidente. Estas células son denominadas *corneocitos*, y no presentan gránulos de queratohialina. Ultraestructuralmente, las células de las capas cornificadas carecen de organoides y están compuestas de filamentos agrupados de forma compacta, que se forman a partir de los tonofilamentos de citoqueratina. La célula queratinizada toma la apariencia de una escama compacta y deshidratada, que está íntimamente adosada a las escamas adyacentes.

Su membrana plasmática es más gruesa que las de las células más profundas. Las uniones intercelulares se modifican, facilitando la descamación celular. A este nivel, los desmosomas han desaparecido y las células entran en contacto unas con otras mediante interdigitaciones (Figuras 14).

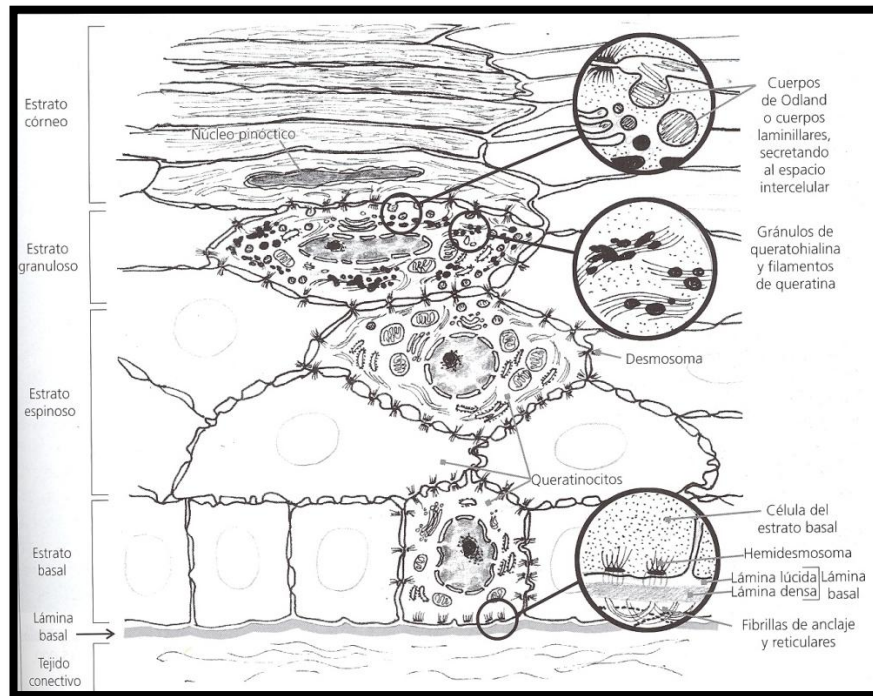


Figura 14. Esquema con la diferenciación celular en un epitelio plano estratificado queratinizado.

Ferraris y Campos 2006.

Respecto a su morfología, en la superficie celular de los queratinocitos existen 5 patrones relacionados con el grado de diferenciación de los mismos:

- Patrón celular tipo I: Se caracteriza por la presencia de microvellosidades como marcador de diferenciación superficial.
- Patrón celular tipo II: Se caracteriza por la presencia de micróplicas. Las micróplicas son crestas superficiales originadas por pliegues de membrana de longitud variable y de curso básicamente rectilíneo.
- Patrón celular tipo III: Se caracteriza por presentar micróplicas curvas, de idéntico carácter a las del tipo II, si bien morfológicamente ofrecen un patrón curvilíneo en los extremos terminales.

- Patrón celular tipo IV: Denominado también patrón reticular, se caracteriza por presentar micróplicas circulares, ramificadas y confluentes.
- Patrón celular tipo V: Se caracteriza por presentar un patrón poroso en su superficie, relacionado con la existencia de oquedades claramente definidas y delimitadas por una moderada sobreelevación marginal.

Los queratinocitos más indiferenciados, que se corresponden con los de los estratos basal y espinoso, presentan en su superficie abundantes microvellocidades (patrón I). A medida que los queratinocitos se diferencian, aparecen micróplicas en su superficie (patrones II, III y IV). El patrón poroso (patrón V) se observa en la superficie al final del proceso de diferenciación. Estas estructuras superficiales de los queratinocitos poseen dos funciones básicas: canalizar el flujo de las secreciones en la superficie celular y favorecer la cohesión intercelular una vez que desaparecen los desmosomas (Ferraris y campos, 2002).

B.- Población extrínseca: Esta población es de origen ajeno al epitelio, está formada por células permanentes y células transitorias, como se muestra a continuación:

- Población extrínseca permanente: Representa el 9% de la población celular del epitelio y está constituida por 3 tipos de células.

1. Melanocitos: Son células claras, de núcleo pequeño, de aspecto dendrítico, con abundantes gránulos precursores de melanina que en estados tempranos, se denominan premelanosomas y carecen de melanina.

Al madurar, estos gránulos reciben el nombre de melanosomas, los cuales son transferidos a los queratinocitos, haciendo posible la pigmentación homogénea del epitelio. Cada melanocito tiene queratinocitos asociados a los que suministra melanina, por lo que a este conjunto de células se le conoce como *unidad epitelial de la melanina*.

2. Células de Merkel: Se encuentran entre las células de la capa basal del epitelio, Se diferencian de los melanocitos porque carecen de prolongaciones de tipo dendrítico. Son células sensoriales para la percepción de la presión.

3. Células de Langerhans: Estas células son las presentadoras de los antígenos a los linfocitos T, de manera que son las iniciadoras de la respuesta inmunológica rápida. En la mayoría de los casos, aparecen en el estrato espinoso del epitelio. Las células de Langerhans poseen prolongaciones de morfología dendrítica, y en su interior poseen gránulos de Birbeck.

Las células de Langerhans derivan del mesénquima y pertenecen al sistema mononuclear fagocítico. La secreción paracrina de GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos, macrófagos y monocitos) por parte del queratinocito activado, estimula la expresión de moléculas ICAM-1 y la secreción de óxido nítrico por parte de estas células.

Por otra parte, la secreción paracrina de TNF por la célula de Langerhans estimula la expresión de moléculas de moléculas ICAM en los queratinocitos.

- Población extrínseca transitoria: Esta población representa alrededor del 1% de las células del epitelio y está constituida por granulocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos que pueden infiltrarse ocasionalmente en el epitelio bucal.

3.1.2. MEMBRANA BASAL DE LA MUCOSA ORAL

La separación entre el epitelio y el corion se establece mediante la membrana basal. Si se observa con microscopía electrónica, la membrana basal posee dos regiones: la lámina basal, sintetizada por las células del epitelio, y la lámina reticular, sintetizada por las células del conectivo.

Lámina basal: Esta estructura, se puede observar al microscopio electrónico de transmisión como una doble lámina rectilínea de distinta densidad: la lámina densa y la lámina lúcida. La lámina densa está constituida por una red tupida rica en colágeno IV, y heparán, mientras que la lámina lucida posee laminina y entactina.

Lámina reticular: Esta lámina está constituida por fibras inmersas de una matriz de glucosaminoglucanos. Su espesor varía de acuerdo al grado de fricción con el epitelio suprayacente, siendo más gruesa en los epitelios queratinizados. Sus fibras son:

- Fibras de anclaje: Son fibras de colágeno VII que finalizan en la lámina densa y forman bucles en pequeñas zonas de anclaje con colágeno tipo IV, denominadas placas de anclaje.
- Fibras reticulares: Compuestas principalmente de reticulina (colágeno I y III). Están distribuidas paralelamente al epitelio entre las fibras de anclaje. La fibronectina colabora a fijar la lámina reticular a la lámina basal.

La membrana basal posee varias funciones, como el ser una estructura de fijación entre epitelio y conectivo, un filtro físico y químico (malla de colágeno IV), por restringir el paso de cargas negativas.

Otro de sus papeles, es servir de guía para la migración celular en el proceso de reepitelización de heridas y como barrera defensiva.

Es importante destacar que la membrana basal de la cavidad bucal, presenta características especiales, siendo más gruesa en los epitelios no queratinizados, y que su espesor con la edad disminuye progresivamente.

3.1.3. LÁMINA PROPIA O CORION DE LA MUCOSA ORAL

Es una lámina de tejido conectivo de espesor variable que confiere sostén y nutrición al epitelio. Esta función está reforzada por la presencia de papilas que llevan vasos y nervios al epitelio y que varían de longitud y anchura de acuerdo a la zona. El tejido conectivo puede ser laxo, denso o semidenso según la región, al igual que la distribución de células, fibras y sustancia fundamental de acuerdo a la región de la cavidad oral que se considere.

Entre las células que podemos encontrar en esta capa están los fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas. Existe una estrecha relación entre el fibroblasto y el queratinocito de la población epitelial subyacente. La secreción de interlequina 1 del queratinocito activado promueve a la proliferación y actividad del fibroblasto, encargado de la secreción de prostaglandinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

Respecto a la matriz extracelular, la lámina propia es especialmente rica en tres tipos de fibras:

- Las fibras colágenas resisten las fuerzas de tracción y evitan deformaciones de la mucosa.
- Las fibras elásticas devuelven al tejido la normalidad después de la tensión.
- Las fibras reticulares refuerzan las paredes de los vasos sanguíneos.

En algunas zonas la lámina propia se adhiere directamente al periostio. En otras zonas recubre la submucosa, en la lámina propia de la mucosa bucal. A nivel de la lámina propia de la mucosa bucal existe una rica inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información sobre la percepción del dolor, la temperatura, el tacto y la presión.

3.1.4. SUBMUCOSA

Está formada por tejido conectivo laxo, destinado a unir la mucosa a los sitios adyacentes. Puede existir o no como una capa bien definida, existiendo submucosa en zonas donde se requiere movimiento y que están expuestas a choque masticatorio. Su espesor es variable y en ella se encuentran glándulas salivares, vasos, nervios y tejido adiposo. Allí las grandes arterias se dividen para formar ramas más pequeñas que penetrarán en la lámina propia. Las fibras nerviosas son mielínicas cuando atraviesan la submucosa, pero pierden la vaina de mielina antes de dividirse en la lámina propia.

3.2. CLASIFICACIÓN HISTOTOPOGRÁFICA DE LA MUCOSA ORAL

Atendiendo tanto a su estructura como a su ubicación, en la cavidad bucal podemos encontrar distintos tipos de mucosa oral. De este modo, la mucosa oral puede clasificarse desde un punto de vista histológico (clasificación histológica) o desde un punto de vista topográfico (clasificación topográfica), como veremos a continuación.

3.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

Dependiendo del grado de queratinización de los queratinocitos en la cavidad oral podemos encontrar diferentes tipos de epitelio, los cuales pueden ser clasificados desde un punto de vista histológico en tres tipos fundamentales:

- A.- Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado.
- B.- Epitelio plano estratificado paraqueratinizado.
- C.- Epitelio plano estratificado no queratinizado.

A.- Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado

En este epitelio encontramos todas las capas que acabamos de describir: basal, espinosa, granulosa y córnea.

B.- Epitelio plano estratificado paraqueratinizado

Este tipo de epitelio presenta características similares al queratinizado a nivel de los estratos basal, espinoso y granuloso, aunque este último presenta gránulos poco desarrollados.

Las diferencias fundamentales están en los elementos celulares del estrato córneo, pues en este tipo de epitelio, las células de este estrato conservan sus núcleos y algunas organelas, lo cual indica un metabolismo celular escaso. El epitelio estratificado paraqueratinizado presenta gran cantidad de tonofilamentos.

C.- Epitelio plano estratificado no queratinizado

Se diferencia del epitelio queratinizado principalmente porque no existe una capa córnea superficial, careciendo igualmente estrato granuloso, aunque se pueden formar gránulos incompletos. De esta manera, podemos encontrar tres capas en el epitelio no queratinizado:

- capa basal: Esta capa es similar a la descrita anteriormente.
- capa intermedia: Presenta células poliédricas con núcleo redondo de cromatina laxa y citoplasma basófilo, con abundante cantidad de glucógeno. Las células no tienen aspecto espinoso, estando asociadas mediante desmosomas e interdigitaciones.
- capa superficial: Son células aplanadas, nucleadas, de aspecto normal (Figura 15).

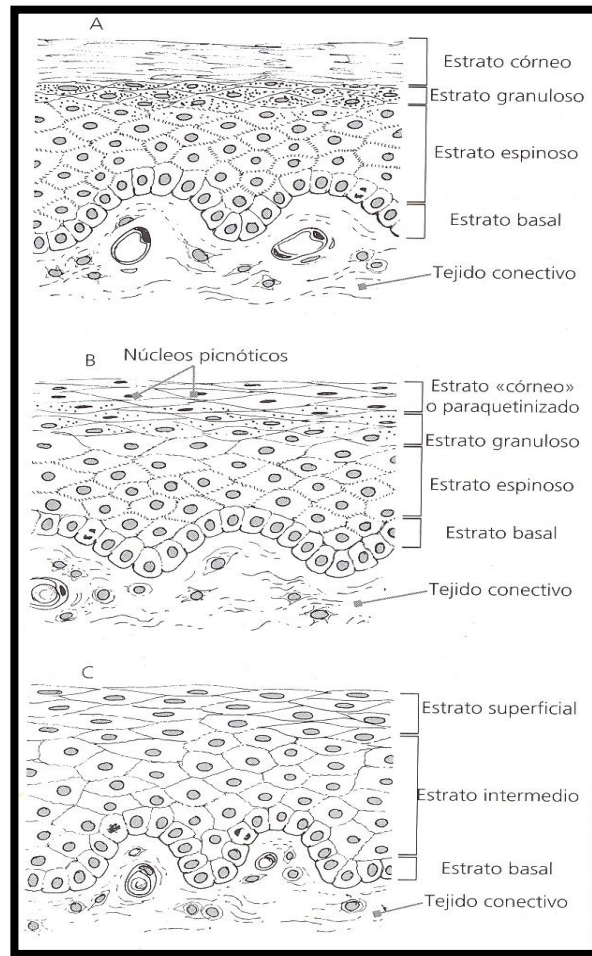


Figura 15. Esquemas con los diferentes tipos de epitelios estratificados planos. **A.** queratinizado. **B.** paraqueratinizados. **C.** no queratinizado. Ferraris y Campos 2006.

3.2.2. CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA

La estructura morfológica de la mucosa oral varía por la adaptación funcional en las diferentes regiones de la cavidad oral. Teniendo en cuenta esto, podemos dividir la mucosa oral en tres tipos principales:

A.- Mucosa de revestimiento.

B.- Mucosa masticatoria.

B.- Mucosa especializada.

A.- Mucosa de revestimiento

La mucosa de revestimiento cumple función de protección. El tipo de epitelio es no queratinizado, con un corion laxo o semilaxo y submucosa bien definida. Es distensible y se adapta a la contracción y la relajación. El número de de capas del epitelio es mayor que el de la mucosa masticatoria, siendo escasas las crestas epiteliales y las papilas del tejido conectivo. Se encuentra principalmente en:

Mejillas

Labios

Cara inferior del labio

Paladar blando

Cara ventral de lengua

Suelo de boca

B.- Mucosa masticatoria

Este tipo de mucosa está sometida a fuerzas intensas de fricción y presión originadas en el impacto masticatorio. Suele estar fijada al hueso y no experimenta estiramiento. Este tipo de mucosa es típico de la encía y el paladar duro.

El tipo de epitelio es queratinizado o paraqueratinizado, con numerosas crestas en particular en las encías, y con corion semidenso o denso. Carece de submucosa en la encía, pero está presente en la parte lateral del paladar duro, donde se encuentra tejido adiposo y glandular.

C.- Mucosa especializada

Recibe este nombre porque aloja botones gustativos intraepiteliales, que se localizan en el epitelio de la cara dorsal de la lengua.

3.3. IMPORTANCIA DE LAS CITOQUERATINAS EN LA DIFERENCIACIÓN EPITELIAL DE LA MUCOSA ORAL

El epitelio de la mucosa oral humana cumple sus funciones a través de la expresión de una serie de proteínas especializadas. Entre ellas, las citoqueratinas (CKs), proteínas de filamento intermedio, típicas de las células epiteliales que forman una compleja familia de 20 polipeptidos diferentes con un peso molecular aproximado de 40 a 68 kD (Franke *et al.*, 1981; Moll *et al.*, 1982; Eichner *et al.*, 1984; Quinlan *et al.*, 1985; Moll, 1993). Las citoqueratinas, son codificadas por una numerosa lista de genes expresados por los diferentes tipos de epitelio. Estas proteínas pueden ser encontradas en las células en diferentes combinaciones de polipéptidos tipo I, ácidos y tipo II básicos asociados igualmente al peso molecular y a su punto isoeléctrico (Sun *et al.*, 1980; Fuchs *et al.*, 1981; Tseng *et al.*, 1982; Heid *et al.*, 1988). Como proteínas de filamento intermedio, las citoqueratinas tienen funciones en el epitelio asociadas al citoesqueleto y a las uniones entre célula y célula. Por este motivo, las citoqueratinas son necesarias para el mantenimiento de la forma celular, integridad, morfología y cohesión entre las células epiteliales. Por esta razón, se consideran excelentes marcadores de los diferentes patrones de diferenciación epitelial (Presland y Juveric; Moll *et al.*, 1982).

Alrededor de 20 citoqueratinas han sido descritas en todos los tipos de epitelio. Particularmente, la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas parece ser específica de cada tipo de epitelio (Ujwala *et al.*, 2004).

En primer lugar, los epitelios simples están frecuentemente asociados a las proteínas de bajo peso molecular, polipéptidos tipo I, por otra parte las proteínas de peso molecular intermedio, citoqueratinas tipo II son asociadas a epitelios estratificados (Rojas *et al.*, 1998) (Figura 16).

En general, el epitelio simple tiende a expresar CKs 7, 8, 18 y 19, por otra parte el epitelio estratificado no queratinizado, expresa grandes cantidades de CKs 4 y 13 en células de la capa suprabasal (Costea *et al.*, 2003; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007), CK 5 y 14 en las células de la capa basal (9). Finalmente, el epitelio estratificado queratinizado, expresa citoqueratina 1 y 10, los cuales pueden ser utilizados como marcadores de cornificación (Van der Velden *et al.*, 1999) (Figura17).

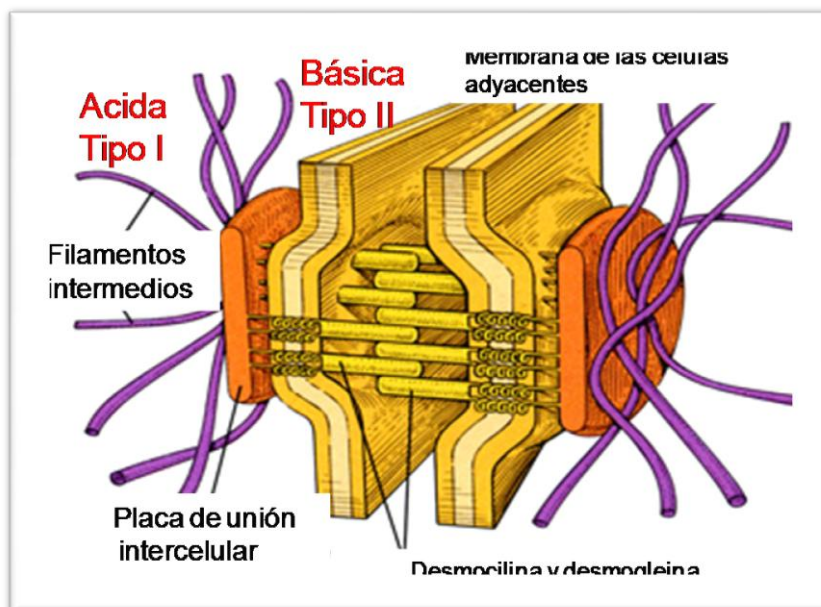


Figura 16. Estructura de y localización de las proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas).

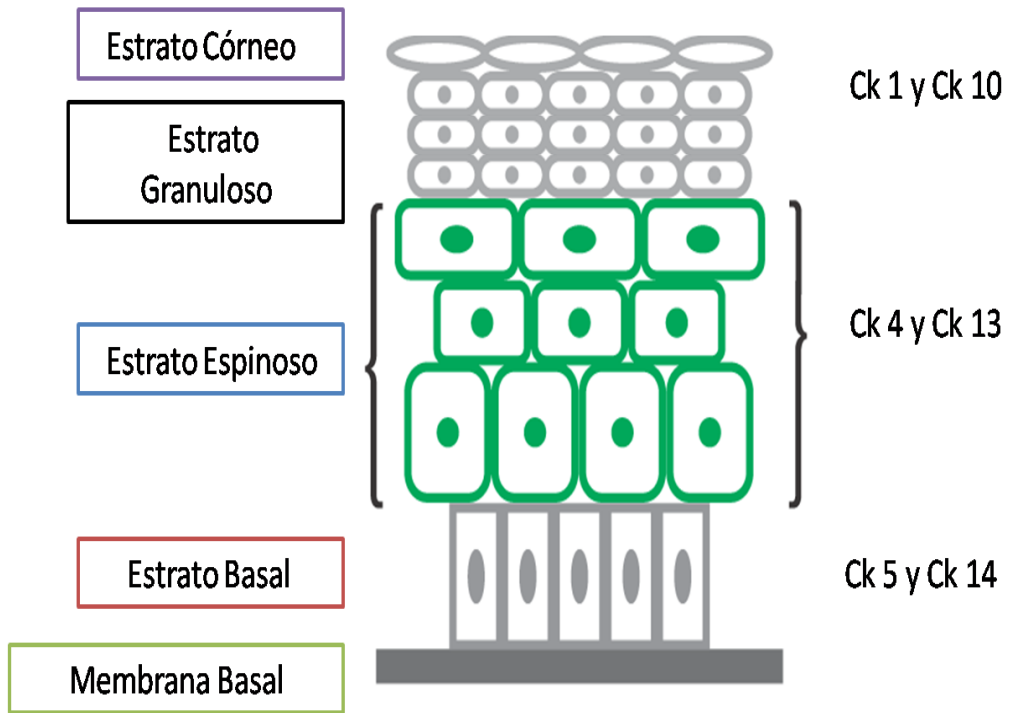


Figura 17. Distribución de la expresión de proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) en los diferentes estratos del tejido epitelial.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**: construir mediante Ingeniería Tisular un sustituto equivalente de mucosa oral humana de espesor completo para su uso experimental y terapéutico.
- **Objetivos específicos**: para el logro de este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos:
 1. Aislar y expandir las células epiteliales (queratinocitos) y estromales (fibroblastos) de la mucosa oral, a partir biopsias de mucosa oral humana.
 2. Elaborar un sustituto de mucosa oral humana de espesor completo mediante Ingeniería Tisular usando para ello biomateriales de fibrina y agarosa.
 3. Evaluar y realizar un control de calidad *in vitro* de los tejidos generados en el laboratorio mediante microscopia óptica y electrónica.
 4. Evaluar y realizar un control de calidad *in vitro* de los tejidos generados en el laboratorio mediante inmunohistoquímica y *microarray*.
 5. Evaluar y realizar un control de calidad *in vivo* de los tejidos generados en el laboratorio mediante implante en un modelo animal y análisis mediante microscopia óptica y electrónica e inmunohistoquímica.
 6. Evaluar y realizar un control de calidad *in vivo* de los tejidos generados en el laboratorio mediante implante en un modelo animal y análisis mediante inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ORIGEN HUMANO UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

Para la realización del presente trabajo de investigación, se utilizaron dos fuentes de tejido humano diferentes: 30 muestras de mucosa oral normal de espesor total (epitelio y corion) obtenidas de 30 pacientes sanos sometidos a diferentes procedimientos de Cirugía Oral ambulatoria bajo anestesia local. Algunas de las muestras fueron fijadas y embebidas en parafina para su uso como grupo control de mucosa oral humana normal y el grupo restante fue usado para el asilamiento de fibroblastos y queratinocitos.

Por otra parte, se utilizaron muestras embebidas en parafina de tejido embrionario humano correspondiente a mucosa oral. Las muestras de tejido embrionario fueron suministradas por el Departamento de Anatomía Humana de la Universidad de Granada. Estas muestras correspondían abortos espontáneos de mujeres en la cuarta semana de gestación.

Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron previa autorización mediante un consentimiento informado para el uso de los tejidos donados, una vez que éstos habían sido pertinentemente informados del procedimiento. Este estudio contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Granada.

En el caso de las muestras usadas para el asilamiento de fibroblastos y queratinocitos los tejidos extraídos fueron introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril, constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref.D5796, Saint- Quintin-Favallier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

2. DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS DE MUCOSA ORAL

Transcurrido el periodo de transporte, y dentro de las 24 horas posteriores a su extracción los tejidos fueron lavados dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del corion de la mucosa oral y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras fueron incubadas a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas (Figura 18).

Esta solución es capaz de digerir el colágeno del corion y liberar los fibroblastos estromales dejando intacto el epitelio oral. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el epitelio no digerido de la mucosa oral utilizándose este para obtener cultivos primarios de queratinocitos.

Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se centrifugó a 1000rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía las células estromales disgregadas del corion, recogándose el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15ml.

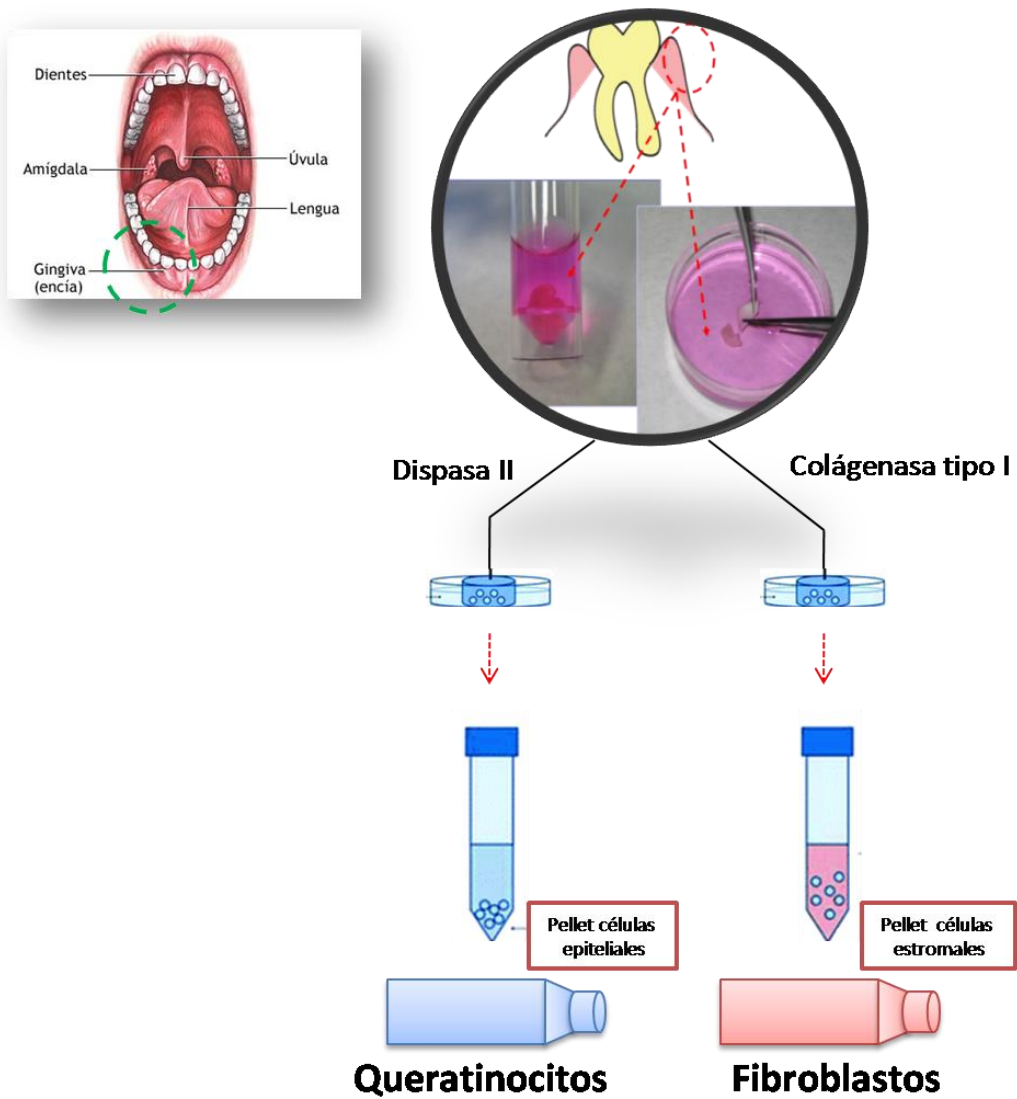


Figura 18. Esquema representativo del proceso de obtención, transporte y procesamiento de las muestras de Mucosa Oral Humana.

Como medio de cultivo, se utilizó DMEM enriquecido en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. 5796) suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos MF (medio de fibroblastos) (Figura 19).

Para la obtención de cultivos puros de queratinocitos las muestras de epitelio no digeridas tras la incubación con colagenasa tipo I, fueron lavadas en PBS para conseguir la eliminación de los restos de enzima y posteriormente divididas en pequeños explantes mediante fragmentación mecánica en condiciones de esterilidad y cultivadas, en frascos de cultivo de 25 cm², de superficie.

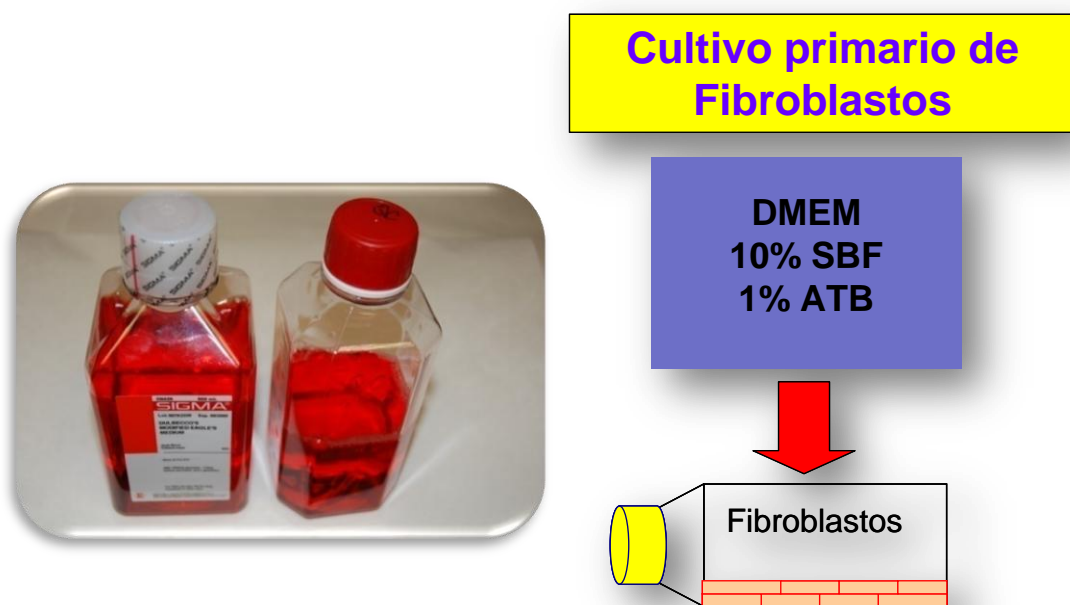


Figura 19. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos a partir de pequeñas biopsias de mucosa oral.

Para el cultivo de queratinocitos se empleó medio de cultivo selectivo QC (25,26), el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales (Figura 20).

La composición del medio QC fue la siguiente:

1. Medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinheim, Alemania).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinheim, Alemania).
3. Adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. A9795).
4. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B).
5. Factores de crecimiento para células en cultivo:
 - Insulina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. I2767).
 - Triiodotironina (1.3 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. T5516).
 - Toxina colérica (8 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. C3012).
 - Hidrocortisona (0.4 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. H0888).

En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C y 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.



Figura 20. Cultivo primario de queratinocitos usando medio de cultivo QC.

3. SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MUCOSA ORAL

Una vez alcanzada la confluencia, los distintos cultivos celulares se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo (Figura 21).

Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 2 ml de medio de cultivo MF, o QC. La presencia de abundantes proteínas séricas en los medios de cultivo MF, y QC es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina.

Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio MF o QC y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² de superficie.

Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expandieron hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo, mientras que los fibroblastos se expandieron unas quince veces antes de su uso para fabricar los sustitutos de tejido conectivo. En todos los casos, y para asegurar una adecuada viabilidad celular, la elaboración de sustitutos de mucosa oral se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los primeros subcultivos.

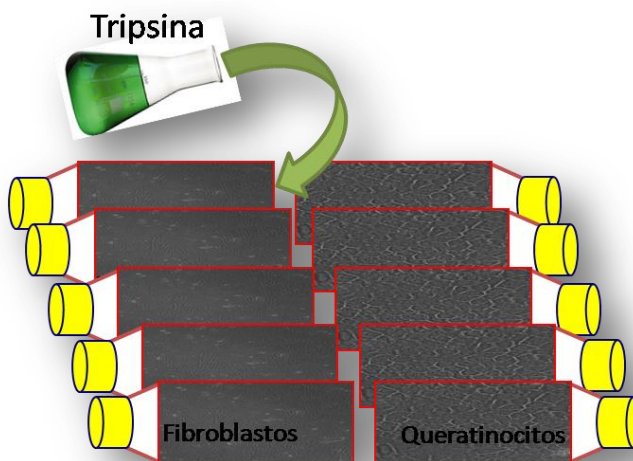


Figura 21. Proceso de tripsinización de cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos utilizando *tripsina-EDTA Sigma Aldrich*.

4. CONGELACIÓN DE CÉLULAS

Para su conservación a largo plazo, los cultivos confluentes de células se procesaron y congelaron a temperatura de nitrógeno líquido. Para ello, los fibroblastos y queratinocitos, trataron con una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para despegarlos de la superficie del frasco de cultivo.

Para neutralizar la tripsina, se añadió una cantidad equivalente de medio de cultivo MF o QC (todos ellos contienen un 10% de suero bovino fetal), obteniéndose las células separadas mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Tras esto, las células se mantuvieron sobre hielo y se resuspendieron en medio de congelación celular (10% de DMSO, 10% de suero bovino fetal y 80% de DMEM) en viales especiales para ultracongelación.

Para evitar un choque térmico demasiado brusco, las células incluidas en el medio de congelación se congelaron a -20°C durante las primeras 12-24 h, pasándose a continuación a una temperatura de -60° durante 24 horas y, finalmente, a un tanque con nitrógeno líquido (inicialmente en fase vapor y después en fase líquida), donde se almacenaron a largo plazo.

5. DESARROLLO DE MATRICES EXTRACELULARES: ELABORACIÓN DE SUSTITUTOS DEL CORION DE LA MUCOSA ORAL

Para la creación de matrices extracelulares de soporte o sustitutos estromales, se utilizó un modelo de gel de agarosa al 2% y fibrina. Se utilizó plasma sanguíneo humano congelado procedente de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, España) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT). La fabricación de sustitutos estromales de fibrina con fibroblastos de mucosa oral se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica previamente descrita por Meana y colaboradores (Llames *et al.*, 2004; Meana *et al.*, 1998). Para ello, se utilizaron 250.000 células procedentes de los cultivos primarios, resuspendidos en 2 ml de medio de cultivo DMEM, a los cuales se añadieron unos 5 ml de plasma sanguíneo humano (equivalente a 10-12 mg de fibrinógeno) y 14 ml de suero salino al 0,9%. Para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina, se añadieron 200 μ l de ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides Ecofarma, Valencia, España). Simultáneamente, se empleó agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta en PBS. En primer lugar, se disolvió la agarosa sólida al 2% (p/v) en PBS, calentando la mezcla hasta ebullición para favorecer la disolución de la agarosa. Esta solución de agarosa al 2% en PBS se esterilizó a 120°C y 2 atmósferas de presión mediante autoclavado.

Para la fabricación de sustitutos estromales, se incubaron al baño María unos 2 ml del gel de agarosa hasta alcanzar el punto de fusión, momento en el que fue agregada a la mezcla de fibrina, hasta obtener una concentración final de 0.1%. Finalmente, la reacción de coagulación de la fibrina se precipitó mediante la adición inmediata de 1 ml de CaCl_2 0,025 mM a la mezcla, esta mezcla, aún líquida se alicuotó en recipientes estériles de cultivo celular y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los geles alicuotados se dejaron en el incubador a 37°C con un 5% de CO_2 , durante 2 horas para que coagularan y secaran. Después de este tiempo se cubrieron con 10 ml de medio de cultivo MF (Figura 22).

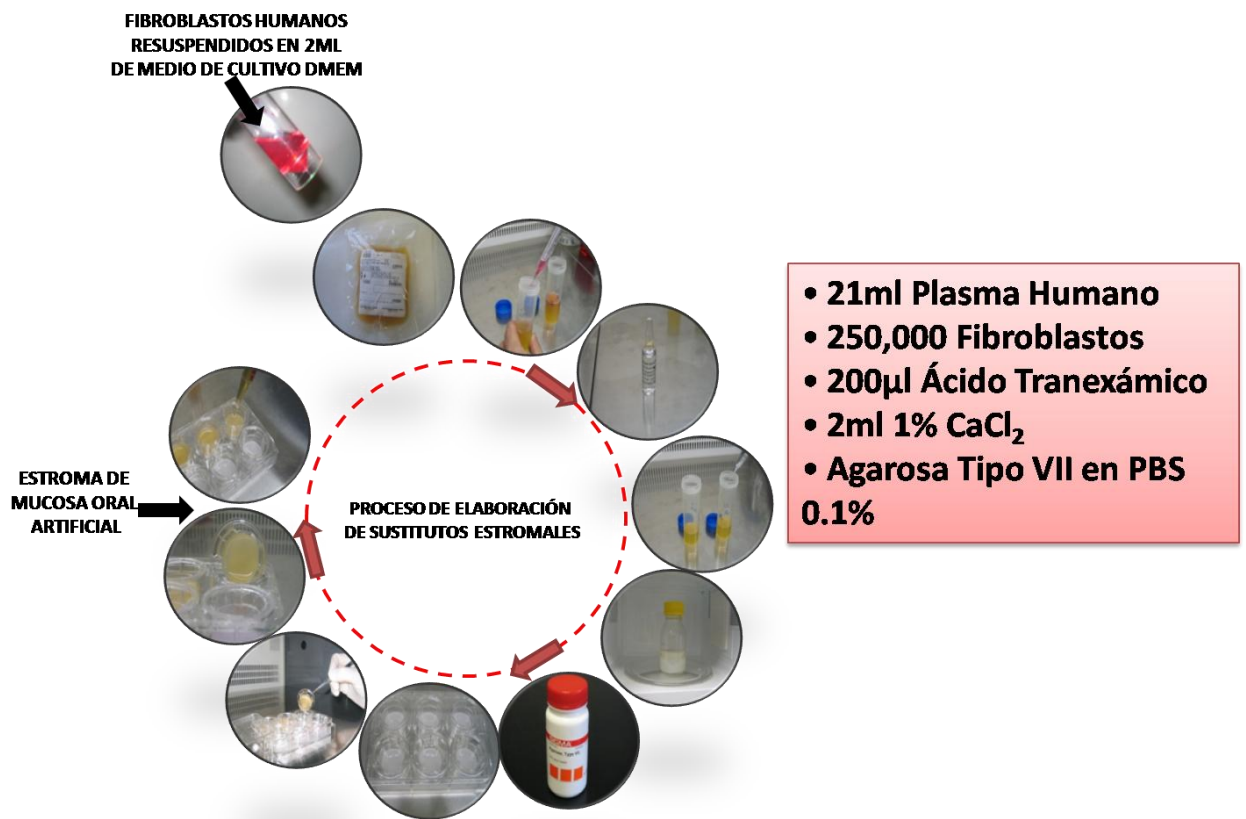


Figura 22. Preparación de sustitutos estromales de fibrina y agarosa.

6. CONSTRUCCIÓN DE SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

La construcción de sustitutos de mucosa oral se llevó a cabo de modo secuencial. Para ello, en primer lugar se elaboró un sustituto estromal tal como se describió anteriormente. Para posteriormente, fabricar un equivalente epitelial de mucosa oral en la superficie del mismo.

Además, para garantizar una correcta diferenciación y estratificación del epitelio construido, se utilizó la técnica de cultivo denominada *interfase aire-líquido* (Reichl y Müller-Goymann, 2003). Para ello, los constructos de mucosa oral se elaboraron en sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0.4 μm (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU). Estos sistemas de cultivo están compuestos por una placa estéril de 6 pocillos en el interior de los cuales se aloja una pieza de plástico móvil cuya base está formada por una membrana porosa y permeable de nylon o policarbonato.

El tamaño de estos poros permite a los nutrientes pasar a través de la membrana de la placa pero evita la migración de las células de un compartimento a otro.

Para la construcción de mucosa oral artificial mediante ingeniería tisular, una vez fabricado el sustituto estromal (fibroblastos embebidos en geles de fibrina y agarosa), una vez solidificados los sustitutos estromales 24 horas más tarde, se tripsinizaron los cultivos primarios de epitelio de la mucosa oral, cultivándose las células epiteliales individualizadas sobre las superficie de los sustitutos estromales en medio QC (unas 500.000 células en cada caso).

Finalmente, 15 días después de establecer el cultivo epitelial sobre el sustituto estromal, se utilizó la técnica aire-líquido para favorecer la estratificación epitelial. Para ello, se añadió medio de cultivo MP al depósito inferior del sistema, pero no al superior, que se expuso directamente al aire. Esta técnica aire-líquido se mantuvo durante 15 días más (Figura 23).

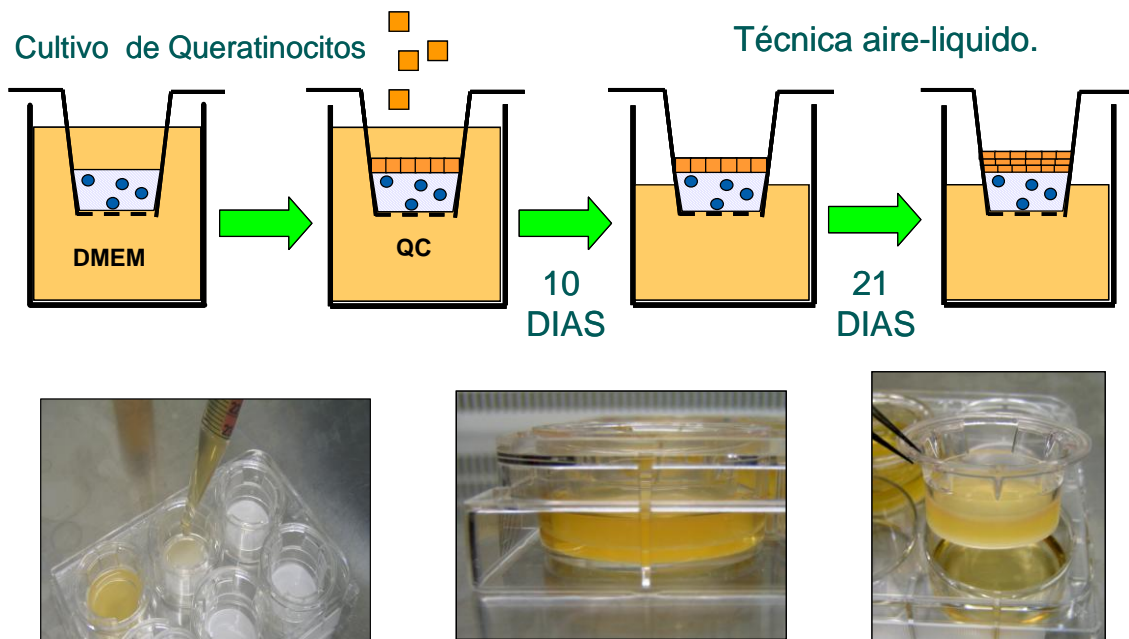


Figura 23. Elaboración de sustitutos de mucosa oral utilizando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo transwell®.

7. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL

7.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, tanto las muestras control como los diferentes tejidos artificiales se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). A continuación, el etanol se substituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4 μm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

7.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C durante 4-6 horas, lavándose a continuación dos veces en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), desecándose por completo mediante el método del punto crítico (Fernández-Segura et al., 1999). Este método consiste en la substitución de la acetona tisular, junto con cualquier resto de agua que pudiese quedar en las muestras, por CO₂ líquido en frío. A continuación, el CO₂ es evaporado a baja presión, aumentándose progresivamente la temperatura, hasta que la muestra queda desecada por completo. Una vez desecados, los tejidos fueron recubiertos por átomos de oro y analizados en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

7.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron como se describió para microscopía electrónica de barrido. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 h a 4°C, utilizando como agente intermedio el óxido de propileno. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la polimerización de la resina durante 2 h a 60°C. Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor de las muestras incluidas en resina, utilizando para ello un ultramicrotomo Reichter Ultracut.

El montaje de las secciones ultrafinas se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uracilo al 2% en agua destilada durante 10 minutos y citrato de plomo durante 5 min, de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds (Reynolds, 1963).

La observación se llevo a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania).

8. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA MUCOSA ORAL OBTENIDA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

Para la evaluación del comportamiento *in vivo* de los sustitutos de mucosa oral generados mediante ingeniería tisular, muestras de mucosa oral obtenida en el laboratorio con múltiples capas de epitelio fueron implantadas en un total de nueve ratones inmunodeficientes de seis semanas (Fox 1^{nu/nu} *immunodeficient athymic mice*. Harlan, USA).

Todos los animales fueron anestesiados usando inyección intramuscular de una mezcla de maleato de acepromazina 0.5 g (Calmo-Neosan[®] 0.001 mg por gramo de peso) y clorhidrato de ketamina (Imalgene 1000[®] 0.15 mg por gramo de peso). Todos los procedimientos fueron realizados dentro de cabinas de seguridad biológica y los animales se controlaron dentro en cámaras de flujo laminar aisladas.

Con el fin de evaluar el comportamiento *in vivo* de la mucosa oral artificial, dichos sustitutos fueron implantados en la zona dorsal de cada uno de los animales, en contacto directo con el aire; las muestras de mucosa oral artificial fueron adheridas al ratón usando sutura 6/0 PDS. Todos los implantes correspondieron a mucosa oral artificial madura de la tercera semana. Finalmente los ratones fueron sacrificados usando anestésicos a altas dosis 4 semanas después de la implantación de mucosa oral obtenida en el laboratorio. Todas las muestras fueron recolectadas, para posterior análisis histológico (Figura 24).

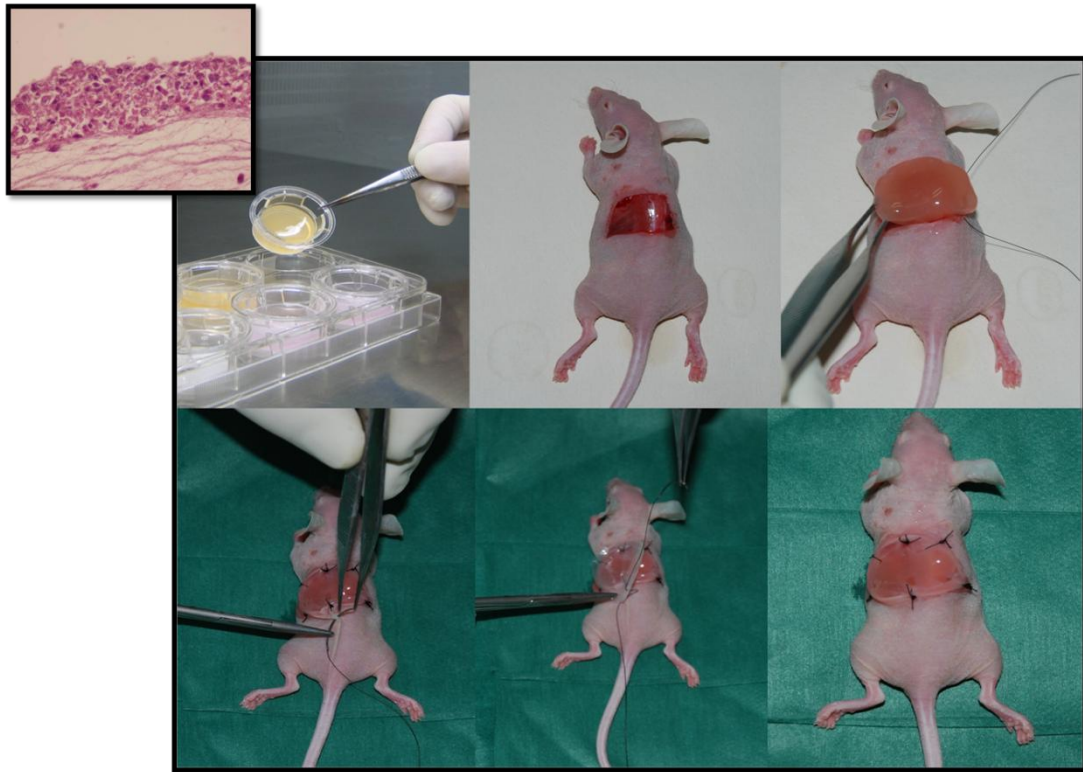


Figura 24. *Proceso de implantación de sustitutos de Mucosa Oral Humana fabricados con fibrina y agarosa.*

9. INMUNOHISTOQUÍMICA

La detección de proteínas específicas de las principales citoqueratinas (CKs) y de PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) se llevó a cabo utilizando diversas muestras de tejidos, las cuales se describen a continuación:

- En primer lugar, se utilizaron controles de mucosa oral normal procedentes de donantes sanos y de tejido embrionario correspondiente a mucosa oral humana.
- En segundo lugar, se utilizaron muestras de mucosa oral artificial obtenida mediante ingeniería tisular y mantenidas en cultivo a diferentes estadios de diferenciación *in vitro*.
- Finalmente, se analizaron muestras de mucosa oral humana artificial implantadas *in vivo* en un modelo animal.

Para llevar a cabo la inmunohistoquímica, las muestras tisulares se desparafinaron en xileno, se lavaron en alcohol y se rehidrataron con agua. A continuación, tras inactivar las peroxidases endógenas con agua oxigenada, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión a los anticuerpos mediante incubación en albúmina sérica bovina. Una vez lavadas, se procedió a hervir las secciones tisulares en tampón citrato para favorecer la presentación de los epitopos proteicos. Una vez enfriadas las muestras, éstas se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 1) durante 2 h a temperatura ambiente, lavándose en PBS a continuación. Para la detección de los anticuerpos primarios unidos a las proteínas tisulares, se utilizaron anticuerpos secundarios, en este caso frente a anticuerpos de ratón marcados con peroxidasa de rábano, así como estreptavidina. Para la detección de la reacción colorimétrica, se utilizó biotina comercial, que adquiere un color marrón oscuro cuando es oxidada por la peroxidasa.

Una vez llevada a cabo la reacción inmunológica, contando con la presencia de controles positivos y negativos, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron utilizando cubreobjetos de vidrio.

Anticuerpos Primarios	Dilución	Laboratorio Comercial	Referencia
Anti-AE1/AE3	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	001000QD
Anti-NuMA	1:20	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt, Germany	NA08
Anti-Pancitoqueratina	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	001607QD
Anti-PCNA	1:1000	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	P 8825
Anti-CK4	1:1000	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	C 5176
Anti-CK5	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	0534500QD
Anti-CK7	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	001004QD
Anti-CK8	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	005095QD
Anti-CK10	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	000150QD
Anti-CK13	1:400	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	C 0791
Anti-CK19	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain.	002163QD

Table 1. Anticuerpos Primarios usados en este trabajo y la dilución correspondiente para cada prueba Inmunohistoquímica. Laboratorio comercial y referencia para cada anticuerpo.

10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL MEDIANTE *MICROARRAYS*

Para la extracción del ARN total procedente de las muestras a analizar, se utilizó el sistema comercial RNAeasy de la casa comercial QIAgen (referencia 74204). Una vez extraído, el ARN se cuantificó mediante espectrofotometría y se evaluó su calidad mediante electroforesis y observación en geles de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes (Figura 25).

Para el análisis mediante *microarrays* de oligonucleótidos, se marcaron 10 µg de ARN total con un pigmento fluorescente y se hibridaron frente al sistema de *microarray* humano Affymetrix Genechip Human Genome U133 plus[®]. Este sistema contiene más de 54.675 genes y secuencias génicas expresadas (EST), incluyendo 62 genes control, siendo el más completo del mercado. De este modo, se pudo cuantificar la expresión relativa de un gran número de genes o secuencias expresadas contenidas en este sistema de Affymetrix.

Para el análisis de los datos, se calcularon medias de expresión génica para cada grupo de muestras (controles y muestras generadas mediante ingeniería tisular) y se determinaron los valores de expresión diferencial entre los grupos a comparar (*Fold-Changes* o FC), así como niveles de significación estadística mediante la prueba *t* de Student. Habitualmente, se seleccionaron genes con FC superior a 1 y valores de significación $p < 0,05$.

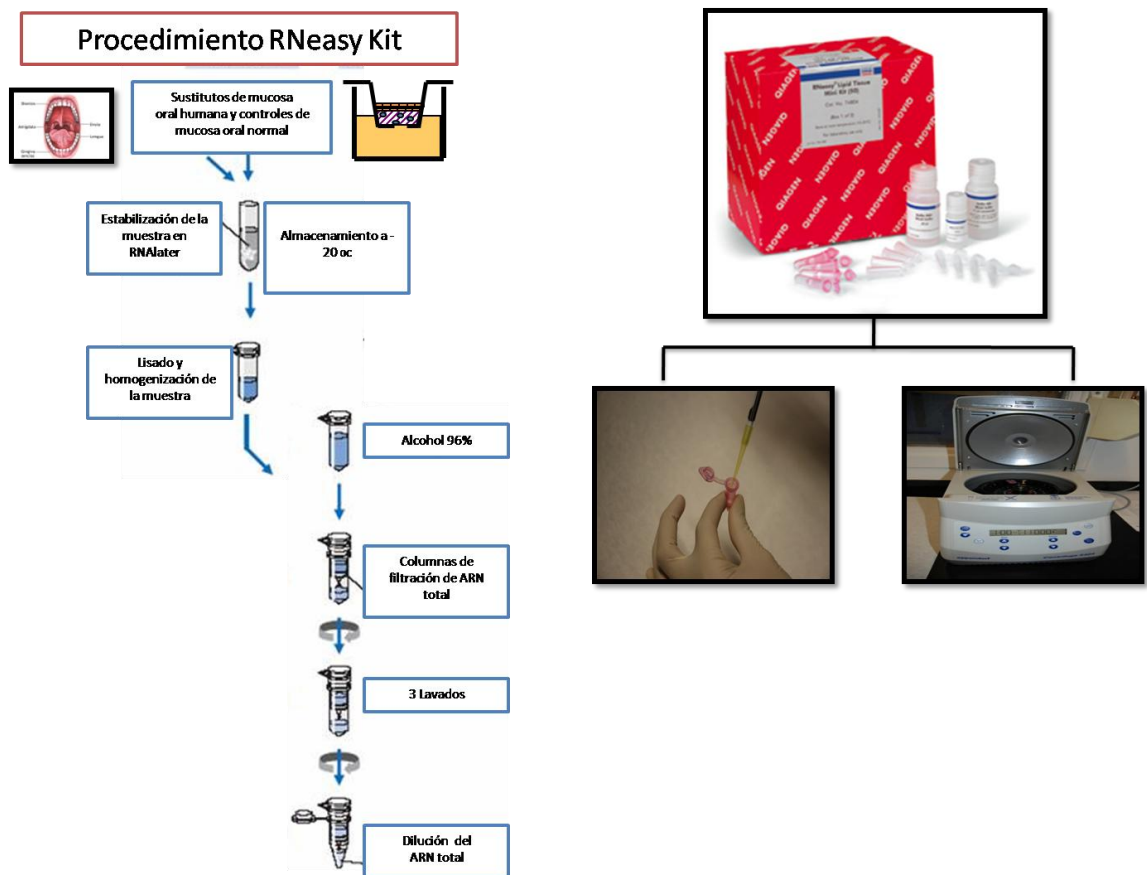


Figura 25. Proceso de extracción de ARN usando el sistema comercial RNeasy.

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS DE MUCOSA ORAL

El tratamiento enzimático de las muestras de mucosa oral humana demostró ser efectivo en las muestras de biopsias que se procesaron, obteniéndose abundantes células en todos los casos. Morfológicamente, estas células se observaron al microscopio óptico como elementos esféricos de pequeño tamaño (alrededor de $2\mu\text{m}$ de diámetro) que permanecían en suspensión en el medio de cultivo durante las primeras horas posteriores a su aislamiento. En general, todos los tejidos fueron completamente disgregados tras el tratamiento con dispasa y colagenasa, no obteniéndose ningún tipo de resto tisular microscópicamente visible.

Generación de cultivos primarios de fibroblastos.

El cultivo primario de fibroblastos y mostró un crecimiento celular muy rápido a partir de los primeros días. A las 24h (± 6), la mayor parte de las células se encontraban adheridas al fondo del frasco de cultivo y comenzaron a emitir pequeñas prolongaciones a modo de pseudópodos. El crecimiento de los fibroblastos se evidenció entre las 48 y 72 horas de cultivo, configurándose el 5º día, una trama celular, formada por células con largas prolongaciones, que acaba a partir del 7º día, por convertirse en una masa de células fusiformes que ocupaban toda la superficie del cultivo-cultivos confluentes (Figura 26).

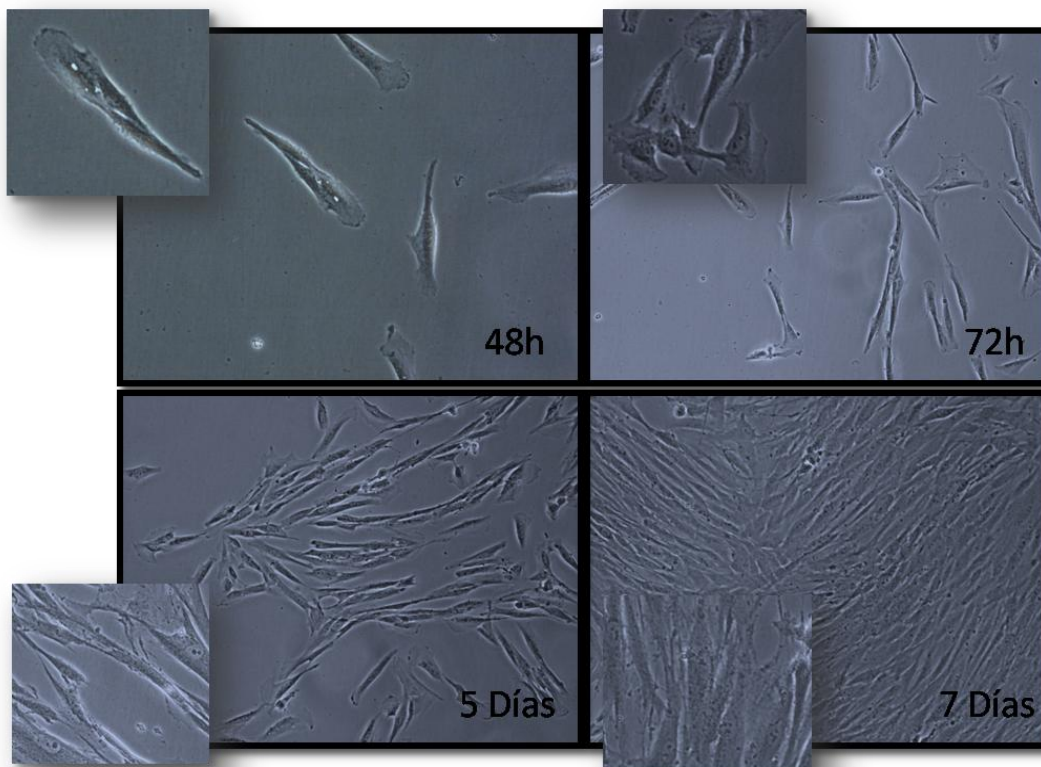


Figura 26. Proliferación de cultivo primario de fibroblastos a partir de las primeras 48 horas.

Generación de cultivos primarios de queratinocitos.

Siguiendo la metodología previamente descrita, el crecimiento de los queratinocitos resultó ser más lento que el de los fibroblastos, de manera que la expansión de las mismas se estableció de forma evidente a partir de séptimo día (media 8,2 desviación típica 3,1), observándose pequeñas colonias o islas constituidas por 4 ó 5 células redondeadas, y con un citoplasma muy poco refrigerante.

Estas colonias, esparcidas a lo largo de todo el cultivo (media de 8 colonias por frasco de 25 cm² de área, desviación típica 5,5), presentaron un diámetro medio de 1mm y fueron aumentando progresivamente de tamaño hasta hacerse confluentes, llegando a ocupar toda la superficie del frasco de cultivo después de 28 días (desviación típica 13,1). En este momento, el análisis, mediante microscopía óptica, pone de relieve la existencia de una población celular continua de queratinocitos, configurando una monocapa celular en la superficie de los frascos de cultivo, constituida por células irregularmente poliédricas con un núcleo voluminoso en el que se pueden apreciar hasta tres nucleolos y un citoplasma de aspecto hialino (Figura 27).

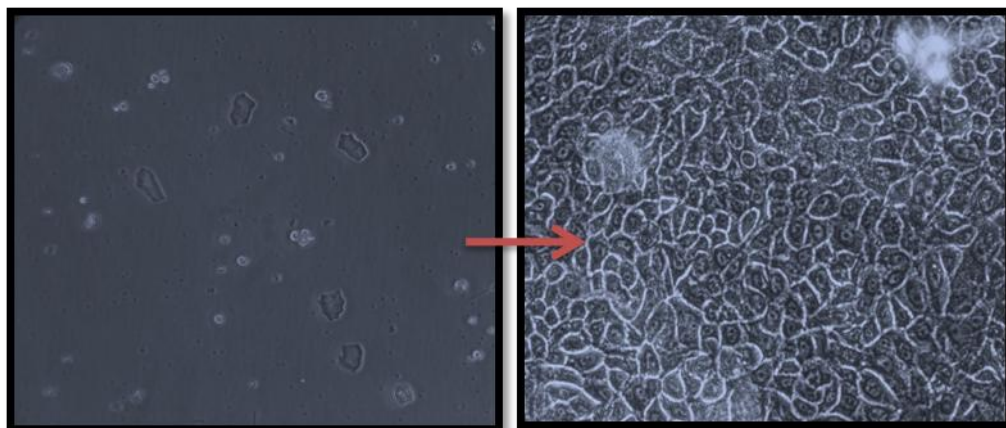


Figura 27. Evolución y confluencia del cultivo primario de queratinocitos.

2. CONSTRUCCIÓN DE EQUIVALENTES DE MUCOSA ORAL DE ESPESOR COMPLETO OBTENIDOS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral ha sido la elaboración de sustitutos o equivalentes de mucosa oral de espesor completo, los cuales se desarrollaron siguiendo una técnica de cultivo secuencial. Para asegurar la adecuada inmersión del cultivo así como la correcta diferenciación del epitelio multilaminar, se utilizó una técnica de cultivo de interfase aire-liquido, para lo cual se emplearon soportes porosos sobre los cuales se logró un adecuado crecimiento y adhesión a los mismos de las células epiteliales, lo que sugiere que los nutrientes y factores de crecimiento del medio de cultivo cruzaron de forma efectiva la membrana y migraron hacia el compartimiento superior de los soportes porosos, donde se encontraban las células, evitando al mismo tiempo la migración celular hacia otro compartimiento. Los cultivos de queratinocitos obtenidos fueron cultivados sobre el sustituto estromal desarrollado, obteniendo una buena consistencia, a lo que se unió una adecuada resistencia, lo cual facilitó el manejo y la manipulación de los mismos. Los fibroblastos mostraron buen índice de supervivencia y proliferación en el interior de los sustitutos estromales. Después de 2 días de cultivo, los queratinocitos incorporados dentro de los geles de fibrina y agarosa al 0,1%, mostraron una morfología alargada o estrellada, apareciendo extendidos por toda la superficie de la malla estromal. En ninguno de los casos se apreció contracción o pérdida de volumen de los geles de fibrina y agarosa después de generar los sustitutos de mucosa oral (Figura 28).



Figura 28. *Aspecto de la Mucosa oral obtenida mediante Ingeniería Tisular.*

3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS CONTROL Y DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL MANTENIDOS *IN VITRO*

Mediante microscopía óptica, las muestras controles de mucosa oral normal mostraron múltiples capas epiteliales y las típicas formas histológicas de crestas epiteliales y papilas coriales (Figura 29E). En el caso de la muestra de tejido embrionario correspondiente a mucosa oral humana, se observaron de 2 a 3 capas epiteliales (Figura 29D).

Cuando se analizó el epitelio desarrollado en la superficie del sustituto de mucosa oral artificial, se observó que, a los 7 días de cultivo, se formó una única capa de células epiteliales confluentes sobre el sustituto estromal. Posteriormente, a los 14 días de cultivo, se formó un epitelio formado en su mayoría por 3 ó 4 capas de queratinocitos. Finalmente, cuando los sustitutos de mucosa oral se sometieron a la técnica aire-liquido, se apreció la generación de un epitelio plenamente estratificado, constituido por más de 10 capas de queratinocitos, número que resulta ser similar al epitelio oral normal (Figura 29).

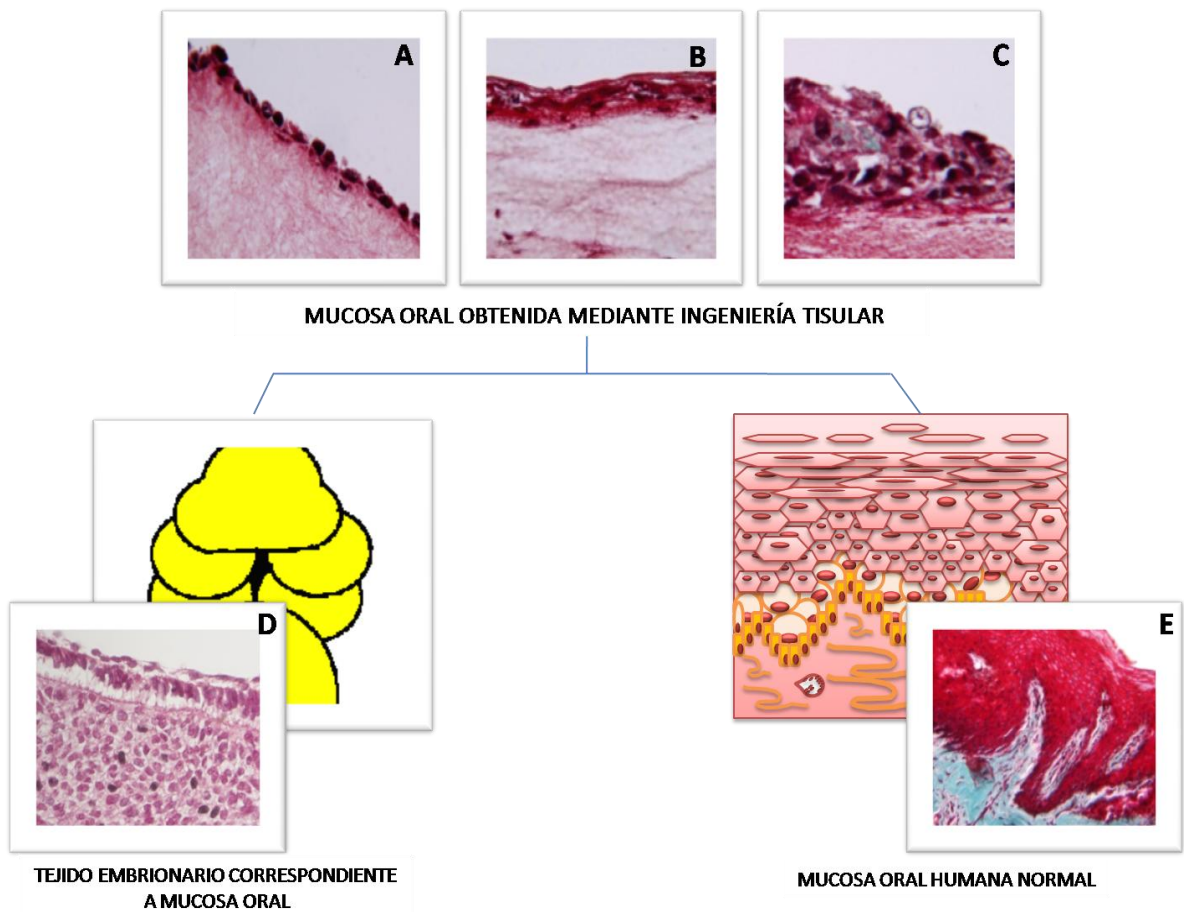


Figura 29. Evaluación microscópica de las muestras analizadas en este trabajo. **A:** Mucosa oral artificial de una capa 7 días. **B:** Mucosa oral artificial de dos capas 14 días. **C:** mucosa oral artificial multiestratificada 21 días. **D:** Tejido embrionario correspondiente a mucosa oral. **E:** Mucosa oral humana control.

Mediante microscopía electrónica de transmisión, se pudo evidenciar la formación de pequeñas microvellosidades de longitud variable en la superficie de los queratinocitos correspondientes a los tejidos artificiales mantenidos en cultivo durante una semana (Figura 30). Además, al final de la primera semana se pudo observar el desarrollo de una membrana basal incipiente constituida por una lámina lucida y una lámina densa, esta última, todavía incompleta (Figura 31). Durante la segunda y tercera semana, el epitelio comienza a estratificarse, mientras aparecen distintos tipos de sistemas de unión de naturaleza desmosómica así como interdigitaciones entre las células epiteliales (Figura 32).

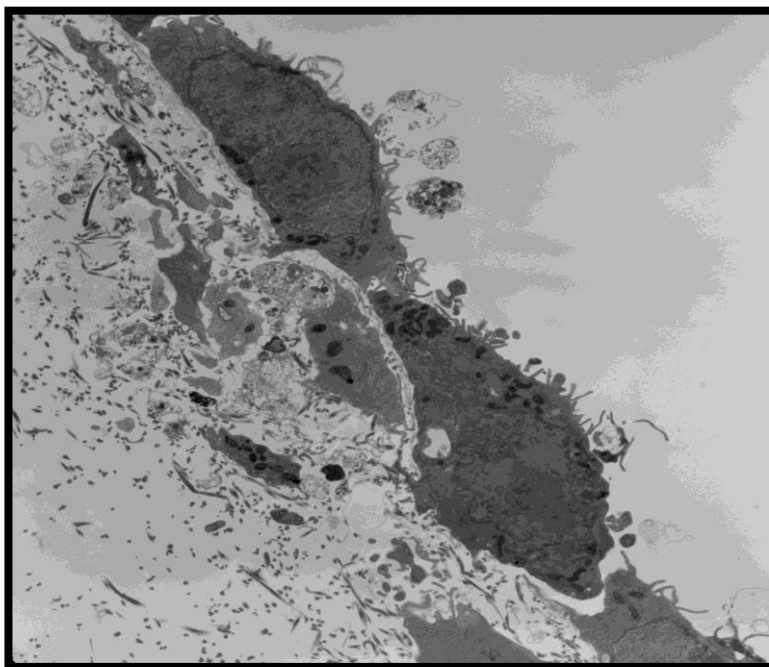


Figura 30. *Mucosa oral artificial mantenida en cultivo durante una semana. Se aprecian las microvellosidades en la superficie de los queratinocitos.*

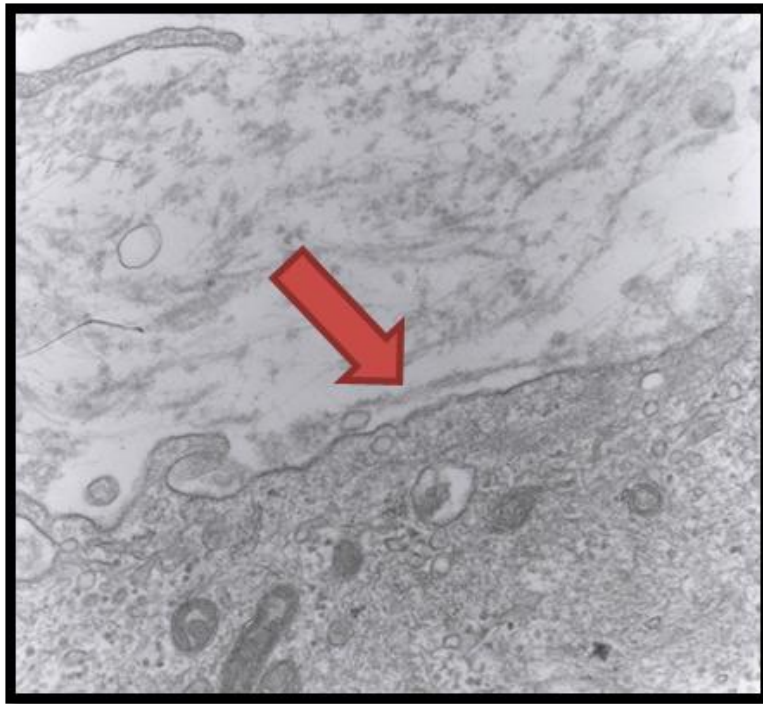


Figura 31. Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Mucosa Oral obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular y mantenida en cultivo durante una semana. Con una flecha se señala la membrana basal rudimentaria.

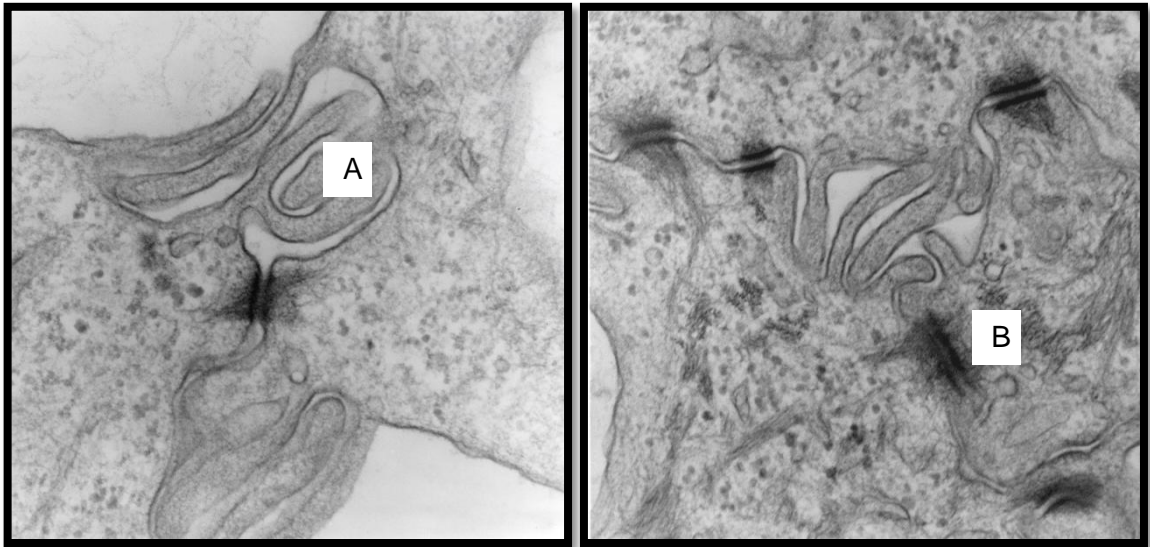


Figura 32. Uniones celulares de tipo interdigitaciones (A) y desmosomas(B).

Posteriormente, la membrana basal continúa desarrollándose y comienzan a aparecer elementos de anclaje en el estroma subyacente. Así mismo algunas organelas alcanzan un notable desarrollo, como por ejemplo ocurre con el aparato de Golgi.

Por otro lado, el análisis microscópico de los sustitutos del corion de la mucosa oral artificial mediante microscopía electrónica de transmisión mostró la presencia de fibroblastos inmersos en un retículo de fibrina. Los fibroblastos mostraron una ultraestructura típica, con un núcleo eucromatínico con un nucleolo bien constituido y la presencia de abundantes organelas de síntesis, especialmente retículo endoplasmático rugoso con ribosomas y numerosas mitocondrias (Figura 33).

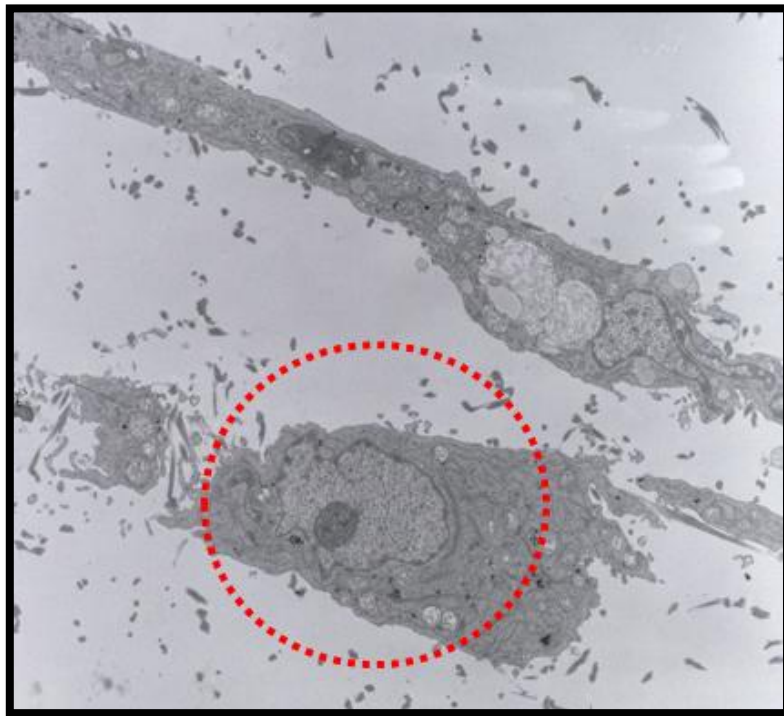


Figura 33. *Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Mucosa Oral obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular. A. Membrana Basal rudimentaria. B. Fibroblasto inmerso en la matriz de fibrina y agarosa.*

Con microscopía electrónica de barrido es posible observar que durante la primera semana las células epiteliales cubrían la mayoría de la superficie del estroma de fibrina y agarosa, dejando algunas zonas del estroma descubiertas de queratinocitos (Figura 34). El análisis de las muestras al séptimo día de maduración epitelial reveló total cobertura de la superficie estromal con queratinocitos

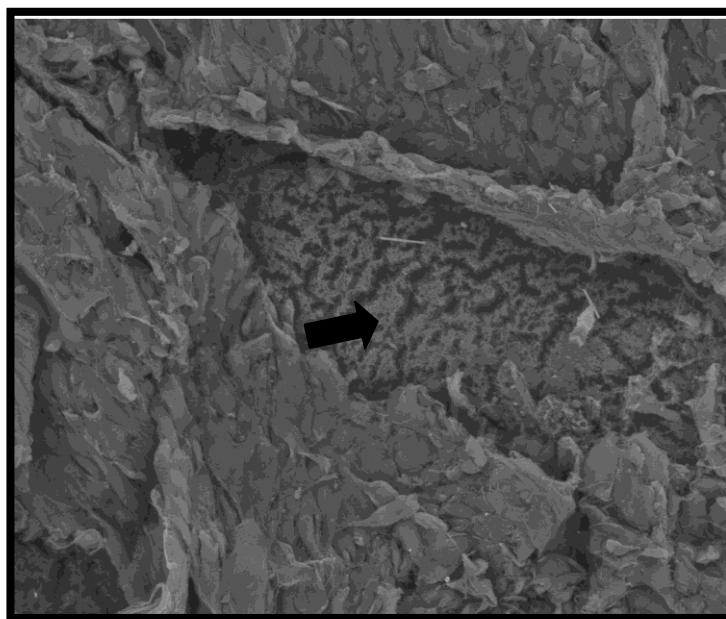


Figura 34. *Constructo de mucosa oral artificial correspondiente a la primera semana y observada al microscopio electrónico de barrido. Se señala con una flecha la zona del sustituto estromal que no ha quedado cubierta por queratinocitos.*

Por otro lado, el análisis mediante microscopía electrónica de barrido reveló que las células más superficiales presentaban expansiones periféricas hacia el exterior que se correspondían con microplicas (Figura 31 A).

Estos queratinocitos mantienen su morfología esferoidea y su superficie aparece recubierta con numerosas microvellosidades, representando por lo tanto un patrón de diferenciación queratinocítica tipo I.

En la segunda semana de maduración epitelial se observó la presencia de un epitelio con numerosas capas sobre la superficie del sustituto estromal. La superficie de algunas de las células epiteliales mostró *straight parallel rows* de micróplicas correspondientes al patrón II de diferenciación queratinocítica, las células restantes mostraron una superficie regular y micróplicas características del patrón de diferenciación tipo II.

Finalmente, en la tercera semana la superficie está constituida por células de morfología variable (esferoideas, poligonales o fusiformes), cuya superficie está recubierta fundamentalmente por micróplicas, configurando patrones de diferenciación tipos II y III. (Figura 35)

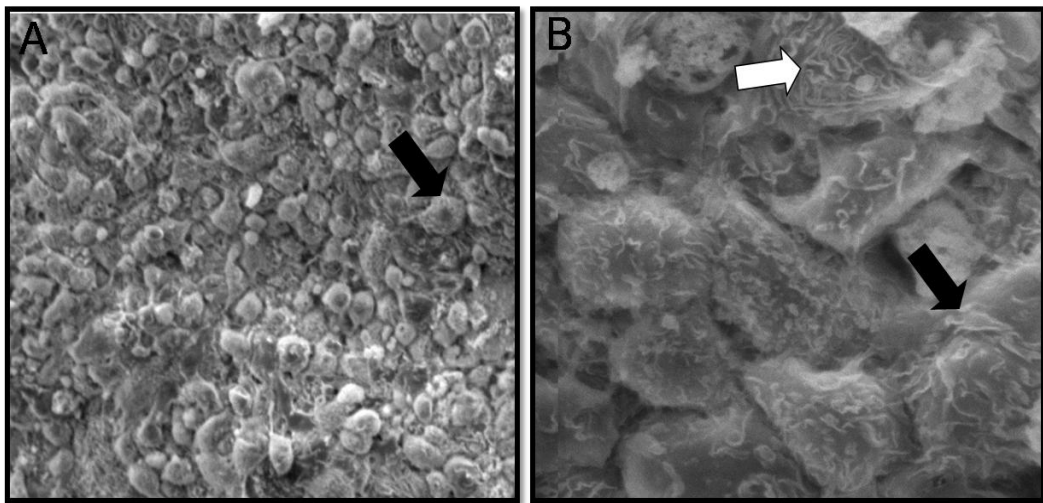


Figura 35. *Patrones de diferenciación tipo I microvilli muestras analizadas a séptimo día de cultivo A. Patrones de diferenciación tipo II analizados mediante microscopía electrónica de barrido en sustitutos de mucosa oral de 11 días de cultivo (flecha negra). Patrón de diferenciación tipo III microplicas de aspecto curvo (flecha blanca) B.*

4. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS DE SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL *IN VIVO*

La evaluación de la mucosa oral artificial mostró adecuada integración con el sitio receptor. El procedimiento quirúrgico fue bien tolerado por todos los animales sin apreciarse mortalidad intraoperatoria, hemorragias o rechazo.

El análisis histológico de la mucosa oral artificial implantada en el área interescapular de los animales en contacto directo con el aire mostró, en primer lugar, la presencia de un estroma artificial bien formado e integrado con numerosos vasos sanguíneos. En segundo lugar, la superficie de los sustitutos de mucosa oral estaba cubierta de un epitelio estratificado, compuesto de capa basal, estrato espinoso, granuloso y corneo con signos de queratinización en el estrato más superficial. Particularmente, la unión epitelio-estroma de las muestras de mucosa oral artificial implantadas en los ratones fue idéntica a la unión epitelio-estroma encontrada en la mucosa oral humana control. En los dos casos, el estroma emitió numerosas prolongaciones que penetraron dentro del epitelio, (*papilas coriales*) interdigitadas con las prolongaciones del epitelio (*crestas epiteliales*). Estas estructuras no se encontraron en las muestras de mucosa oral desarrolladas *in vitro* (Figura 36).

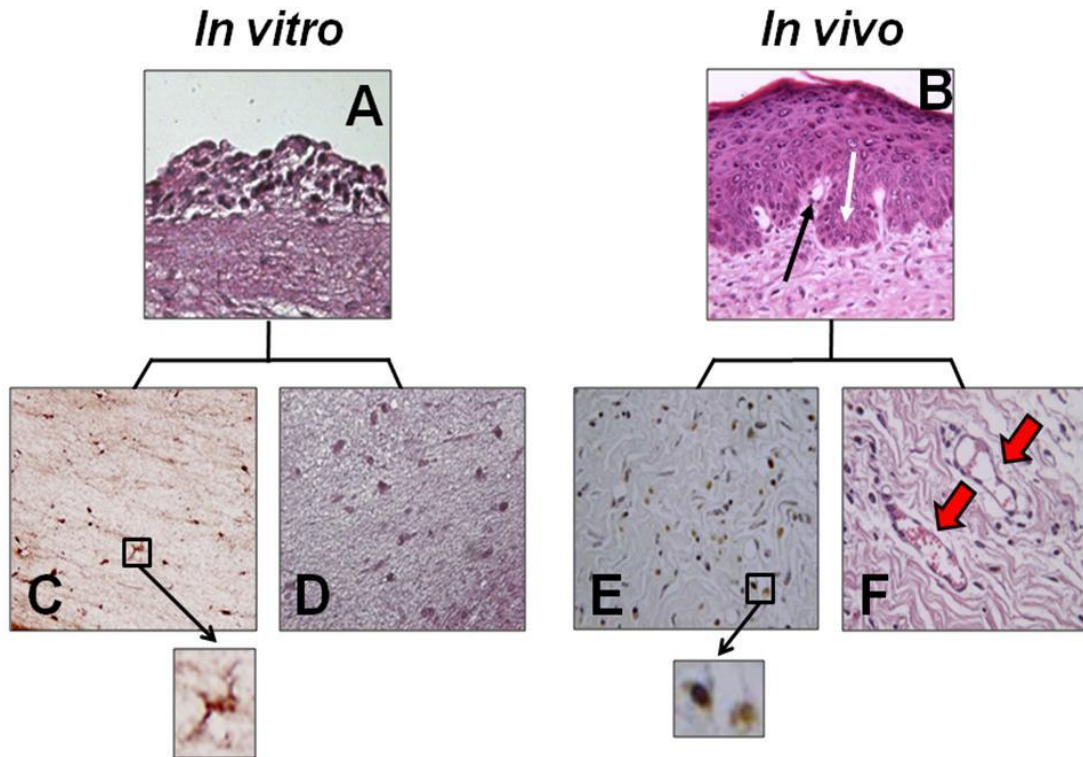


Figura 36. Análisis comparativo entre las muestras obtenidas *in vitro* de múltiples capas y las muestras implantadas *in vivo*. A: Tinción hematoxilina-Eosina (H&E) de las muestras desarrolladas mediante ingeniería tisular que muestran un epitelio estratificado (maduro). B: Tejidos evaluados *in vivo* con presencia de papilas coriales (flecha negra) y crestas epiteliales (Flecha blanca). C: inmunohistoquímica del anticuerpo NuMA en muestras *in vitro* demostró la presencia de células estromales de origen humano y animal (E). D: muestra obtenida *in vitro* sin apariencia de neovascularización, algunos vasos sanguíneos (flechas rojas) observados en las muestras analizadas *in vivo*.

5. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS EN SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL DESARROLLADOS POR INGENIERÍA TISULAR.

Los resultados inmunohistoquímicos para cada grupo de citoqueratinas en los dos grupos control: Mucosa oral humana y tejido embrionario correspondiente a mucosa oral y la mucosa oral artificial obtenida mediante técnicas de Ingeniería son descritos detalladamente en la Tabla 2 y las figuras 37 y 38.

Nuestros resultados demuestran que la mucosa oral humana se caracteriza por una fuerte expresión de un amplio grupo de citoqueratinas, especialmente citoqueratina 4, 5, 10,13 y el complejo de citoqueratinas AE1/3 y pancitoqueratina. Por otra parte, el tejido embrionario correspondiente a mucosa oral mostró una fuerte expresión de citoqueratina 19, 8 y de los complejos AE1/3 y pancitoqueratina igual que en los controles de mucosa oral humana. Sorprendentemente, la mucosa oral obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular expresó diferentes tipos de citoqueratinas dependiendo de su estado de maduración. De acuerdo con esto, las muestras de mucosa oral inmadura correspondientes a la primera semana y en las cuales se observó una única capa epitelial no expresó ninguno de los tipos de citoqueratinas utilizadas en este estudio. Sin embargo, las muestras de mucosa oral humana artificial con dos capas epiteliales expresaron varios de los marcadores epiteliales, como es el caso de la citoqueratina 4,13, 19 y citoqueratina 5. No se observó la expresión de marcadores típicos de epitelio simple. Finalmente las muestra con múltiples capas de epitelio obtenidas mediante ingeniería Tisular usando la técnica de cultivo interfase aire-liquido expresó diferentes marcadores de epitelio simple y de epitelio estratificado, aunque no expreso el marcador de epitelio cornificado, citoqueratina 10.

	TEJIDOS EMBRIONARIOS DE MUCOSA ORAL	MUCOSA ORAL ARTIFICIAL MONOCAPA	MUCOSA ORAL ARTIFICIAL BICAPA	MUCOSA ORAL ARTIFICIAL ESTRATIFICADO	MUCOSA ORAL HUMANA CONTROL
CK 10	-	-	-	-	+ (S)
CK 13	-	-	++ (S)	+++ (S)	++ (S)
CK 19	+++	-	++ (S)	+++ (A)	-
CK 4	-	-	++ (S)	++ (S)	+ (S)
CK 5	-	-	+++ (S)	++ (A)	+++ (B)
CK 7	-	-	-	+	-
CK 8	++ (S)	-	-	+	-
PANCK	+++ (S)	-	++ (S)	++ (A)	++ (S)
AE1/AE3	+++ (A)	-	+++ (S)	+++ (S)	+++ (S)

Tabla 2. *Análisis inmunohistoquímico de muestras de tejido embrionario correspondiente a mucosa oral, mucosa oral artificial con 1, 2 y múltiples capas y mucosa oral humana utilizada como control. La expresión de cada citoqueratina se identificó: (-) negativa, levemente positiva (+), positiva (++) ,positiva intensa(+++). (S) Expresión restringida a la capa suprabasal; (B) expresión en la capa basal del epitelio;(A): Expresión de citoqueratinas en todas las capas epiteliales.*

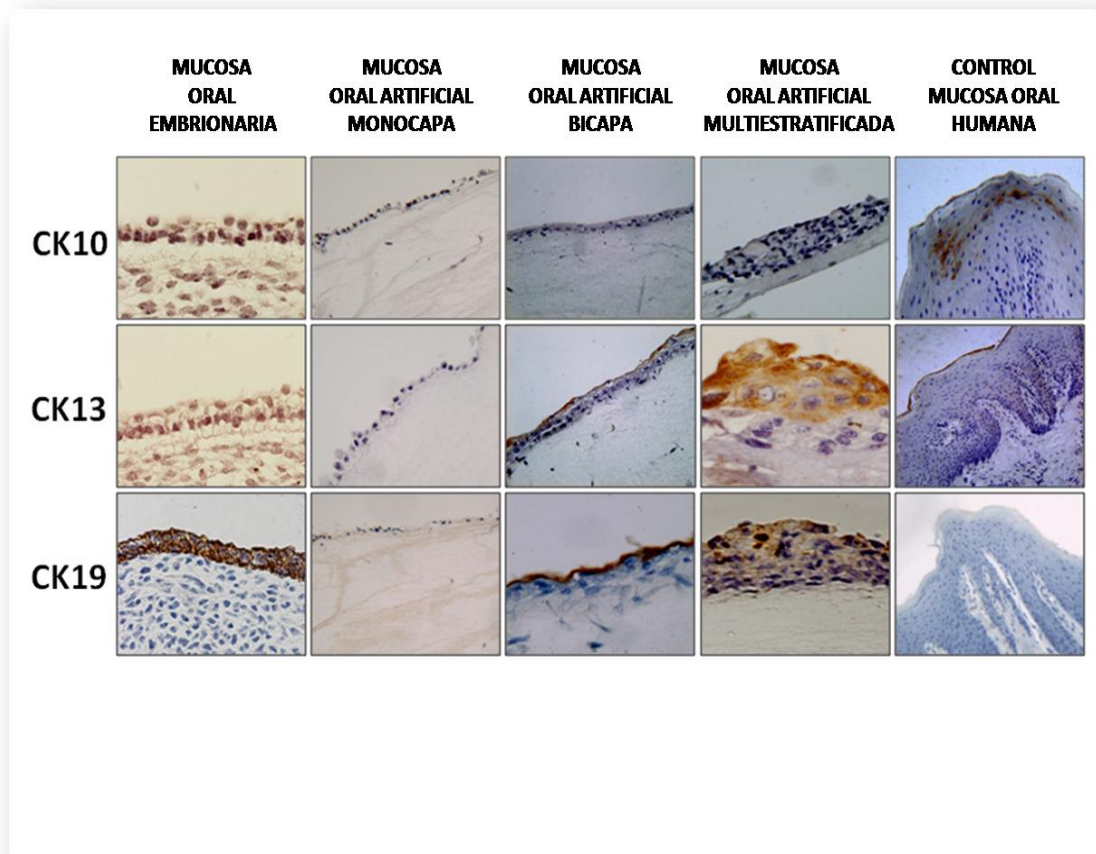


Figura 37. Análisis inmunohistoquímico de las citoqueratinas 10,13 y citoqueratina 19 en tejidos embrionarios humanos correspondientes a mucosa oral, mucosa oral artificial y mucosa oral humana control.

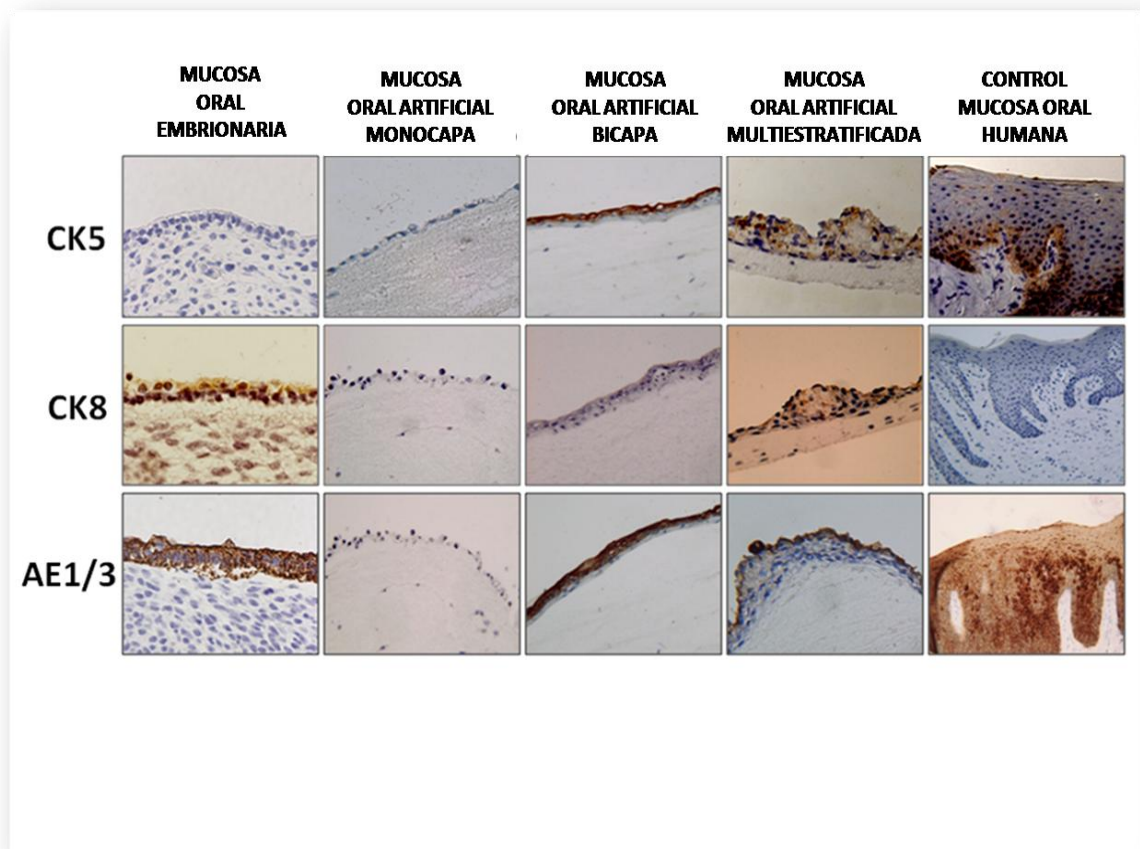


Figura 38. Análisis inmunohistoquímico de las citoqueratinas 5,8 y citoqueratina AE1/AE3 en tejidos embrionarios humanos correspondientes a mucosa oral, mucosa oral artificial y mucosa oral humana control.

6. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS Y PROTEÍNA DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) EN SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL IMPLANTADOS EN RATONES ATÍMICOS

En primer lugar, como se muestra en la tabla 3 y figuras 39 y 40, el análisis de la expresión de citoqueratinas en los 3 tipos de muestras analizadas (muestras de mucosa oral Humana control, muestras con múltiples capas epiteliales desarrolladas *in vitro*, muestras implantadas en ratones atímicos *in vivo*) mostraron expresión positiva para los complejos de citoqueratinas (pancitoqueratina y AE1/AE3)

En el caso de pancitoqueratina (complejo de citoqueratinas 5, 6, 8, 18, 10,1) la expresión fue intensa en la capa suprabasal de las muestras control de mucosa oral normal. Por otra parte, como nombramos anteriormente la expresión de pancitoqueratina fue homogénea en todas las capas epiteliales de los sustitutos de mucosa oral obtenidos en el laboratorio (*in vitro*). Los sustitutos de mucosa oral implantados sobre los ratones atímicos (*in vivo*) mostraron alta expresión del complejo pancitoqueratina en las capas suprabasales del epitelio al igual que la expresión observada en las muestras control.

La evaluación del complejo AE1/AE3 (compuesto de citoqueratinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 15 y 16) mostró expresión positiva en los controles de mucosa oral normal. Sin embargo, las muestras de mucosa oral con múltiples capas de epitelio obtenidas mediante ingeniería tisular (*in vitro*) presentaron expresión positiva únicamente en la capa suprabasal y negativa en la capa basal. De otro modo, la expresión de AE1/AE3 en los sustitutos de mucosa oral implantado sobre ratones atímicos (*in vivo*) mostró expresión positiva en todas las capas del epitelio, con mayor intensidad en las capas más superficiales.

De la misma forma, la inmunohistoquímica para marcadores de epitelio simple (citoqueratinas 7, 8 y 18), fue negativa en los controles de mucosa oral normal. Sin embargo, las muestras de sustitutos de mucosa oral humana generados *in vitro* mostraron expresión positiva de citoqueratinas 7, 8 y 18 en todas las capas del epitelio incluso en la muestra de 21 días que presentaba un epitelio bien diferenciado. Finalmente, las muestras implantadas *in vivo* en los ratones atímicos fueron negativas para estos marcadores de epitelio simple, al igual que en las muestras control.

Otros marcadores de epitelio queratinizado y epitelio paraqueratinizado, como la citoqueratina 4 y la citoqueratina 13, mostraron una elevada expresión en las capas suprabasales y expresión negativa en las capas basales de las muestras control de mucosa oral. De la misma forma, los sustitutos *in vitro* de mucosa oral mostraron expresión de citoqueratina 4 y 13, aunque la expresión de citoqueratina 4 fue homogénea en todas las capas epiteliales. Por otra parte, cuando las muestras de mucosa oral artificial fueron implantadas *in vivo* en los ratones, la expresión de ambas citoqueratinas, (citoqueratina 4 y 13) fue exclusiva de las capas suprabasales.

La inmunohistoquímica para citoqueratina 19 mostró expresión negativa en los controles de mucosa oral normal. Aunque *in vitro* los sustitutos de mucosa oral fueron positivos para este marcador, la expresión de citoqueratina 19 fue negativa en las muestras evaluadas *in vivo*. Uno de los marcadores de queratinización más destacados es la citoqueratina 10. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión de citoqueratina 10 fue positiva en la capa suprabasal de las muestras control de mucosa oral y en las muestras de mucosa oral artificial implantadas *in vivo* en los ratones atímicos. Sin embargo, las muestras de mucosa oral artificial obtenidas *in vitro* en el laboratorio no expresaron este marcador de queratinización.

Finalmente, determinamos la presencia de células con potencial proliferativo de la capa basal en el epitelio de las muestras de mucosa oral mediante técnicas inmuno- histoquímicas para PCNA (*proliferating cell antigen*) y citoqueratina 5. Teniendo en cuenta esto, los resultados de los controles de mucosa oral humana mostraron una fuerte expresión de PCNA, especialmente en las capas basales del epitelio estratificado. Por otra parte, los tejidos obtenidos *in vitro* mediante ingeniería tisular mostraron expresión homogénea de PCNA en todas las capas del epitelio artificial. Una vez los sustitutos de mucosa oral fueron implantados *in vivo* en animales de laboratorio, la distribución de las células con expresión de PCNA fue similar a la observada en las muestras de mucosa oral control, con fuerte expresión en las capas basales del epitelio. La expresión de citoqueratina 5, un marcador basal importante de epitelios estratificados, fue homogénea en la capa basal de los controles. Sin embargo la expresión *in vitro* de citoqueratina 5 fue específica de las capas suprabasales de los epitelios estratificados mantenidos *in vitro*. Siendo negativa en la capa basal. Finalmente la expresión *in vivo* de citoqueratina 5 fue similar al control de mucosa oral normal, con una fuerte señal positiva en la capa basal.

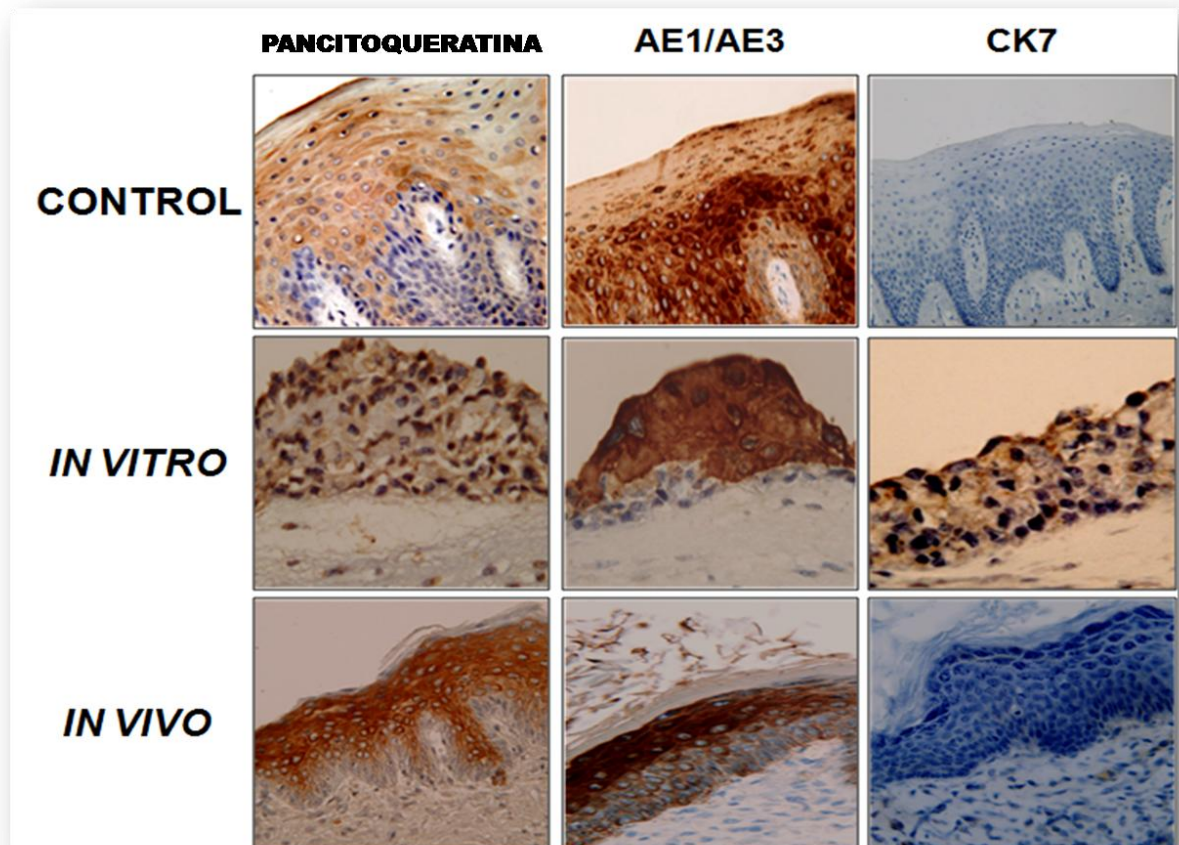


Figura 39. Fotografías correspondientes al análisis inmunohistoquímica de los tres tipos de muestras analizadas en este trabajo para los marcadores epiteliales pancitoqueratina, AE1/AE3 y citoqueratina 7. **CONTROL:** Muestras de mucosa oral normal. **IN VITRO:** Mucosa oral obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular. **IN VIVO:** Mucosa oral artificial implantada en ratones atímicos.

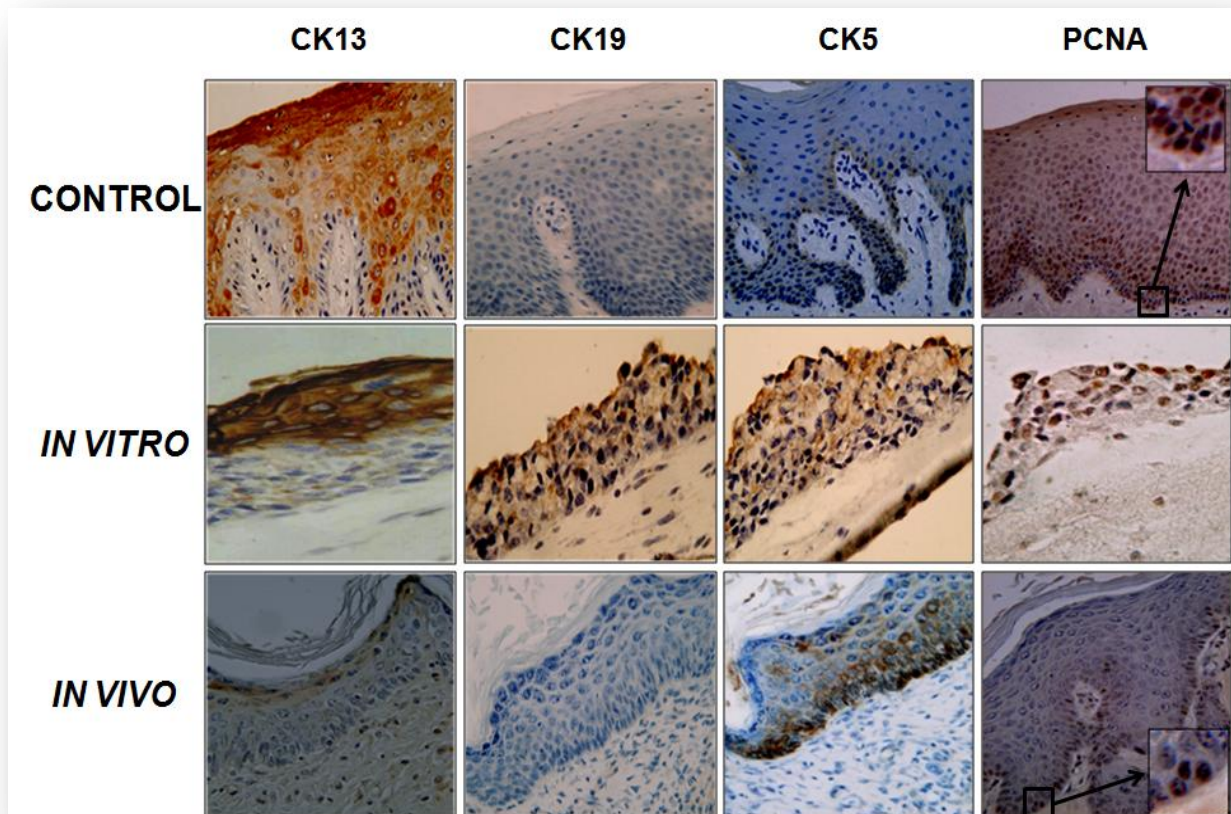


Figura 40. Fotografías correspondientes al análisis inmunohistoquímica de los tres tipos de muestras analizadas en este trabajo citoqueratina 13, 19, 5 y PCNA. **CONTROL:** Muestras de mucosa oral normal. **IN VITRO:** Mucosa oral obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular. **IN VIVO:** Mucosa oral artificial implantada en ratones atímicos.

	Pancitoqueratina	AE1/ AE3	CK7	CK8	CK 18	CK19	CK 4	CK13	CK5	CK10
CONTROL	+ (S)	+ (A)	-	-	-	-	+ (S)	+ (S)	+ (B)	+ (S)
IN VITRO	+ (A)	+ (S)	+ (A)	+ (A)	+ (A)	+ (A)	+ (A)	+ (S)	+ (A)	-
IN VIVO	+ (S)	+ (A)	-	-	-	-	+ (S)	+ (S)	+ (B)	+ (S)

Tabla 3. Expresión de citoqueratinas en los tres grupos analizados en este trabajo. **CONTROL:** Mucosa Oral Humana normal. **IN VITRO:** Sustitutos de Mucosa oral desarrollados in Vitro mediante técnicas de Ingeniería Tisular. **IN VIVO:** Mucosa oral artificial implantada in vivo en ratones atímicos. Pancitoqueratina complejo de CK 5, 6, 8, 18, 10, 1. AE1/AE3 complejo de CKs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 15 and 16. (S) Expresión restringida a la capa suprabasal; (B) expresión en la capa basal del epitelio; (A): Expresión de citoqueratinas en todas las capas epiteliales. (-): No se identifica, expresión de citoqueratina.

7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MUCOSA ORAL OBTENIDA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

El análisis de expresión génica correspondiente a diversas citoqueratinas, así como a la proteína de proliferación celular PCNA demostró que el patrón de expresión de citoqueratinas fue diferente en los controles de mucosa oral normal y los sustitutos de mucosa oral humana generados en el laboratorio. En concreto, la mucosa oral desarrollada mediante Ingeniería Tisular *in vitro* mostró una sobreexpresión significativa del gen de citoqueratina 7. Por otra parte, las muestras de mucosa oral control sobreexpresaron significativamente los genes de citoqueratina 1, 2A, 2B, 3, 4, 5, 6A, 6B, 10, 13, 14, 15, 16 y 24. las diferencias no fueron significativas para los genes de citoqueratina 1B, 6IRS, 6L, 8, 9, 12, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25A y 25C (Tabla 4).

ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EPITELIAL EN MUCOSA ORAL
CONSTRUIDA POR INGENIERÍA TISULAR

Gen ID	Media controles	Media constructos	FC	Valor p	Sobreexpresado en	Nombre del gen	Símbolo del gen
205900_at	7996.33	15.87	503.97	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 1	KRT1
237120_at	11.93	23.80	0.50	N.S.	-	Citoqueratina 1B	KRT1B
207908_at	155.30	4.97	31.27	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 2A	KRT2A
207878_at	9512.77	12.23	777.61	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 2B	KRT2B
217325_at	154.93	4.43	34.95	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 3	KRT3
213240_s_at	7268.27	240.33	30.24	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 4	KRT4
201820_at	10924.93	3073.83	3.55	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 5	KRT5
214580_x_at / 209125_at	12825.47	3619.57	3.54	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 6A	KRT6A
213680_at	12302.12	3587.22	3.43	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 6B	KRT6B
231461_at	5.97	3.17	1.88	N.S.	-	Citoqueratina 6 irs	KRT6IRS
1569909_at	18.07	22.27	0.81	N.S.	-	Citoqueratina 6L	KRT6L
1558393_at / 1558394_s_at / 209016_s_at / 214031_s_at	27.99	461.98	0.06	p<0.01	ARTIFICIAL	Citoqueratina 7	KRT7
209008_x_at / 214399_s_at / 216821_at	130.26	69.53	1.87	N.S.	-	Citoqueratina 8	KRT8
208188_at	36.43	26.23	1.39	N.S.	-	Citoqueratina 9	KRT9
207023_x_at / 210633_x_at / 213287_s_at	7105.51	992.69	7.16	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 10	KRT10
207811_at	4.10	1.37	3.00	N.S.	-	Citoqueratina 12	KRT12
207935_s_at	14316.13	1107.97	12.92	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 13	KRT13
209351_at	13332.67	5950.00	2.24	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 14	KRT14
204734_at	3801.43	1379.70	2.76	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 15	KRT15
209800_at	11024.63	2750.70	4.01	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 16	KRT16
205157_s_at / 212236_x_at / 228491_at	3805.78	3372.19	1.13	N.S.	-	Citoqueratina 17	KRT17
201596_x_at	631.67	491.23	1.29	N.S.	-	Citoqueratina 18	KRT18
201650_at	1857.37	1913.20	0.97	N.S.	-	Citoqueratina 19	KRT19
213953_at	9.80	14.80	0.66	N.S.	-	Citoqueratina 20	KRT20
218963_s_at	364.33	1345.23	0.27	N.S.	-	Citoqueratina 23	KRT23
220267_at	981.43	11.83	82.94	p<0.01	CONTROLES	Citoqueratina 24	KRT24
237905_at	19.90	14.83	1.34	N.S.	-	Citoqueratina 25A	KRT25A
240388_at	10.47	17.53	0.60	p<0.01	-	Citoqueratina 25C	KRT25C

Tabla 4. Análisis de la expresión génica mediante microarrays en muestras de mucosa oral normal y muestras de mucosa oral desarrollada in vitro para la identificación de genes de citoqueratinas. **Gen ID:** Referencia de cada gen (Affymetrix). **Media controles:** Media de expresión génica para las muestras de mucosa oral humana control analizadas en este trabajo. **Media constructos:** Media de expresión génica en las muestras de mucosa oral artificial. **FC:** Expresión relativa controles/constructos. **Valor p:** valor estadístico p para la comparación controles vs. constructos. **Sobreexpresado en:** tipo de muestra que mostró mayor expresión (controles o mucosa oral artificial). (-) indica que las diferencias no son estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La ingeniería tisular es una disciplina novedosa que permite desarrollar en el laboratorio diferentes tejidos artificiales. En la presente tesis doctoral se ha logrado optimizar protocolos para la generación de mucosa oral humana en el laboratorio, lo cual presenta una indudable utilidad clínica.

En primer lugar se ha conseguido cultivar en el laboratorio los dos tipos principales de células que constituyen la mucosa oral, los fibroblastos y los queratinocitos. Estos cultivos se establecieron a partir de pequeñas biopsias extraídas con anestesia local. Esta metodología es técnicamente sencilla y permite la obtención de un número muy elevado de células procedentes de un paciente, las cuales pueden ser utilizadas para diferentes ensayos de tipo farmacológico, genético y toxicológico, así como para la ingeniería tisular. En este contexto, nuestros cultivos de fibroblastos

una demostraron una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en medios de cultivo exentos de factores de crecimiento. Estos resultados coinciden con los datos publicados por otros investigadores (Orwin y Hubel, 2000; Teixeira *et al.*, 2004; Alaminos *et al.*, 2007; Sánchez- Quevedo *et al.*, 2007).

En segundo lugar, los cultivos de células epiteliales de la mucosa oral, en los que se utilizó la técnica basada en el cultivo de explantes de muestras de mucosa oral demostraron una elevada eficiencia a la hora de generar cultivos celulares confluentes (Rheinwald y Green, 1977; Germain *et al.*, 2000; Talbot *et al.*, 2006).

Una vez considerado el grado de proliferación de las células a utilizar en la construcción de nuestro modelo de mucosa oral artificial, se procedió a la construcción de dicha mucosa utilizando un soporte estromal compuesto por fibrina y agarosa. En relación con los soportes, diferentes autores han utilizado diversos materiales para la construcción de tejidos en el laboratorio, destacando los geles de quitosán, agarosa, colágeno y fibrina (Meana *et al.*, 1998; Schoop *et al.*,

1999; Bach *et al.*, 2001; Chinnathambi *et al.*, 2003; Llamas *et al.*, 2004; Llamas *et al.*, 2006; Isenberg *et al.*, 2006; Peretti *et al.*, 2006; Talbot *et al.*, 2006; Alaminos *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de estos soportes mostraron niveles muy bajos de resistencia mecánica. En esta tesis doctoral, hemos utilizado un soporte mixto compuesto por una mezcla de fibrina y de agarosa al 0.1 %, el cual nos permitió generar sustitutos dérmicos con elevados índices de consistencia. La utilización de fibrina tiene una ventaja adicional y es que, al proceder del plasma sanguíneo, incorpora numerosas citoquinas y factores de crecimiento que facilitan la generación de un excelente micromedioambiente que potencia la proliferación y el desarrollo de las células a utilizar en el constructo. En nuestro caso, el soporte de fibrina-agarosa permitió el desarrollo adecuado del epitelio oral desde un punto de vista histológico.

Por otro lado, en este trabajo utilizamos una técnica de cultivo secuencial sobre membrana porosa disponible comercialmente (Reichl y Müller-Goymann, 2003). Este sistema se utilizó por un doble motivo. En primer lugar, porque la membrana porosa permite el paso de nutrientes desde el medio de cultivo al tejido en construcción. En segundo lugar, porque el diseño de este dispositivo permite utilizar una técnica de cultivo aire-líquido, lo cual estimula la estratificación del epitelio localizado sobre el sustituto estromal. Diferentes autores han utilizado dispositivos con membranas porosas de distintas variedades en protocolos de Ingeniería Tisular para la construcción de diversos tejidos (Richard *et al.*, 1991; Geroski y Hadley, 1992; Casasco *et al.*, 2001; Limat *et al.*, 2003; Reichl *et al.*, 2004; Izumi *et al.*, 2003).

Después de seleccionar las células a utilizar, y una vez seleccionado el sustrato estromal más apropiado, es importante evaluar histológicamente el tejido artificial formado. Para ello, en este trabajo hemos estudiado nuestro material con microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Nuestros resultados revelan que, en general, la mucosa generada en el laboratorio por Ingeniería Tisular muestra gran similitud estructural y ultraestructural con la Mucosa Oral Humana nativa utilizada como control. Así, mediante microscopía óptica y con microscopía electrónica de transmisión, es posible observar la presencia de un epitelio simple en la primera semana de cultivo sobre el sustituto estromal.

Usando microscopía electrónica de barrido pone de relieve que dicho recubrimiento epitelial es incompleto, y que éste sólo se produce a partir de la segunda semana. Los datos microscópicos ponen asimismo de relieve que durante las dos primeras semanas las células, presentan un alto grado de indiferenciación, puesto que, tanto con microscopía electrónica de transmisión como con microscopía electrónica de barrido, no ofrecen características microscópicas de diferenciación queratinocítica, mostrando patrones de superficie tipo I. La existencia de microvellosidades y de un patrón superficial tipo I ha sido relacionado en los queratinocitos de la mucosa oral con un bajo grado de diferenciación (Moreu et al., 1993; Sánchez- Quevedo *et al.*, 1994; Dourov, 1984; Kullaa-Mikkonen, 1986; Kullaa-Mikkonen, 1987).

Los trabajos de Grossman y de Southgate (Grossman, 1989; Southgate *et al.*, 1987) demostraron que las células de los estratos más inferiores de los epitelios estratificados, así como los queratinocitos en cultivos primarios, presentaban microvellosidades en su superficie, esto es, un patrón tipo I como el que presentan las células que recubren nuestros constructos durante la primera semana. En el transcurso de la segunda y tercera semana, se desarrolla el proceso de

estratificación en el epitelio, comprobándose el progresivo incremento y maduración de los sistemas de unión y de las interdigitaciones que resultan ser semejantes a los de la mucosa oral nativa. Dichos sistemas de unión son fundamentalmente de tipo adherente, especialmente máculas adherentes o desmosomas. El número de estratos no alcanza, sin embargo, en la tercera semana el número de capas existente en la mucosa oral ortotípica del adulto, aunque el sistema de cohesión estructural sí está bien definido. Todo ello sugiere que el epitelio formado sobre las matrices de fibrina y agarosa es un epitelio inmaduro pero con un elevado grado de cohesión intercelular, por lo que su funcionamiento podría ser similar al de la mucosa oral (Capitán, 2006).

La maduración queratinocítica progresa asimismo de manera temporal. De este modo, cuando el epitelio de nuestros tejidos artificiales alcanza múltiples capas durante el proceso de maduración epitelial (epitelio estratificado), las células presentan patrones superficiales tipo III, esto es, patrones de superficie con microplacas que se corresponden con estratos más avanzados en el proceso de queratinización (Dourov, 1984; Kulla-Mikkonen, 1986; Gonzalez- Jaranay *et al.*, 1990; Moreu *et al.*, 1993; Sánchez- Quevedo *et al.*, 1994).

Por otro lado, en el estroma artificial se evidencia la actividad sintética de los fibroblastos a medida que progresa el desarrollo del constructo. Igualmente, las interrelaciones epitelio-estroma se van configurando a través de la membrana basal que ya en la tercera semana ofrece algunas fibras de anclaje, aunque no presenta todavía la configuración estructural completa de la membrana basal ortotípica de la mucosa oral (Ferraris y Campos, 2002).

El hallazgo de una membrana basal, aunque inmadura sugiere que el epitelio generado podría ser plenamente funcional, por lo que podría presentar gran utilidad clínica.

El resultado final del modelo, tras la evaluación microscópica, permite comprobar que la utilización de queratinocitos y fibroblastos obtenidos a partir de biopsias, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado correspondiente, y la utilización de un sustituto estromal de fibrina y agarosa, posibilita el desarrollo de una mucosa artificial constituida por un epitelio con un alto grado de diferenciación y por un estroma estructuralmente apto para satisfacer las propiedades mecánicas básicas que caracterizan a la mucosa oral.

Aunque la evaluación estructural y ultraestructural de nuestros tejidos nos permite predecir el posible comportamiento clínico de los mismos, en esta tesis doctoral así mismo la expresión de los principales marcadores de función queratinocítica en los constructos de Mucosa Oral Humana generados en el laboratorio *in vitro* comparándolos con los perfiles de expresión encontrados en las muestras de tejidos embrionarios de mucosa oral con los controles de mucosa oral humana.

De este modo, mediante el estudio de perfiles de expresión de citoqueratinas en mucosa oral obtenida mediante Ingeniería Tisular en diferentes estados de maduración pudimos establecer la relación entre los diferentes patrones de diferenciación morfológica encontrada en los tejidos y la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas relacionadas con el proceso de desarrollo. Esta información nos permitió comprender los procesos moleculares, genéticos y los demás mecanismos presentes durante el desarrollo de la mucosa oral humana (Arosarena, 2005).

De acuerdo con esto, los resultados de este trabajo revelaron que la expresión de citoqueratinas en la mucosa oral artificial y la mucosa oral embrionaria compartían ciertas similitudes. En primer lugar, la expresión de citoqueratina 8, marcador de epitelio simple, confirmó el estado de inmadurez de los tejidos embrionarios. La expresión de citoqueratina 8 ha sido identificada por algunos autores (Vaidya *et al.*,

2000) desde la semana 10 hasta la semana 24 de gestación, esta expresión se reduce gradualmente con el paso del tiempo hasta desaparecer completamente. La presencia de citoqueratina 7 y 8 en las muestras de mucosa oral artificial con múltiples capas epiteliales sugiere un estado de fase temprana dentro del proceso de desarrollo de los sustitutos de mucosa oral. Por otra parte, el epitelio de unión es considerado uno de los tejidos más indiferenciados de la cavidad oral habiéndose demostrado en este epitelio la coexpresión de algunas citoqueratinas típicas de epitelio simple (CK8 and 18) y de epitelio estratificado (CK5 and 13) (Dale *et al.*, 1990; Presland y Dale, 2000). Estos resultados demuestran la similitud en funcionalidad de la mucosa oral desarrollada *in vitro* con un epitelio de unión indiferenciado.

Unido a esto, recientes reportes científicos han determinado la expresión de citoqueratina 19, considerada un marcador de células madre (Michel *et al.*, 1996) en un grupo pequeño de células localizadas en la capa basal de la mucosa oral humana control (Izumi *et al.*, 2000). De acuerdo con esto, podemos deducir el alto potencial proliferativo de las células de la capa basal de la mucosa oral humana. Sin embargo, algunos autores (Moharamzadeh *et al.*, 2007) han descrito la expresión de citoqueratina 19 durante el proceso de embriogénesis. Este resultado puede apoyar la idea de que los tejidos mantenidos *in vitro* con un epitelio estratificado se encuentran en un estado de maduración intermedio.

La expresión de citoqueratina 19 está asociada a la presencia de otras proteínas específicas de tejidos inmaduros como The expression of CK19 is likely linked to the *scellin*, *involucrin*, *trichohyalin* y *kallikrein* as we previously published (Alaminos *et al.*, 2007).

Por otra parte, citoqueratina 5, un marcador basal típico de los tejidos descamativos incluido el epitelio de la mucosa oral humana (Shabana *et al.*, 1991) específico de

células madre ubicadas en la capa basal fue identificado en mucosa oral artificial con más de una capa de epitelio. por esta razón podemos reafirmar que la naturaleza inmadura y proliferativa de las células de la mucosa oral desarrollada *in vitro*, confirmando los datos obtenidos con la citoqueratina 19.

Sin embargo, la expresión negativa de citoqueratina 5 en las muestras de mucosa oral artificial con una capa sugiere que la síntesis de muchas proteínas podría requerir información especializada obtenida mediante las interacciones epitelio mesenquima a lo largo de los diferentes estados diferenciación (Lu *et al.*, 2005) posiblemente insuficientes en la primera semana de cultivo *in vitro*.

La expresión de citoqueratina 4 y 13, conocidos como marcadores de las capas suprabasales de epitelios maduros estratificados (Regauer *et al.*, 1985; Sivard *et al.*, 2003) fue positiva en las muestras de mucosa oral artificial con 2 capas de epitelio, en las muestras con múltiples capas y en el control de mucosa oral humana. Estos resultados indican la posibilidad que nuestros tejidos de mucosa oral artificial no son del todo inmaduros sino que podrían conservar un rasgo de diferenciación. Esto puede ser probable debido al origen adulto de las células utilizadas para realizar estos tejidos artificiales.

Finalmente, se ha demostrado que el complejo de citoqueratinas pancytokeratina y AE1/AE3 cumplen un rol básico y fundamental en el proceso de diferenciación de la mucosa oral, independiente de las condiciones a las que se sometan los tejidos desarrollados *in vitro*.

Nuestro modelo de mucosa oral artificial demostró que la expresión de ciertas citoqueratinas es dependiente del estado de diferenciación. Además, son reguladas durante el desarrollo (Vaidya *et al.*, 2000; Collin *et al.*, 1992) a través de los diferentes estados de desarrollo *in vitro*, mostrando algunas semejanzas con los tejidos embrionarios de mucosa oral y la mucosa oral control (Regauer *et al.*, 1985). De acuerdo con los perfiles de expresión de citoqueratinas, podemos decir que la mucosa oral artificial sigue determinados patrones de diferenciación *in vitro* similares a los patrones de desarrollo embrionario, exceptuando el carácter de madurez que se mantiene por la utilización de células adultas, especialmente demostrado con la expresión de citoqueratina 13 y 4.

En este estudio, aparte de demostrar el perfil de expresión de marcadores epiteliales en mucosa oral desarrollada *in vitro*, también hemos querido estudiar el comportamiento de estos tejidos artificiales *in vivo* y los posibles cambios que se pudieran observar a nivel histológico y a nivel de los patrones de expresión de proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) una vez implantados en ratones atímicos.

En relación con este objetivo, demostramos que los sustitutos de mucosa oral con fibrina y agarosa se integran adecuadamente en los tejidos receptores, y no producen ningún tipo de reacción adversa o respuesta inflamatoria.

Técnicas de Inmunohistoquímica desarrolladas para el anticuerpo NuMA, demostraron que un gran número de células de origen animal fueron capaces de migrar e invadir el estroma artificial compuesto de fibroblastos humanos. Estos hallazgos confirmaron la completa integración de las células estromales humanas con las células estromales del ratón dentro del sustituto de fibrina y agarosa.

Así, el perfil de expresión de citoqueratinas en la mucosa oral artificial mostró algunas diferencias entre las muestras control y las muestras desarrolladas *in vivo*. De acuerdo con los resultados, el perfil de expresión de citoqueratinas fue similar para los diferentes grupos de muestras analizados en este estudio (mucosa oral humana control, mucosa oral desarrollada *in vitro* y mucosa oral artificial implantada *in vivo*), aunque también se detectaron algunas diferencias.

En primer lugar la alta expresión de ciertas citoqueratinas en los tres grupos de estudio, entre ellas el complejo AE1/AE3, pancitoqueratina y citoqueratinas 4 y 13 confirma como lo explicamos anteriormente en el desarrollo *in vitro*, que la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas es fundamental para el desarrollo y la funcionalidad de los queratinocitos orales incluso después de la implantación de los tejidos. En segundo lugar, la mucosa oral desarrollada *in vitro* con numerosas capas de epitelio, expreso una gran cantidad de marcadores de epitelio simple mediante inmunohistoquímica (Citoqueratina 7, 8 y 18), y elevada expresión de Citoqueratina 7 en pruebas de microarray. Estos marcadores de epitelio simple no se expresaron en los controles de mucosa oral humana ni en los tejidos implantados *in vivo*.

La explicación de esto podría radicar en la capacidad de desarrollo del epitelio artificial para convertirse *in vivo* en un epitelio estratificado y con un nivel más alto de maduración. Además de esto, es posible que el epitelio en desarrollo sea influenciado por múltiples señales de tipo paracrino o interacciones intercelulares provenientes del tejido receptor que hacen que el perfil de inmadurez descrito en el proceso de desarrollo *in vitro* desaparezca completamente cuando se implantan los tejidos de mucosa oral.

La ausencia de expresión de citoqueratina 19 en los tejidos evaluados *in vivo* y las muestras de mucosa oral normal control confirma el ascenso del grado de

diferenciación de los tejidos desarrollados *in vitro* una vez se implantan con la adecuada vascularización y señalización. Por otro lado, la expresión de citoqueratina 1 y 10, importantes marcadores de queratinización (Hansson et al., 2001; Tomakidi *et al.*, 1998), en las muestras de mucosa oral implantadas en los ratones atímicos, fue comparable a la expresión existente en las muestras de mucosa oral control. Esto indica que la mucosa oral artificial puede reproducir las características funcionales del epitelio como barrera protectora que permite respuesta rápida a diferentes estímulos (Presland y Juveric).

El análisis de la expresión de otras proteínas como PCNA y citoqueratina 5 (marcadores basales) confirma que la mucosa oral obtenida mediante ingeniería tisular mantiene características altamente proliferativas lo cual sugiere que estos tejidos son plenamente viables y podrían utilizarse en protocolos de medicina regenerativa.

Según lo que acabamos de exponer, los perfiles de expresión de citoqueratinas encontrados en los tejidos artificiales mostraron gran correlación con las características estructurales de estos tejidos. De esta manera, los sustitutos evaluados *in vivo* mostraron una organización histológica específica a nivel de la unión epitelio- estroma, formándose, las estructuras histológicas denominadas *papilas coriales* y *crestas epiteliales* ausentes en los tejidos desarrollados *in vitro*. Dichas estructuras cumplen una función importante en el mantenimiento de los aportes de oxígeno y nutrientes del estroma hacia el epitelio (Tsukinoki *et al.*, 2007). El epitelio de las muestras control y de las muestras implantadas en los ratones atímicos se encuentra probablemente sometido a un ligero grado de hipoxia, teniendo en cuenta la naturaleza avascular del epitelio. Por esta razón, ambos tipos de muestras han desarrollado este tipo de estructuras a través de ínterdigitaciones del epitelio hacia el estroma que permiten la nutrición y la oxigenación del epitelio.

De esta manera, podemos deducir que las muestras desarrolladas en el laboratorio y sometidas a técnicas de cultivo en inmersión que permiten a las células epiteliales obtener oxígeno y nutrientes fácil y directamente del medio de cultivo, no necesitarían desarrollar estructuras como las *crestas epiteliales* y las *papilas coriales* no se desarrollan. Por el contrario, cuando estos tejidos se implantan *in vivo*, la hipoxia relativa del epitelio podría inducir la formación de las *crestas epiteliales* y *papilas coriales*.

En resumen, en esta tesis doctoral hemos realizado un estudio profundo de la mucosa oral artificial generada mediante Ingeniería Tisular. Desde de la selección de las células a utilizar para su fabricación, pasando por numerosos análisis de su comportamiento *in vitro*, hasta un control de calidad de los tejidos implantados en ratones atímicos. Para ello, fue necesario utilizar diversas técnicas microscópicas, inmunistoquímicas y genéticas que nos permitieron evaluar factores tan importantes como la viabilidad celular, proliferación celular, la existencia de patrones morfológicos de diferenciación, la expresión de citoqueratinas, la angiogénesis y la integración con tejidos del organismo receptor.

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que la mucosa oral artificial obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular presenta numerosas similitudes, en el epitelio y en el estroma, con la mucosa oral humana normal, especialmente cuando está implantada *in vivo*. Las diferentes pruebas realizadas demuestran la progresiva formación y maduración del epitelio, uniones celulares, membrana basal y matriz extracelular en los sustitutos de mucosa oral artificial obtenidos en el laboratorio.

Por todo ello, consideramos que nuestro modelo de mucosa oral artificial humana fabricado a partir de fibrina y agarosa podría ser útil en el tratamiento de diferentes patologías que afectan la mucosa oral. Estudios posteriores a realizar en el contexto de un ensayo clínico determinarán la utilidad de estos tejidos en la clínica 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 el aislamiento de células madre epiteliales de estirpe queratinocítica y estromales de estirpe fibroblástica a partir de biopsias de mucosa oral humana, y su posterior utilización para la elaboración de constructos de mucosa oral artificial.
2. La asociación de biomateriales constituidos por fibrina y agarosa y de poblaciones celulares de estirpe queratinocítica y fibroblástica procedentes de biopsias permite la elaboración de un sustituto de mucosa oral artificial humana similar a la mucosa oral ortotópica.
3. La evaluación *in vitro* de la mucosa oral artificial humana elaborada de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral pone de relieve la existencia de una población epitelial que evoluciona desde un epitelio simple a un epitelio estratificado con sistemas de unión bien desarrollados de naturaleza fundamentalmente desmosómica, y con patrones superficiales que evolucionan desde marcadores inmaduros de tipo microvellositario en el epitelio simple hasta marcadores de diferenciación intermedia tipo microplicas curvas en el epitelio estratificado.
4. La evaluación *in vitro* de la mucosa oral artificial humana elaborada de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral pone de relieve, en la población epitelial queratinocítica, la existencia de un patrón de expresión de citoqueratinas, identificado mediante técnicas inmunohistoquímicas, que sólo está presente cuando el epitelio está estratificado y que se caracteriza por la ausencia de citoqueratinas

vinculadas a la diferenciación queratinocítica y la presencia de citoqueratinas vinculadas a la inmadurez epitelial. Dicha expresión es compatible con el perfil de expresión génico puesto de relieve mediante microarray.

5. La evaluación *in vivo* de la mucosa oral artificial humana elaborada de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral pone de relieve una correcta integración de la mucosa oral artificial en el organismo del huésped. El epitelio de la mucosa oral artificial alcanza el nivel de estratificación y diferenciación que caracteriza al epitelio de la mucosa oral humana ortotípica. El corion presenta neovascularización, infiltrado celular procedente del huésped e incremento de las fibras de colágeno.
6. La evaluación *in vivo* de la mucosa oral artificial humana elaborada de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral pone de relieve, en la población epitelial queratinocítica, la existencia de un patrón de expresión de citoqueratinas, identificado mediante técnicas inmunohistoquímicas, que se caracteriza por la ausencia de citoqueratinas vinculadas a la inmadurez epitelial y la presencia de citoqueratinas vinculadas a la formación de un estrato córneo.

BIBLIOGRAFÍA

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.

Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:233-241.

Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, Bittner KM, Stark GB. Fibrin glue as matrix for cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng.* 2001 Feb;7(1):45-53.

Bannasch H, Föhn M, Unterberg T, Bach AD, Weyand B, Stark GB. Skin tissue engineering. *Clin Plast Surg.* 2003 Oct;30(4):573-9. Review

Butler CE. Skin grafts used in combination with free flaps for intraoral oncological reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2001 Sep; 47(3):293-8.

Campos A. Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de ingreso. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid. 2004.

Capitán LM. Caracterización Histológica de mucosa de espesor completo obtenida mediante Ingeniería Tisular (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, 2006.

Casasco A, Casasco M, Zerbinati N, Icaro Cornaglia A, Calligaro A. Cell proliferation and differentiation in a model of human skin equivalent. *Anat Rec.* 2001 Nov 1;264(3):261-72.

Chinnathambi S, Tomanek-Chalkley A, Ludwig N, King E, DeWaard R, Johnson G, Wertz PW, Bickenbach JR. Recapitulation of oral mucosal tissues in long-term organotypic culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003 Feb;270(2):162-74.

Clark R, Singer AJ. Wound repair: basic biology to tisular engineering. En: Lanza RP, Langer, Vacanti J. Principles of tisular engineering 2nd edition Ed. US. Elsevier. California 2000.p. 857-78.

Collin C, Moll R, Kubicka S, Ouhayoun JP, Franke WW. Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. *Exp Cell Res* 1992;202:132-141.

Costea DE, Loro LL, Dimba EA, Vintermyr OK, Johannessen AC. Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium. *J Invest Dermatol.* 2003 Dec;121(6):1479-86.

Dale BA, Salonen J, Jones AH. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1990;1(3):167-90. Review.

De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Gómez S y Gómez J. Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro. *Actas Urol Esp* 2004; 28: 714-731.

Dourov N. Scanning electron microscopy contribution in oral pathology. *Scan Electron Microsc.* 1984;(Pt 1):243-8.

Eichner R, Bonitz P, Sun TT. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol* 1984;98:1388-1396.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819): 154–156.

Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15;253(2):454-62.

Ferraris ME, Campos A. *Histología y Embriología Bucodental.* Ed. Panamericana. Madrid. 2002.

Franke WW, Schiller DL, Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht I, Denk H, Krepler R, Platzer B. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol.* 1981 Dec 25;153(4):933-59.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974; 17(4): 331–340.

Fuchs EV, Coppock SM, Green H, Cleveland DW. Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance. *Cell* 1981;27:75-84.

Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guérin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res.* 2000 Sep;19(5):497-527. Review.

Geroski DH, Hadley A. Characterization of corneal endothelium cell cultured on microporous membrane filters. *Curr Eye Res.* 1992 Jan;11(1):61-72.

Gonzalez-Jaranay M, Fernandez Segura E, Moreu G, Campos A. Gingival epithelium overgrowth in renal transplant. *Electron microscopy* 1990; 3.336-37.

Grossman ES. Primary fixation of vervet monkey oral epithelium for ultrastructural investigation--SEM. *J Oral Pathol Med.* 1989 Apr;18(4):220-3.

Hansson A, Bloor BK, Haig Y, Morgan PR, Ekstrand J, Grafström RC. Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. *Oral Oncol.* 2001 Jul;37(5):419-30.

Heid HW, Moll I, Franke WW. Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). *Differentiation* 1988;37:215-230.

Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006 Oct 22;3(10):589-601. Review.

Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng*. 2006 Jun;34(6):971-85. Epub 2006 May 24.

Izumi K, Feinberg SE, Terashi H, Marcelo CL. Evaluation of transplanted tissue-engineered oral mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice. *Tissue Eng*. 2003 Feb;9(1):163-74.

Izumi K, Song J, Feinberg SE. Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side. *Cells Tissues Organs*. 2004;176(1-3):134-52.

Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res* 2000;79:798-805.

Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9 (10): 642–647.

Knight MA, Evans GR. Tissue engineering: progress and challenges. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Aug;114(2):26E-37E.

Kullaa-Mikkonen A. Scanning electron microscopic study of surface of human oral mucosa. *Scand J Dent Res*. 1986 Feb;94(1):50-6.

Kullaa-Mikkonen A. Scanning electron microscopy in oral mucosal research: a review. *Scanning Microsc*. 1987 Sep;1(3):1145-55. Review.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. Review.

Lauer G, Schimming R, Gellrich NC, Schmelzeisen R. Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient sites. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Nov;108(6):1564-72; discussion 1573-5.

Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Jul;65(1):1-8. Epub 2004 Feb 20. Review.

Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Feb;48(2):207-14.

Llames S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*. 2006;7(1):47-53.

Llames SG, Del Rio M, Larcher F, Garcia E, Garcia M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguin P, and Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004 Feb 15;77(3):350-5.

Lu H, Hesse M, Peters B, Magin TM. Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol* 2005;84:709-718.

Luitaud C, Laflamme C, Semlali A, Saidi S, Grenier G, Zakrzewski A, Rouabhia M. Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Nov;83(2):554-61.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78 (2): 7634–7638.

Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*. 1991; 353 (6346): 750–752.

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.

Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 5):1017-1028.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(10): 5807–5812.

Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res*. 2007 Feb;86(2):115-24. Review.

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. Review.

Moll R. [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors]. *Veroff Pathol* 1993;142:1-197

Montalvo A. Evaluación genética y microanalítica de las células madre de la gelatina de wharton para su utilización en Ingeniería Tisular (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, 2008.

Moreu G, Sánchez-Quevedo MC, López-Escámez JA, González-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. *Histol Histopathol*. 1993 Jan;8(1):47-50.

Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 2000 Aug;6(4):307-19.

Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, D'Archivio D, Lisanti L, Di Luccio A, Perinetti G. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *J Periodontol.* 2002 Nov;73(11):1299-307.

Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng.* 2006 May;12(5):1151-68. Review.

Petruzzelli GJ, Johnson JT, Myers EN, Kline JM. Histomorphometric analysis of intraoral split-thickness skin grafts. *Head Neck.* 1992 Mar-Apr;14(2):119-24.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411): 143–147.

Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(4):383-408. Review.

Presland RB, Jurevic RJ. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ.* Apr;66(4):564-74

Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, Achtstatter T, Moll R, Jorcano JL, et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* 1985;455:282-306.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19: 1–22.

Regauer S, Franke WW, Virtanen I. Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. *J Cell Biol* 1985;100:997-1009.

Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol.* 2004 Apr;88(4):560-5.

Reichl S, Müller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm.* 2003 Jan 2;250(1):191-201.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963 Apr;17:208-12.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* 1992; 359(6395): 550–551.

Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature.* 1977 Feb 3;265(5593):421-4.

Richard NR, Anderson JA, Weiss JL, Binder PS. Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr Eye Res.* 1991 Aug;10(8):739-49.

Rojas M, Martínez García F, Cobo P, Palacios J, Nistal M, Regadera J. keratinas: Biología celular y significado funcional normal y patológico. *Revista chilena de anatomía*. 1998 ;16(1).

Rosenthal E, Carroll W, Dobbs M, Scott Magnuson J, Wax M, Peters G. Simplifying head and neck microvascular reconstruction. *Head Neck*. 2004 Nov;26(11):930-6

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.

Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, Campos A, García JM, González- Jaranay M. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium. *Histol Histopathol*. 1994 Jan;9(1):149-53.

Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1999 Mar;112(3):343-53.

Shabana AH, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Cytokeratin patterns of human oral mucosae in histiotypic culture. *Arch Oral Biol* 1991;36:747-758.

Shah JP, Patel SG. Cirugía Reconstructora. En: Shah JP, Patel SG, eds. Cirugía y Oncología de Cabeza y Cuello 3a edición. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 589-631.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13726–13731.

Sivard P, Dezutter-Dambuyant C, Kanitakis J, Mosnier JF, Hamzeh H, Bechetoille N, et al. In vitro reconstructed mucosa-integrating Langerhans' cells. *Exp Dermatol* 2003;12:346-355.

Southgate J, Williams HK, Trejdosiewicz LK, Hodges GM. Primary culture of human oral epithelial cells. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Invest*. 1987 Feb;56(2):211-23.

Sun TT, Doran TI, Vidrich A. The use of antikeratin antibodies for the identification of cultured epithelial cells. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1980;16:183-196.

Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis*. 2006 Feb 1;12:65-75.

Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis*. 2006 Feb 1;12:65-75.

Teixeira AI, Nealey PF, Murphy CJ. Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Dec 1;71(3):369-76.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282(5391): 1145–1147.

Tomakidi P, Breikreutz D, Fusenig NE, Zöller J, Kohl A, Komposch G. Establishment of oral mucosa phenotype in vitro in correlation to epithelial anchorage. *Cell Tissue Res*. 1998 May;292(2):355-66.

Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008; 26(3); 591–599.

Tseng SC, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TT. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell* 1982;30:361-372.

Tsukinoki K, Miyoshi Y, Aoki T, Karakida K, Ohta Y, Kaneko A, Ueyama Y, Watanabe Y. In vivo experimental model of human gingival mucosa using immunodeficient mice. *J Periodontal Res*. 2007 Aug;42(4):294-9.

Ujwala R, Sawant S, Dange P, Kalraiya R, Ingle A, Vaidva M. 2004, Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: Induction of transformed phenotype. *Int J cancer*. 2004 Sep 20;111(5):662-8

Urken ML. Free Flaps. Radial Forearm. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995. Raven Press. P. 261-90.

Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006 Jul-Sep;10(3):569-76. Review.

Vaidya MM, Sawant SS, Borges AM, Naresh NK, Purandare MC, Bhisey AN. Cytokeratin expression in human fetal tongue and buccal mucosa. *J Biosci* 2000;25:235-242.

Van der Velden LA, Manni JJ, Ramaekers FC, Kuijpers W. Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1999;256(10):514-9.

Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Owaki H, Ono K, Yasui N. [Repair of rabbit articular surfaces with allografts of chondrocytes embedded in collagen gels] *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1989 May;63(5):529-38.

Walgenbach, K. J., Voigt, M., Riabikhin, A. W., et al. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat. Rec*. 263: 372, 2001

Yang, S., Leong, K., Du, Z., and Chua, C. The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 7: 679, 2001.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000; 2(6): 477–488.