

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE MODELOS BIOMIMÉTICOS DE
CÁNCER DE PIEL NO MELANOMA Y DE SUSTITUTOS BIO-
ARTIFICIALES DE NERVIOS PERIFÉRICOS PARA LA EVALUACIÓN DE
PROTOCOLOS TERAPÉUTICOS**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



Tesis doctoral de:
Jesús Chato Astrain

Realizado bajo la dirección de:
Dr. Víctor Sebastián Carriel Araya
Dr. Miguel Alaminos Mingorance

2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Jesús Chato Astrain
ISBN: 978-84-1117-577-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/77697>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- Transversal tissue engineering and nanomedicine approach towards an improved chronic wound therapy (NanoGSkin). Unión Europea.
- Generación de nuevos modelos de piel medicalizada a partir de la piel artificial de fibrina-agarosa ensayada clínicamente en grandes quemados. Funcionalización con fármacos y nuevos procesos de biofabricación PE-0395-2019. Consejería de Salud y Familias. Junta de Andalucía.
- Generación y evaluación de sustitutos bioartificiales para su utilización como terapia avanzada en la reparación quirúrgica de lesiones críticas del nervio periférico FIS PI17/393. Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Medicina regenerativa aplicada a lesiones traumáticas del nervio periférico. Desarrollo de un nuevo medicamento de ingeniería tisular para uso clínico P18-RT-5059. Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad. Junta de Andalucía.
- Generación y evaluación in vivo de modelos bio-artificiales de nervio periférico descelularizado de estructura y visco-elasticidad controladas A-CTS-498-UGR18. Universidad de Granada, Junta de Andalucía y programa FEDER de la UE.

El doctorando, D. Jesús Chato Astrain realizó este trabajo de Tesis Doctoral en la Universidad de Granada gracias a un programa de formación concedido en el marco del Plan Propio de investigación de la Universidad de Granada (programa P35) de contratos predoctorales para la realización de tesis y doctorados industriales en colaboración con instituciones, empresas o entidades cofinanciados por la Fundación Benéfica Anticáncer San Francisco Javier y Santa Cándida en su convocatoria 2018 (ref. OTRI.35A-07).

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

1. **Jesús Chato-Astrain**, Fernando Campos, Olga Roda, Esther Miralles, Daniel Durand-Herrera, José Antonio Sáez-Moreno, Salomé García-García, Miguel Alaminos, Antonio Campos, Víctor Carriel. IN VIVO EVALUATION OF NANOSTRUCTURED FIBRIN-AGAROSE HYDROGELS WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FOR PERIPHERAL NERVE REPAIR.

Front Cell Neurosci. 2018 Dec 18;12:501. doi: 10.3389/fncel.2018.00501.

Factor de Impacto: 3.900; Categoría: Neurosciences; Tercil 1, Percentil: 30

El doctorando, D. Jesús Chato Astrain realizó una estancia de investigación predoctoral bajo la supervisión de la Profa. Dra. Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira, profesora del Departamento de Ciencias médicas de la universidad de Aveiro, Directora del programa doctoral en Ciencias de la Rehabilitación e Investigadora Principal del Instituto de Biomedicina (iBiMED/UA) en la Universidad de Aveiro, Portugal.

Esta estancia se desarrolló en el período comprendido entre el 1/11/2020 y el 31/01/2021 (3 meses).

AGRADECIMIENTOS

Un correo de mi padre con una noticia de prensa deslizó la idea de hacer una Tesis Doctoral, una idea que desde luego no acepté a la primera. Era entonces un estudiante ávido por probarme en situaciones laborales. Quería alejarme de las aulas teóricas que creía dominadas, para ponerme a prueba en laboratorios con investigaciones reales. Algo que encontré para mi sorpresa nada más entrar en el grupo de investigación de Ingeniería Tisular de Granada.

Sin duda no puedo comenzar estos agradecimientos sin el propio a mi familia, a mi familia en su extensión.

Especialmente a mis Padres por ser guía y columna constante en mi vida.

A mis hermanos porque crecemos juntos, y aun estando lejos, somos uno que no se entiende separado.

A mis abuelos que no dejo de admirar cada día, y son constante ejemplo de vida.

A mis tíos, especialmente a Chus y Ana porque en mi vida en Lérída erais casa y hogar.

A mis primas y primos, porque celebrar la vida con vosotros es simplemente vivir.

A lo largo de este camino, he conocido a personas fundamentales para mi formación de las que he aprendido no solo ciencia y docencia, sino que me han enseñado valores humanos que jamás olvidaré y que ya los llevo conmigo.

En primer lugar, quisiera agradecer al profesor Antonio Campos por abrirme las puertas, porque es una continua muestra de motivación, y el mejor ejemplo docente e investigador con una calidad humana abrumadora.

A mis directores de Tesis, el profesor Miguel Alaminos y Víctor Carriel, porque de ellos he aprendido el saber hacer y el saber trabajar. Gracias por la oportunidad, por la paciencia y por el compromiso. Gracias por enseñarme de calidad científica a la par que personal.

A la profesora M^a Carmen Sánchez Quevedo, porque de ella he aprendido que se puede ser estricta y afectuosa. Porque siempre me da un aliento familiar y siempre está pendiente.

A los profesores y profesoras Ingrid Garzón, Miguel Ángel Martín, Fernando Campos, Miguel Sola e Ismael Rodríguez, porque siempre me han dado apoyo y de los que he aprendido, hasta copiado, los primeros pasos como docente.

A los profesores, Vicente Crespo, Javier Cañizares, José Manuel García, y al resto de profesores del departamento, grandes personas y profesionales de quienes he aprendido mucho y por quienes siempre me sentí apoyado.

A la profesora Sandra Vieira, por aceptarme en las peores condiciones y darme la oportunidad de conocer otra forma de trabajar, gracias por tu calidad como persona.

A mis compañeros de batallas en el laboratorio a Dani, Oscar, David, Ainhoa, Cristina, Marwa, Fabiola, Bárbara, Carlos, Olimpia, Patricia, Alejandro, Virginia, porque sin vosotros la batalla es una pérdida. Gracias por ser apoyo constante, por ser fuerza y risas, porque juntos es la única forma. Gracias por estar todos los días ahí, por toda la ayuda y por todas las charlas de desahogo.

A Mariángels y Mayte, a Conchi y Amalia, por contribuir y facilitar el trabajo.

Siento imprescindiblemente la necesidad de agradecer a todos mis amigos su labor en este camino. Porque sin ellos tampoco hubiera sido posible.

A mis amigos de Zaragoza, los de siempre, los del cole, "Los más".

A mis amigos de carrera, a Oskicar que es familia, a Diana, Cristina, Paula, Andrea, Alicia, Raúl y María.

A mis amigos de Granada, especialmente a Lucía, Alicia y Cristina, porque empecé sin nadie y ahora no puedo sin vosotras.

A mis amigos de fiestas y escapadas, de veranos eternos y de liadas improvisadas. Gracias Mariano, Juan, Beto, Nachos, Miguel, Pablos.

A mis amigos de Erasmus, Laura, Inés, Marta, Laura y Javi.

A Roge, por el apoyo continuo

Y a todos los que no he mencionado y habéis contribuido también en este proceso.

Parte de este documento y parte de mí os la debo a vosotros.

¡Gracias a todos!

Lista de Abreviaciones:

IT	Ingeniería Tisular
CNM	Cáncer de piel no melanoma
MEC	Matriz extracelular
HFA	Hidrogeles de fibrina-agarosa
NP	Nervio periférico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
ATMP	<i>Advanced therapy medicinal products</i>
CK	Citoqueratinas
UV	Ultravioleta
CEC	Carcinoma escamoso celular
CBC	Carcinoma basocelular
FNP	Fibra nerviosa periférica
CS	Célula de Schwann
SNB	Sustitutos de nervio bioartificial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
SNBFAN	Sustituto de nervio bioartificial basado en fibrina-agarosa nanoestructurado
DMEM	Medio de Dulbecco modificado por Eagle
FBS	suero bovino fetal
HE	Hematoxilina-eosina
AB	Azul Alcían
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PS	Picrosirius
ColIV	Colágeno IV
EMG	Electromiografía
PBS	Tampón fosfato salino
MET	Microscopía electrónica de transmisión
TMS	Tricómico de Masson
IHC	Inmunohistoquímica
CLAU	Claudina

ÍNDICE

I	RESUMEN	10
1	RESUMEN.....	11
2	SUMMARY	13
II	INTRODUCCIÓN	15
III	ESTADO DEL ARTE	18
1	Ingeniería Tisular.....	19
1.1	Conceptos, definiciones y elementos básicos.....	19
1.1.1.	Células	20
1.1.2.	Factores de crecimiento	22
1.1.3.	Biomateriales.....	23
1.2	Hidrogeles de Fibrina-Agarosa.....	25
2	Cáncer de piel no melanoma	29
2.1	Conceptos básicos de la piel.....	29
2.1.1.	Estructura histológica de la piel humana	29
	La epidermis	29
	La dermis.....	32
2.2	Neoplasias, diseminación y metástasis.....	32
2.3	Tratamiento quirúrgico de las lesiones neoplásicas	38
2.4	Ingeniería Tisular de la piel	39
3	Lesiones de Nervio Periférico	42
3.1	Conceptos básicos del sistema nervioso periférico.....	42
3.1.1.	Características histológica.....	42
	Parénquima.....	42
	Estroma	44
3.1.2.	Regeneración y degeneración de los nervios periféricos	47
3.2	Estrategias de reparación de los nervios periféricos ...	50
3.2.1.	Reparación directa.....	52
3.2.2.	Autoinjertos	52
3.2.3.	Aloinjertos	53
3.3	Ingeniería Tisular del nervio periférico	53

	3.3.1. Descelulariación.....	54
	3.3.2. Conductos bioartificiales	56
IV	HIPÓTESIS	59
V	OBJETIVOS.....	61
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	63
1	Generación de modelos biomiméticos de cáncer de piel no melanoma:	64
	1.1 Muestras y obtención de cultivos primarios	64
	1.2 Generación de hidrogeles de piel humana normal y carcinoma.....	65
	1.3 Caracterización histológica y estructural	68
2	Generación de sustitutos de nervio periférico:	70
	2.1 Generación de sustitutos 3D bio-artificiales con biomateriales naturales y células mesenquimales.....	70
3	Estudios preclínicos en el modelo de lesión de nervio ciático de ratas:	75
	3.1 Procedimientos quirúrgicos y grupos de estudio experimentales	75
	3.2 Evaluación <i>in vivo</i> de los sustitutos nerviosos bioartificiales para la reparación del nervio periférico.....	76
	3.2.1. Evaluación clínica.....	76
	3.2.2. Estudios <i>postmortem</i>	78
	Evaluación morfométrica de los músculos.....	78
	Análisis histológico, estructurales y ultraestructurales	79
	Análisis estadísticos	81
VII	RESULTADOS	82
1	Generación y Caracterización de los nuevos Modelos de cáncer de piel no melanoma	83
	1.1 Caracterización histológica y estructural.....	83
2	Evaluación preclínica de lesiones nerviosas reparadas por IT:	
	89	

2.1	Evaluación <i>in vivo</i> de los sustitutos de nervio para la reparación de nervios periféricos	89
2.1.1.	Implantación y aspecto macroscópico posquirúrgico 89	
2.1.2.	Resultados clínicos	90
2.1.3.	Resultados electromiográficos.....	93
2.1.4.	Regeneración del Nervio Periférico: Histología y Ultraestructura.....	96
2.1.5.	Resultados de la morfometría e histología muscular 101	
VIII	DISCUSIÓN	105
IX	CONCLUSIONES	117
1	CONCLUSIONES.....	118
2	CONCLUSIONS	120
X	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

I RESUMEN

1 RESUMEN

La ingeniería tisular tiene por objetivo básico la elaboración de tejidos artificiales, cada vez más biomiméticos y biocompatibles con los tejidos corporales. Estos tejidos artificiales pueden ser utilizados como herramienta terapéutica por sí misma para reparar, restaurar o incluso mejorar las funciones de tejidos y órganos dañados. Sin embargo, y además de la mencionada aplicación, los tejidos desarrollados por ingeniería tisular también pueden constituir una oportunidad para el estudio de enfermedades *ex vivo*, bajo condiciones controladas, gracias a la elaboración de modelos patológicos.

En la presente Tesis Doctoral se plantea la generación de diversos tejidos artificiales, para, por un lado, recrear en el laboratorio modelos patológicos de cáncer de piel no melanoma y, por otro lado, reparar lesiones nerviosas a través de sustitutos bioartificiales, siendo por sí mismos, herramientas terapéuticas. Ambos tejidos artificiales se elaboran gracias al biomaterial de fibrina-agarosa y, de esta forma, el mismo biomaterial es capaz de satisfacer las dos grandes aplicaciones que presentan los productos elaborados por ingeniería tisular.

En este sentido, la incidencia del cáncer de piel ha aumentado en las últimas décadas siendo el cáncer de piel no melanoma, producido por la transformación de los queratinocitos de la epidermis, su principal representante. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que se asocian a la biología y la evolución del tumor, aún permanecen desconocidos. Es por ello, que en esta Tesis Doctoral se elaboraron modelos patológicos de cáncer de piel no melanoma que resultaron ser útiles para el estudio esta patología.

El análisis histológico demostró que es posible recrear satisfactoriamente características propias de la diseminación tumoral gracias a este modelo. Se observó una rápida invasión de las células escamosas tumorales en el estroma acelular, así como una alta desorganización espacial con estructuras típicas tumorales en el epitelio del modelo con estroma celular. Estos resultados demostraron que los modelos generados no sólo pueden ser útiles para el

estudio de la patología, sino que también se presentan como una alternativa para la evaluación de protocolos terapéuticos.

Por otra parte, las lesiones de nervios periféricos provocan alteraciones en la función nerviosa y resultan en problemas físicos y psicológicos para los pacientes afectados. Actualmente, las lesiones nerviosas de gran longitud son reparadas gracias al uso de autoinjertos, el actual tratamiento de referencia, cuando éstos están disponibles. Sin embargo, es necesario encontrar alternativas eficientes al uso del autoinjerto para el tratamiento de defectos nerviosos críticos. Para dar respuesta a esta problemática clínica, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se elaboraron sustitutos de nervio bioartificiales basados en hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurados con células mesenquimales del tejido adiposo. Estos sustitutos nerviosos se utilizaron como herramienta terapéutica por sí mismos y, además, se combinaron con conductos de colágeno para la preparación de una lesión nerviosa de 10 mm en ratas.

Los resultados *in vivo* demostraron que el sustituto de nervio bioartificial generó un mejor perfil de recuperación funcional que el mismo usado como conducto intraluminal en conductos de colágeno en un modelo de roedores. Dichos resultados se confirmaron posteriormente con estudios histológicos donde se apreció un activo proceso de regeneración en todos los grupos experimentales, mostrando de nuevo que el sustituto de nervio promueve una regeneración más activa y abundante que cuando el biomaterial se utiliza como relleno de un conducto de colágeno.

Finalmente, los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral avalan la utilización del hidrogel de fibrina-agarosa para la generación tanto de modelos patológicos de enfermedad, como el cáncer de piel no melanoma, como para la generación de alternativas terapéuticas para la reparación de lesiones del nervio periférico, cumpliendo así las dos aplicaciones fundamentales de los productos generados por estrategias de ingeniería tisular.

2 SUMMARY

Tissue engineering aims to develop artificial tissues that are increasingly biomimetic and biocompatible with body tissues. These artificial tissues can be used as a therapeutic tool by themselves to repair, restore or even improve the functions of damaged tissues and organs. However, in addition to the aforementioned application, tissues developed by tissue engineering can also constitute an opportunity for the study of diseases *ex vivo*, under controlled conditions, by the development of pathological models.

This Doctoral Thesis proposes the generation of various artificial tissues, on the one hand, to recreate pathological models of non-melanoma skin cancer in the laboratory and, on the other hand, to repair nerve lesions by means of bioartificial substitutes that are themselves therapeutic tools. Both artificial tissues are made using the fibrin-agarose biomaterial and in this way, the same biomaterial is capable of satisfying the two major applications of tissue-engineered products.

In this sense, the incidence of skin cancer has increased in recent decades, with non-melanoma skin cancer, produced by the transformation of keratinocytes in the epidermis, being its main representative. However, the cellular and molecular mechanisms associated with tumour biology and progression remain unknown. This is why, in this doctoral thesis, pathological models of non-melanoma skin cancer have been developed that are found to be useful for the study of the pathology.

Histological analysis demonstrated that it is possible to successfully recreate features of tumour dissemination using this model. Rapid invasion of tumour squamous cells into the acellular stroma as well as high spatial disorganisation with typical tumour structures in the epithelium of the stromal cell model were generated. These results demonstrated that the generated models can not only be useful for the study of pathology, but also present an alternative for the evaluation of therapeutic protocols.

On the other hand, peripheral nerve injuries cause disorders in nerve function and result in physical and psychological problems for affected patients. Currently,

long nerve injuries are repaired using autografts, the current gold standard treatment, however, it is necessary to find efficient alternatives to the use of autografts for the treatment of critical nerve defects. In order to respond to this clinical problem, in the development of this Doctoral Thesis, bioartificial nerve substitutes based on nanostructured fibrin-agarose hydrogels with adipose-derived mesenchymal stem cells were elaborated. These nerve substitutes were used as a therapeutic tool by themselves and were also combined with collagen conduits for the repair of a 10 mm nerve lesion in rats.

In vivo results demonstrated that the bioartificial nerve substitute obtained a better functional recovery profile than the same one used as an intraluminal collagen conduit in rodents. These results are further confirmed by histological studies where an active regeneration process is confirmed in all experimental groups showing again that the bioartificial substitute used alone promotes a more active and abundant regeneration than the same one used as a collagen conduit filler.

Finally, the experimental results obtained in this Doctoral Thesis support the use of the fibrin-agarose hydrogel for the generation of both, pathological models of diseases, such as non-melanoma skin cancer, and for the generation of therapeutic alternatives for the repair of nerve lesions, thus fulfilling the two fundamental applications of products generated by tissue engineering strategies.

II INTRODUCCIÓN

El Diccionario de Términos Médicos de la Real Academia Nacional de Medicina de España define la Ingeniería Tisular (IT) como “disciplina científica que sustenta la acción terapéutica de la medicina en el potencial de renovación y regeneración de los tejidos y órganos corporales, y en la aplicación de los principios de la bioingeniería a la obtención de sustitutos biológicos capaces de mantener, mejorar o restaurar las características estructurales y funcionales de dichos tejidos y órganos”. Gracias a la IT, se han generado sustitutos bioartificiales que han sido transferidos exitosamente a la práctica clínica, demostrando el potencial de esta disciplina. Sin embargo, la IT no es sólo importante como herramienta terapéutica en sí misma, sino que, además, permite crear en laboratorio modelos de tejidos y órganos normales o patológicos potencialmente útiles para estudiar la evolución de una determinada enfermedad o evaluar la eficacia de nuevos tratamientos.

La presente Tesis Doctoral se enfoca precisamente en estos dos objetivos que persigue la IT. Por un lado, se propone la generación de un modelo patológico de cáncer de piel no melanoma (CNM) basado en un biomaterial de fibrina-agarosa previamente desarrollado en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Este modelo formará las bases para la generación de modelos patológicos en el laboratorio que permitirán el estudio de patologías en condiciones controladas y de forma reproducible. Por otro lado, el mencionado biomaterial se utilizará para elaborar alternativas terapéuticas para la reparación y regeneración de defectos nerviosos. De esta forma, el biomaterial de fibrina-agarosa permite dar respuesta a los dos principales retos a los que se enfrenta la IT.

En esta memoria se abordará, en primer lugar, el estado del arte, presentándose una revisión de conceptos clave en IT, el CNM y las lesiones del nervio periférico. Durante esta revisión conceptual, se pone de manifiesto la capacidad de la IT para la generación de tejidos artificiales útiles tanto para el estudio de patologías por medio de modelos *in vitro*, como para la elaboración de sustitutos artificiales para su uso terapéutico, objetivos principales de investigación de la presente Tesis Doctoral. Posteriormente, se presenta el problema de investigación, la hipótesis y los objetivos, así como la metodología empleada para dar respuesta a los mismos que describe la generación y la evaluación de los modelos

biomiméticos de CNM y de los sustitutos de nervio periférico. Una vez generados, los tejidos artificiales fueron sometidos a una completa caracterización estructural y funcional a distintos niveles. Finalmente, se presentan los resultados obtenidos, la discusión y las conclusiones elaboradas a partir de dichos resultados.

III ESTADO DEL ARTE

1 INGENIERÍA TISULAR

1.1 Conceptos, definiciones y elementos básicos

Desde la publicación en 1993 del trabajo pionero de Robert Langer y Joseph Vacanti en la revista *Science* titulado “*Tissue engineering*” la expansión de la IT ha sido extraordinaria y su aplicación clínica creciente (1, 2). Fue en 2004, cuando el profesor Campos introdujo el término IT en la Real Academia Nacional de Medicina de España definiéndolo como “la construcción de tejidos artificiales y su utilización para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los tejidos orgánicos” (3). Desde entonces, numerosos trabajos se han sucedido con el objetivo de construir tejidos artificiales viables de naturaleza biológica equivalentes a los tejidos y órganos corporales nativos. Tanto es así que la IT se consolida actualmente como una de las áreas más relevantes en la investigación de terapias avanzadas, con una trayectoria de más de 30 años (4, 5).

Hoy en día, este objetivo original se ha convertido en una revolución en la práctica clínica y, por primera vez, el tratamiento de algunas enfermedades y lesiones se basa en aplicaciones de IT incluidas en lo que se conocen como terapias avanzadas. En este sentido, la mucosa oral (6), piel (7), córnea (8), cartílago (9), paladar (10) o nervios periféricos (11) son ejemplos de tejidos artificiales generados por IT. Sin embargo, la IT no es sólo importante como acto terapéutico en sí mismo, sino que, además, permite crear en laboratorio modelos de tejidos y órganos normales o patológicos para conocer la evolución de una determinada enfermedad o evaluar la eficacia de nuevos tratamientos (3).

Para elaborar tejidos bio-artificiales o sustitutos por IT, es necesario combinar los métodos y principios de la medicina, la biología, la química y la ingeniería acompañados de adecuados controles de calidad (12, 13). En este sentido, para el desarrollo de tejidos artificiales es necesaria la presencia e interrelación estrecha de tres elementos fundamentales: células, biomateriales y factores de crecimiento (Figura1). Todos estos elementos, a su vez, representan un abanico

de posibilidades de acuerdo con las distintas características que éstos pueden ofrecer.

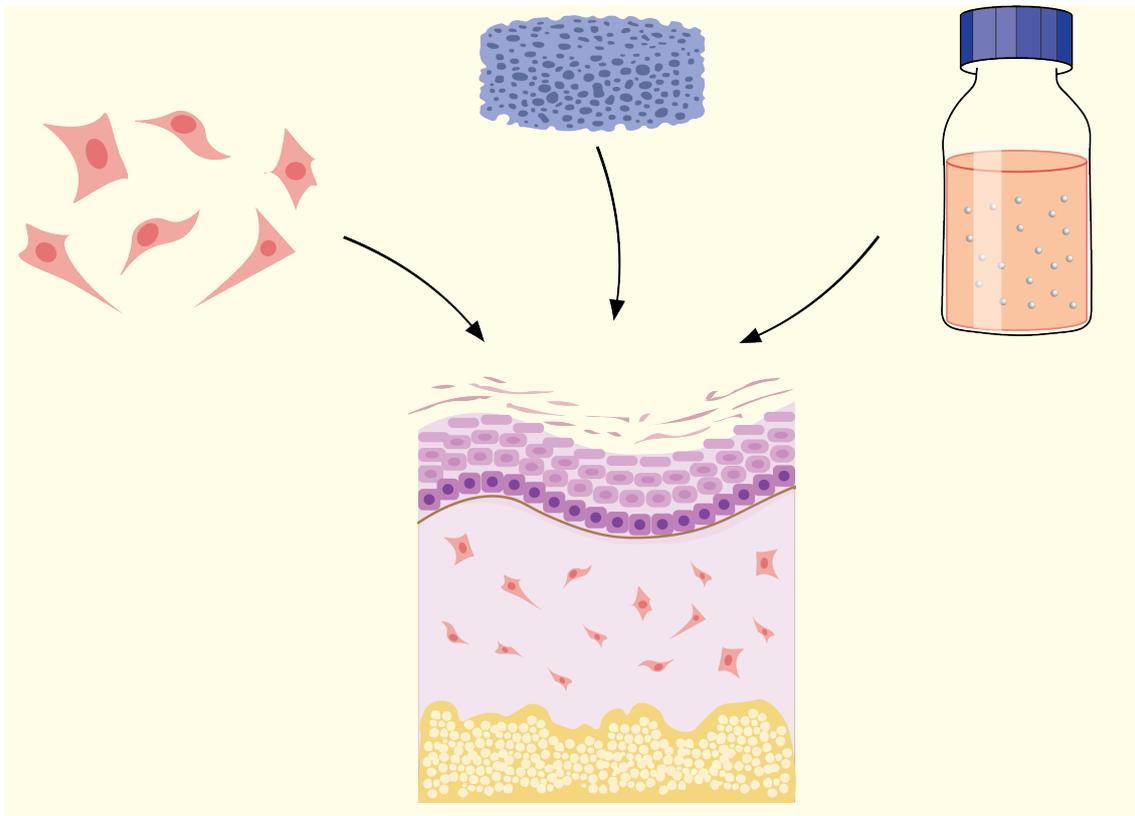


Figura 1. Elementos fundamentales de la Ingeniería Tisular. Células, biomateriales y factores de crecimiento combinados para generar un tejido artificial.

1.1.1. Células

Para construir un tejido artificial, es imprescindible conocer los principios fundamentales sobre los que se crean los sistemas vivos, cuyo componente básico funcional y estructural son las células (13). Es por ello necesario conocer primero las estrategias que utilizan las células para regenerar y construir un nuevo tejido en condiciones normales. En este complejo proceso acontecen distintos comportamientos biológicos donde podemos reconocer dos circunstancias en las que desarrollan muchas de las potencialidades celulares, concretamente el desarrollo morfogénico normal y la cicatrización de las heridas (3). Por un lado, las células más próximas a una lesión pueden restaurar el daño por el denominado mecanismo de transdiferenciación. Éste es un proceso que consiste en la diferenciación de una célula diferenciada en otra

distinta sin pasar por un proceso intermedio de desdiferenciación (14, 15). Por otro lado, las células implicadas en el proceso de reparación celular han de ser capaces de dividirse y dar origen a células hijas diferenciadas (16). Deben ser células madre, y aunque no existe acuerdo universal sobre lo que es exactamente una célula madre, suele aceptarse que son aquellas células que poseen amplia capacidad de proliferación, carácter indiferenciado y capacidad para originar células hijas destinadas a la diferenciación terminal (3). Con independencia de lo que ocurre con las células totipotentes o pluripotentes del embrión, se ha aceptado clásicamente que las células madre se diferencian hacia los elementos maduros del tejido en el que residen y, aunque los mecanismos biológicos de dicha diferenciación aún no son del todo conocidos, la extensa gama de posibilidades de diferenciación celular genera grandes posibilidades para la IT (3).

En consecuencia, existen dos opciones para la generación de tejidos artificiales: utilizar células madre específicas del tejido que deseamos construir, o utilizar fuentes celulares alternativas con capacidad para desarrollar el proceso de transdiferenciación en la fase del proceso de IT en que sea necesario (3, 17). Una vez seleccionados los tipos celulares necesarios, se debe realizar la expansión celular acompañada de una modulación del comportamiento celular hacia el fin deseado, bien sea mediante modificaciones en el microambiente celular (18) o mediante reprogramaciones genéticas (19).

Las células adultas diferenciadas suelen ser difíciles de cultivar y, por lo general, presentan capacidad de proliferación muy limitada, lo cual dificulta la obtención de un número adecuado de las mismas en un período razonable. No obstante, estas células presentan las características fenotípicas y funcionales de un determinado tejido, y por tanto, son las células más eficientes para promover la generación de tejido bioartificial altamente biomimético y funcional. Sin embargo, es importante señalar que la gran mayoría de las células adultas diferenciadas, cuando se aíslan y expanden *ex vivo* disminuyen su función, expresión génica, viabilidad y diferenciación (20, 21). Por ello, en muchos casos se prefiere la utilización de células madre para la generación de tejidos artificiales pues, además de presentar una gran capacidad proliferativa y de autorrenovación,

pueden modular el comportamiento celular gracias a su capacidad de diferenciación y plasticidad celular (22-24).

Las células difieren en cuanto a su función, morfología, fenotipo, actividad metabólica, origen embrionario y capacidad de regeneración. Además, son la base de muchos de los procesos fisiopatológicos (25-27). Esta gran variedad celular permite la elección de determinados tipos celulares acordes con los objetivos y necesidades particulares del tejido que se desea generar.

Finalmente, y en relación con su origen, se distinguen tres tipos de células para su uso en IT: a) autólogas (del mismo individuo), que ofrecen la ventaja de manipulación con mínimos riesgos de reacciones inmunológicas postimplantación b) alogénicas (de otro individuo de la misma especie), que ofrecen la ventaja de su conservación en bancos biológicos con carácter previo a su utilización y c) xenogénicas (procedentes de otras especies), que ofrecen, junto con las alogénicas, un riesgo importante de respuesta de rechazo inmunológico (3, 25, 28, 29).

1.1.2. Factores de crecimiento

Una amplia gama de factores, denominados generalmente factores de crecimiento, tanto físicos como químicos, participan en la constitución de nuevos tejidos, pues contribuyen fundamentalmente al crecimiento y desarrollo del tejido igual al que ocurre en condiciones ortotípicas (3, 27).

Las células responden al medio ambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan una respuesta mediante la activación de los distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a la división, migración, diferenciación, el mantenimiento del fenotipo o la apoptosis. La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido conduce a la definición estructural y funcional del tejido en un momento temporal determinado (3, 27, 30).

En general, los factores de crecimiento suelen incorporarse directamente a los cultivos celulares a través del medio de cultivo. No obstante, estos factores

también suelen ser utilizados en combinación con biomateriales y/o diversos tipos de nanopartículas. Este modelo puede tener dos objetivos: por un lado, la funcionalización de los mismos y, por otro lado, la liberación controlada de los factores en el microambiente en el cual crecen las células o para liberar dichos factores a los tejidos del organismo huésped (31-35).

1.1.3. Biomateriales

Durante la construcción de tejidos artificiales es necesario considerar, además de su composición celular, la composición histológica y las propiedades físicas y químicas del tejido a reparar. La mayoría de los tejidos corporales están compuestos por una combinación armoniosa de poblaciones celulares inmersas en una matriz extracelular (MEC) especializada (29, 36). En este sentido, los biomateriales juegan un papel muy importante en IT, ya que imitan a la MEC aportando la estructura, tridimensionalidad y propiedades biomecánicas necesarias para la generación de tejidos bioartificiales funcionales (37).

El término “biomateriales” se define, en el ámbito de la IT, como el componente del tejido artificial que actúa como soporte estructural tridimensional y funcional de las células y como agente facilitador para la acción sobre ellas de los factores de crecimiento y señales moleculares, es decir, como la MEC nativa (38, 39). En un microambiente regenerativo, los biomateriales proporcionan un soporte físico tridimensional a las células para impulsar la regeneración de los tejidos. Además, los biomateriales también actúan como vehículo para las células, los factores de crecimiento y otras señales físicas que ayudan a aumentar la regeneración de los tejidos (1, 25, 40).

En esta Tesis Doctoral, sólo se dará una breve reseña de los biomateriales relacionados con las aplicaciones en IT. En las siguientes secciones, se describirán con más detalle los hidrogeles de fibrina-agarosa (HFA) utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Las propiedades fundamentales que debe presentar un biomaterial varían de acuerdo a su aplicación, pero, en general, éstos deben poseer adecuadas propiedades físicas y morfológicas, deben ser biocompatibles, no tóxicos,

química y estructuralmente estables, inertes y, en algunos casos, estar sujetos a un proceso de degradación controlada (11, 41-43). Los biomateriales, además, deben favorecer la función celular, como es la adhesión, migración, proliferación y diferenciación y deben poseer un diseño que imite al tejido nativo (biomimetismo respecto al tejido nativo). Desde el punto de vista biomecánico, los biomateriales deben tener un comportamiento similar al tejido a reparar y favorecer su manipulación e implantación *in vivo* (39, 41, 43-45). Por último, su organización tridimensional debe ir orientada a imitar la estructura del tejido nativo o, en su defecto, promover un proceso de regeneración tisular más rápido y eficiente, como es el caso del tejido nervioso (11, 25, 28, 39, 46).

El impacto biológico de un biomaterial en la función celular o respuesta del huésped dependerá de su naturaleza química. Aunque no existe una clasificación universal para los biomateriales utilizados en IT, existen diversos criterios, siendo el más utilizado aquél que permite conocer su impacto en los sistemas biológicos obedeciendo a la naturaleza de los mismos. En este sentido, los biomateriales pueden ser clasificados en naturales y sintéticos (3, 39, 47).

Los biomateriales naturales son compuestos que proceden fundamentalmente de matrices extracelulares o productos naturales. Éstos se caracterizan por su alto grado de biocompatibilidad y biodegradabilidad, razón por la cual suelen ser los biomateriales más utilizados en IT. Sin embargo, suelen tener una estabilidad mecánica muy variable y el control de la densidad, porosidad, anisotropía y propiedades biomecánicas sigue siendo un desafío (11, 40, 41, 48).

Estos biomateriales contienen motivos moleculares que los hacen altamente bioactivos y, por lo tanto, apoyan las interacciones adecuadas de los biomateriales celulares (28). Además, los biomateriales como el colágeno o la fibrina son hidrogeles poliméricos que tienen la ventaja de reproducir los niveles de hidratación de los tejidos y, por lo tanto, proporcionan un microambiente apropiado para el intercambio de nutrientes y gases.

En los últimos años, las técnicas de descelularización han surgido como una alternativa prometedora para la generación de andamiajes biológicos y naturales a partir de tejidos nativos para una amplia gama de aplicaciones de la IT (49-51).

Este método fue diseñado para eliminar el contenido celular del tejido, eliminando así los componentes inmunogénicos de los tejidos, manteniendo la arquitectura tridimensional del tejido. Los tejidos descelularizados proveen un biomaterial consistente en MEC que se adecúa al microambiente regenerativo que promueve la buena regeneración de los tejidos. Además, poseen estructuras nativas, alta bioactividad, baja inmunogenicidad y una buena biodegradabilidad, propiedades que son difíciles de imitar por los materiales sintéticos (25, 50, 52, 53). Sin embargo, presentan baja estabilidad química y mecánica.

Los biomateriales sintéticos son generalmente polímeros de naturaleza química conocida y permiten regular los parámetros estructurales (densidad, porosidad y biomecánica) y estabilidad química y mecánica (40, 47, 54). No obstante, muchos de estos biomateriales, aunque catalogados como biocompatibles, suelen ser hidrófobos y pueden liberar sustancias tóxicas durante el proceso de biodegradación por lo cual requieren ciertos procesos de funcionalización con componentes naturales (8, 11, 43, 46).

1.2 Hidrogeles de Fibrina-Agarosa

En general, no existe un biomaterial ideal, y la combinación de algunos elementos suele ser una de las estrategias que arroja mejores resultados. Un ejemplo de biomaterial combinado que mostró excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* es la fibrina-agarosa (Figura 2), material desarrollado hace 15 años en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada (55). Este biomaterial permitió el desarrollo de diversos tipos de tejidos artificiales mediante IT, incluyendo córnea (55), piel (7), mucosa oral (56), nervio (46), pared abdominal (57), vejiga urinaria (58), paladar (59), entre otros.

En esta Tesis Doctoral, se evaluó la fibrina-agarosa, en primer lugar, como un biomaterial para generar modelos patológicos de cáncer de piel y, posteriormente, como alternativa para generar sustitutos bio-artificiales del nervio y mejorar la regeneración del NP *in vivo*. La aplicación de ambos conceptos se desarrollará en profundidad en capítulos posteriores.

La fibrina, que constituye el componente principal del coágulo sanguíneo, representa el 70% del volumen de un HFA. La fibrina es un biopolímero de monómeros de fibrinógeno, que a su vez está compuesto por dos conjuntos de tres cadenas polipeptídicas ($\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ) que se encuentran unidas por seis puentes disulfuro (60). Los monómeros resultantes tienen una gran tendencia a la autoasociación y forman una matriz de fibrina insoluble, entrecruzándose por efecto del factor VIII durante la coagulación (60-62). Este proceso de polimerización puede inducirse con éxito *in vitro* con la formación de un hidrogel de fibrina. Estos hidrogeles de fibrina están compuestos por cadenas flexibles de proteínas fibrilares que forman una red organizada al azar de porosidad variable y altas tasas de hidratación (60, 61). Estos hidrogeles tienen la principal ventaja de que proporcionan un andamiaje natural y biodegradable que favorece la adhesión, la migración y la proliferación de las células y la síntesis de MEC (9, 11, 42, 44, 46, 55). Sin embargo, los hidrogeles de fibrina por sí solos tienen tres desventajas principales: la contracción del hidrogel durante la formación de láminas planas, la baja rigidez mecánica y su rápida degradación (60). A este respecto, la adición de agentes antifibrinolíticos ayuda, pero la combinación de la fibrina con otros biomateriales como la agarosa mejora considerablemente sus propiedades biomecánicas, manteniendo las propiedades biológicas (7, 44, 46, 55, 61).

Por otro lado, la agarosa es un polisacárido natural extraído de la pared celular de diversas familias de algas rojas (*Rhodophyceae*). La agarosa es un polisacárido altamente biocompatible que puede prepararse como un gel termorreversible gracias a la presencia de oxígeno e hidrógeno en los grupos laterales que permiten su autogelificación (63). La temperatura de gelificación depende de la concentración de la solución, del peso molecular medio del polímero y de su estructura. Por este motivo, existe una amplia gama de agarosas comercialmente disponibles, caracterizadas por diferentes fuerzas de gelificación y temperatura de transición sólido-gel (63). La agarosa por sí misma no presenta motivos de unión suficientes para la adhesión celular, por lo que puede ser una herramienta útil para fabricar superficies de cultivo no adherentes como los chips de micropocillos para IT (64). Sin embargo, se ha demostrado que la combinación de agarosa con otros polímeros y proteínas contribuye

significativamente a mejorar las propiedades físicas de estos materiales, obteniendo resultados comparables a los de la MEC de muchos tejidos humanos normales (7, 9, 63).

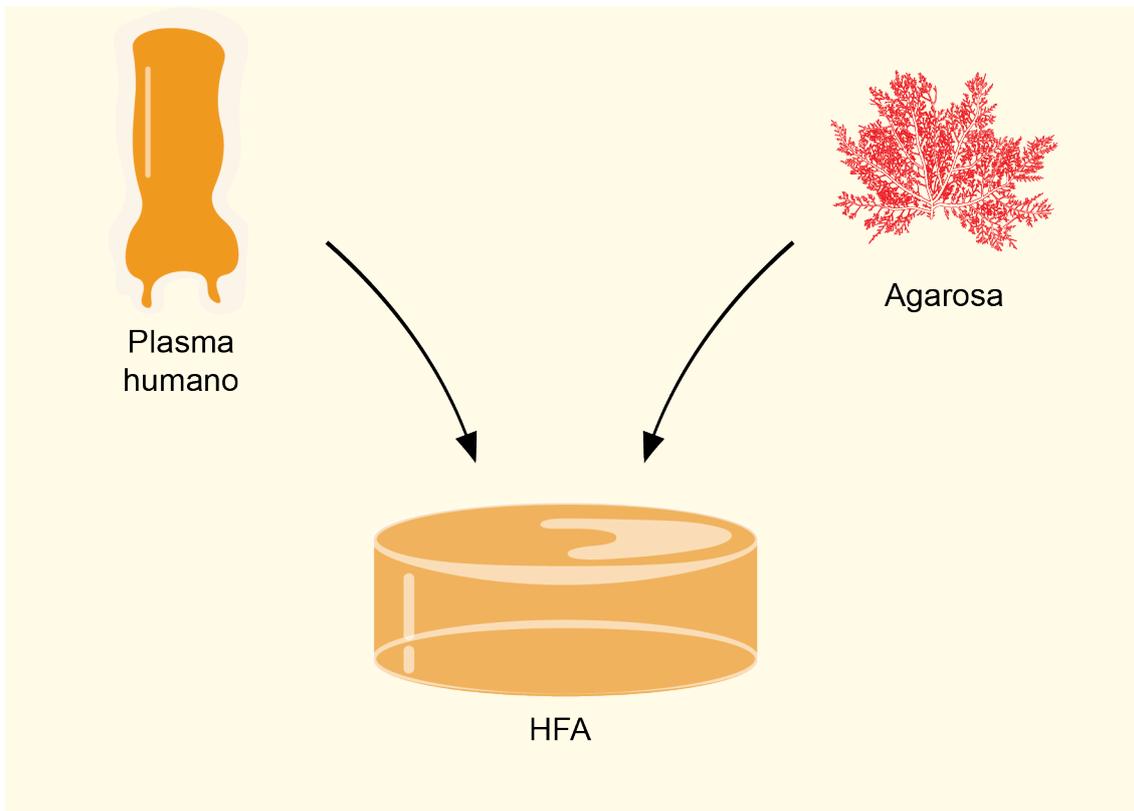


Figura 2: Generación del hidrogel de fibrina-agarosa gracias al plasma humano y la agarosa.

En 2006, los profesores Alaminos y Campos del Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada combinaron la fibrina humana (procedente del plasma) con una baja concentración de agarosa tipo VII (0,1%), obteniendo un nuevo biomaterial natural biocompatible para aplicaciones de IT (55). Al tratarse de hidrogeles altamente hidratados compuestos por fibras orientadas al azar, la utilidad de estos hidrogeles combinados quedó limitada a aplicaciones que no requiriesen elevadas exigencias biomecánicas. Posteriormente, y con el fin de aumentar las propiedades biomecánicas del hidrogel, se utilizaron diferentes técnicas de biofabricación avanzada como la técnica de compresión plástica o nanoestructuración (41), el uso de agentes entrecruzantes químicos (43) o la incorporación de nanopartículas magnéticas (31), obteniendo mejoras significativas respecto a la primera generación de HFA. Desde entonces, los HFA

se han utilizado en diferentes aplicaciones de IT como los nuevos sustitutos bio-artificiales de la córnea (65), la mucosa oral (56), paladar (59), piel (7), vejiga (58) y cartílago(9). En todos estos estudios se demostró que la HFA presenta excelentes niveles de biocompatibilidad, adecuada biodegradabilidad *in vivo*, aceptables propiedades biomecánicas y, sobre todo, capacidad para reproducir distintos tipos de tejidos artificiales que mostraron utilidad *in vivo* en animales de laboratorio, incrementando la regeneración de tejidos dañados del huésped.

En los últimos años, y en base a la demostrada eficacia de este biomaterial en IT, el HFA obtuvo la aprobación por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para su uso clínico en determinadas patologías humanas. Como consecuencia, se está llevando a cabo un ensayo clínico de un sustituto corneal nanoestructurado basado en el HFA para el tratamiento de defectos corneales lamelares anteriores, y se ha autorizado el uso compasivo de un sustituto dérmico nanoestructurado basado en HFA para el tratamiento de pacientes grandes quemados. Esto implica que el HFA se fabrica como producto farmacéutico bajo condiciones GMP (*Good Manufacturing Practice*) según la normativa europea y española relativa a la fabricación y uso clínico de productos de terapias avanzadas o ATMP (*advanced therapy medicinal products*).

2 CÁNCER DE PIEL NO MELANOMA

2.1 Conceptos básicos de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y constituye la principal barrera protectora entre un individuo y el medio ambiente. Además de actuar como primera línea defensiva del cuerpo contra los agentes físicos, químicos y biológicos, también contribuye a regular la temperatura del organismo, a mantener la homeostasis y a participar en los mecanismos de percepción sensorial, así como en los procesos regenerativos (7, 66).

2.1.1. Estructura histológica de la piel humana

Este órgano está constituido por tres capas de tejido estructural y embriológicamente distintas: la epidermis, la dermis y la hipodermis.

La epidermis

La epidermis es la capa más superficial de la piel, y está compuesta por un tejido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado donde la población predominante está formada fundamentalmente por queratinocitos. Los queratinocitos se organizan en cinco zonas morfológicamente diferentes en la epidermis que se denominan, desde la capa más interna a la más externa: 1) estrato basal (anteriormente conocido como estrato germinativo); 2) estrato espinoso; 3) estrato granuloso; y 4) estrato córneo. Además, encontramos otros tres tipos de células que se intercalan entre los queratinocitos en localizaciones específicas, denominadas melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Dado que los queratinocitos se renuevan continuamente mediante descamación en la superficie de la epidermis y renovación por células de estratos inferiores, esta población se encuentra en continua proliferación. La renovación se lleva a cabo mediante la actividad mitótica de los queratinocitos de las capas basales de la epidermis. De esta forma, pueden identificarse las células madre de la epidermis (26, 67).

La capa más profunda de la epidermis, el estrato basal, se apoya en una membrana basal que asienta sobre la dermis formando una interfase irregular con numerosas crestas y papilas. El estrato basal consta de una única capa de células cúbicas o cilíndricas bajas, mitóticamente activas, que presentan el citoplasma basófilo y un gran núcleo. En la membrana plasmática lateral, se localizan abundantes desmosomas y otros tipos de uniones que fijan las células del estrato basal entre sí y con las células del estrato espinoso. Los hemidesmosomas localizados en la membrana plasmática basal fijan las células a la membrana basal (26, 68).

La capa más gruesa de la epidermis, el estrato espinoso, está formada por células de planas o poliédricas. Los queratinocitos localizados en la capa más basal del estrato espinoso son parcialmente activos mitóticamente; esta capa y el estrato basal frecuentemente se denominan en conjunto capa de Malpighi, y son responsables del recambio de los queratinocitos epidérmicos. En este estrato celular, los haces de tonofilamentos surgen radialmente desde la región perinuclear hacia prolongaciones celulares muy interdigitadas que se fijan a las células adyacentes mediante desmosomas, lo que les hace adoptar una morfología en forma de espinas. También encontramos en su citoplasma gránulos que contienen principalmente sustancias lipídicas que serán liberados al espacio extracelular para comenzar la formación de una barrera epitelial impermeable para sustancias acuosas (68). Esta barrera impermeable se formará también gracias a la liberación de gránulos por parte del estrato granuloso.

El estrato granuloso, que consta de tres a cinco capas de queratinocitos planos, es la capa más superficial de la epidermis con células que aún mantienen el núcleo. Estas células, además de presentar gránulos membranosos de naturaleza lipídica, se caracterizan por presentar en su citoplasma gránulos de queratohialina grandes e irregulares. Además, las células del estrato granuloso establecen entre sí numerosas uniones estrechas enriquecidas en claudina, una proteína estrechamente relacionada con la adhesión intercelular (26, 69).

La capa más superficial de la piel, el estrato córneo, está compuesta por numerosas capas de células muertas queratinizadas planas con el plasmalema engrosado. Estas células carecen de núcleo y orgánulos y su contenido es un complejo de tonofibrillas de queratina y queratohialina (68).

Una de las proteínas más importantes sintetizadas por los queratinocitos son las citoqueratinas (CK), que son proteínas estructurales pertenecientes a la familia de los filamentos intermedios. Debido a las características propias de cada estrato, la expresión de CK varía a lo largo de la epidermis, encontrando algunas CK que son específicas de ciertos estratos de la epidermis. En general, la maquinaria que sintetiza queratina, así como el resto de componentes del queratinocito, deja de funcionar después de la entrada de las células en el estrato granuloso. Asimismo, las células de esta capa producen filagrina, una proteína que ayuda a ensamblar los filamentos de queratina en haces aún más gruesos y concede estabilidad y estanqueidad a la epidermis. Paralelamente, las células del estrato espinoso también producen y depositan la proteína involucrina en la cara citoplásmica de su plasmalema. Ambas, la filagrina y la involucrina, juegan un papel importante en la maduración y diferenciación terminal del estrato córneo de la piel y en el control de los niveles de hidratación de la epidermis (70).

Aunque el componente principal de la epidermis sean los queratinocitos, la epidermis está formada por tres poblaciones de celulares no queratinocíticas: los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel.

Los melanocitos son los encargados de la síntesis del pigmento de la melanina, un componente fundamental para la protección de queratinocitos a los rayos ultravioleta (UV). Los melanocitos producen tirosinasa que se empaqueta en gránulos conocidos como melanosomas. Aquí, la tirosinasa, sensible a la luz UV, es convertida en melanina y posteriormente fagocitada por los queratinocitos del estrato espinoso. Una vez incorporados a los queratinocitos, los melanosomas se transportan a la región nuclear, donde se acumulan entre el núcleo y la radiación UV que incide sobre la piel, y de esa manera protegen a los cromosomas del queratinocito de la lesión inducida por radiación (68).

Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos que se encuentran dispersas entre las células del estrato espinoso, mientras que las células de Merkel, que se encuentran diseminadas entre las células del estrato basal, pueden funcionar como mecanorreceptores.

La dermis

La dermis es la capa de la piel inmediatamente subyacente a la epidermis. En ella distinguimos dos zonas: una capa papilar laxa y una capa reticular más densa y profunda. La dermis está compuesta por tejido conjuntivo denso irregular que contiene principalmente fibras de colágeno de tipo I, algunas fibras de colágeno de tipo III y fibras elásticas, así como componentes no fibrilares como proteoglicanos y glicosaminoglicanos, todos los cuales sostienen la epidermis y unen la piel a la hipodermis.

La capa más superficial de la dermis, la capa papilar, forma interdigitaciones denominadas papilas con las crestas de la epidermis. Está compuesta por un tejido conjuntivo relativamente laxo rico en fibroblastos y vasos sanguíneos que forman redes vasculares dérmicas (68, 69). A su vez, la capa reticular de la dermis está compuesta por tejido conjuntivo denso irregular y presenta fibras de colágeno de tipo I agrupadas en grandes haces situados en su mayor parte paralelos a la superficie de la piel. Entremezcladas con las fibras de colágeno, se encuentran redes de gruesas fibras elásticas. Además, en las porciones más profundas de la dermis encontramos como es propio del tejido conjuntivo una alta vascularización e inervación donde se localizan algunos tipos de mecanorreceptores (68).

2.2 Neoplasias, diseminación y metástasis

Como ya hemos visto en secciones anteriores, la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, forma una barrera que nos protege de agentes infecciosos y absorbe la radiación UV. Las capas subyacentes, los estratos granuloso y espinoso, pueden verse afectadas por la radiación y sufrir algún tipo de mutación por acción de la luz UV, pues están conformadas por células

metabólicamente activas. Sin embargo, las células de estos estratos están irreversiblemente comprometidas con la diferenciación terminal y pierden su capacidad de proliferación, por lo que los cambios genéticos que se producen en estas células rara vez son causa de patología. De este modo, las células mutadas, al ser incapaces de proliferar, perderán sus núcleos y se descamarán en las capas más superficiales de la piel en la gran mayoría de los casos. Paralelamente, estas células son ricas en melanosomas, por lo que están parcialmente protegidas frente a la luz UV.

Sin embargo, y pese a todo ello, la piel es el sustrato más frecuente de neoplasias malignas en los seres humanos. Se estima que el riesgo combinado de todos los cánceres de piel durante la vida es del 30-40% para los europeos ligeramente pigmentados (del noroeste), aunque este valor depende de la pigmentación de la piel de cada individuo (71).

Desde un punto de vista histológico, existen tres tipos fundamentales de cáncer de piel: el melanoma, el carcinoma escamocelular (CEC) y el carcinoma basocelular (CBC). El primer tipo de cáncer se genera a partir de melanocitos de la piel, mientras que los otros dos, que en su conjunto constituyen los denominados CNM, se originan por transformación de los queratinocitos epidérmicos. De éstos, el CEC genera metástasis en raras ocasiones, y el CBC, casi nunca (71, 72).

La incidencia de los tres tipos de cáncer ha aumentado en las últimas décadas, a menudo de manera pronunciada. Se cree que la alta incidencia del CEC y el CBC se podrían explicar principalmente por la exposición al sol, por los efectos mutagénicos de la luz UV. Los CBC y CEC son mucho más comunes en pacientes en piel clara y se localizan típicamente en áreas anatómicas expuestas al sol, como la cabeza, el cuello o las extremidades. Si bien el riesgo de cáncer de piel está modulado por diversos factores genéticos, la luz de longitud de onda corta es el carcinógeno exógeno más importante para la piel (71, 72).

La luz UV se clasifica por su longitud de onda en UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) y UVA (320-400 nm) siendo la más mutagénica la luz UVC, seguida de la UVB y, finalmente, de la UVA. La gran mayoría de la UVC es incapaz de

absorber la atmósfera y difícilmente podría penetrar la capa superior de la piel. Sin embargo, el 0,4% de los rayos UVB y algunos rayos UVA llegan a la capa basal de la epidermis, y algunos rayos UVA son incluso capaces de penetrar en la dermis. En dosis moderadas, la exposición solar es beneficiosa, mientras que dosis muy altas de luz rica en UV pueden ser perjudiciales y producir daños en el ADN (71).

El extensivo daño del ADN generado por la radiación UV provoca la activación de los puntos de control del ciclo celular, con activación de la proteína p53, que puede inducir la apoptosis. Esto ocurre a gran escala durante las "quemaduras de sol". En muchos cánceres de piel, la inactivación de p53 parece ser un paso inicial necesario que debe tener lugar antes de que se puedan adquirir más mutaciones.

Los rayos UVA inducen reacciones celulares en diferentes tipos de células de la piel, como la modulación de las respuestas inmunitarias, la alteración de la producción de citoquinas y la activación de las respuestas al estrés y las vías de señalización proliferativa. Esta disminución de la vigilancia inmunológica puede ser particularmente importante para la generación de neoplasias en la piel. La carcinogénesis, sin embargo, es un proceso muy complejo que requiere algo más que mutaciones en el ADN. Típicamente, involucra un ambiente de tejido alterado, en el cual las células tumorales pueden proliferar más fácilmente, escapar de las interacciones con las células vecinas normales y evadir las respuestas inmunológicas (71), así como una compleja combinación de modificaciones epigenéticas y factores neoangiogénicos periféricos al tumor.

Aunque la gran mayoría de los tumores de CNM se detectan en estadios tempranos y bien localizados (grados I y II), el CEC es responsable de la mayoría de las muertes de los CNM y representa aproximadamente el 20% de todas las muertes relacionadas con el cáncer de piel (73).

Los CNM no agresivos, como el CBC, suelen crecer únicamente por extensión local, tanto horizontal como verticalmente. La extensión local continua puede dar lugar a un crecimiento en estructuras profundas, incluyendo tejido adiposo, cartílago, músculo y hueso. La extensión perineural es una forma

particularmente insidiosa de extensión local, ya que a menudo es clínicamente oculta. Si se descuida durante un período prolongado, puede producirse una metástasis ganglionar con un CNM no agresivo (72).

El CNM agresivo crece en primer lugar por extensión local, lateral y vertical. Una vez que se produce una extensión más profunda, el crecimiento puede ser discontinuo, lo que da lugar a una extensión local más profunda. A diferencia de los queratinocitos normales, las células del CEC no dejan de proliferar ni sufren muerte celular, y el tejido se desorganiza gravemente y ocasionalmente progresa hasta convertirse en tumor invasivo e incluso metastásico (72).

Dependiendo de la profundidad a la que se extienda el tumor primario, se pueden distinguir cuatro niveles de Clark en cáncer de piel (72-74). En el nivel I, el tumor se encuentra localizado en la epidermis. En el nivel II, las células tumorales invaden la capa más superficial de la dermis papilar. En el nivel III, ya existe diseminación hacia la unión entre dermis papilar y dermis reticular. En el nivel IV, ya existe diseminación en dermis reticular. Finalmente, el nivel V corresponde a tumores con diseminación al tejido celular subcutáneo. Los niveles IV y V presentan mayor riesgo y peor pronóstico que los niveles I, II y III.

De la misma forma, desde un punto de vista histológico, los CNM pueden clasificarse como carcinoma *in situ* (las células malignas se encuentran únicamente en la epidermis) o carcinoma invasivo (superan la epidermis y aparecen también en la dermis (Figura 3). A su vez, los carcinomas *in situ* (equivalentes al nivel I de Clark) pueden ser clasificados como carcinoma *in situ* temprano (únicamente un grupo de células confinado en algunas capas del epitelio) o avanzado (en todo el espesor del epitelio), mientras que el carcinoma infiltrante (niveles II, III y IV de Clark) presenta células fuera de la epidermis.

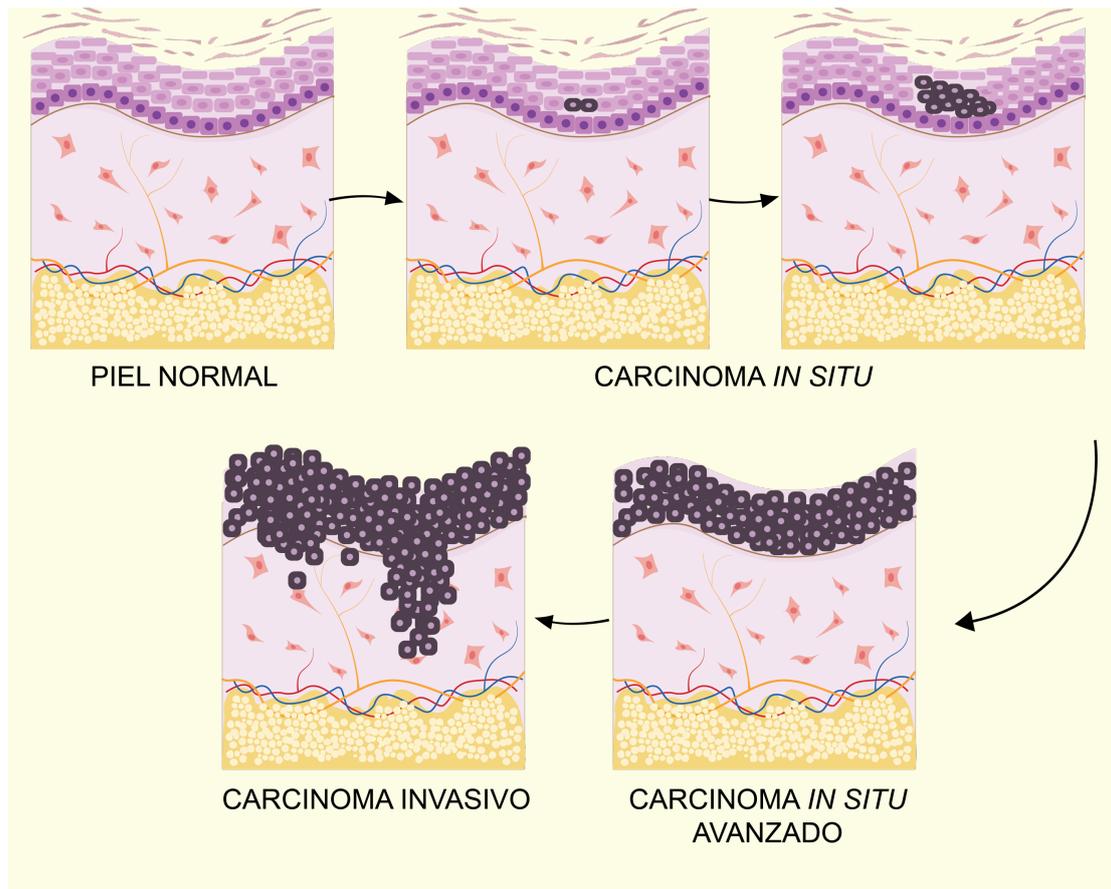


Figura 3. Profundidad de la extensión del CEC en el epitelio. Un queratinocito epidérmico sufre daños en su material genético que eventualmente provoca una desregulación del ciclo celular y neoplasia. Esta neoplasia se extiende en primer lugar avanzando entre el epitelio hasta que es capaz de diseminarse a través de la barrera dermo-epidérmica y generar un carcinoma invasivo.

En lo que se refiere al crecimiento y la extensión de las células malignas, uno de los principales factores que determinan estos parámetros es la estructura y la composición del estroma tumoral, el cual está constituido tanto por células como por la MEC que rodea a las células del parénquima tumoral (75). A este respecto, en la evolución de distintos tumores malignos se ha comprobado que participan no sólo las células neoplásicas propiamente dichas, sino también fibroblastos y células inflamatorias que rodean a las células cancerosas y que forman el estroma tumoral. De hecho, en algunos casos, estas células estromales representan el 50 por ciento de la masa tumoral. Así, las células estromales suelen incluir células inflamatorias que producen abundantes metaloproteasas y otros componentes de la MEC que podrían favorecer la diseminación y metástasis de las células malignas. Todo ello sugiere que el estroma que forma

parte de la masa tumoral podría jugar un papel más relevante en la progresión del cáncer del que tradicionalmente se le había asignado (76), aunque aún es necesario profundizar en el estudio de este componente y en su posible utilidad diagnóstica y pronóstica.

En el caso específico de los tumores de piel se ha demostrado que las células indiferenciadas de tipo mesenquimal que rodean a las células malignas contribuyen decisivamente a la formación del nicho tumoral que mantiene la viabilidad de las células neoplásicas (77). De hecho, se ha demostrado el papel relevante de los fibroblastos del estroma en el cáncer de piel, los cuales interactúan con los queratinocitos neoplásicos y forman parte del nicho que mantiene a las células madre epiteliales (77). Asimismo, estudios recientes sugieren un importante papel de ciertos componentes de la MEC como la decorina. La decorina es un proteoglicano que actúa como ligando de numerosas citoquinas y factores de crecimiento e interactúa con las células a nivel de proliferación, diferenciación, adhesión y metástasis. La decorina evita los procesos de formación de componentes fibrilares como el colágeno y fomenta, procesos proinflamatorios y de proliferación celular en cáncer (75). Otros componentes de la MEC, así como los vasos sanguíneos o nervios existentes en el seno del estroma, podrían participar igualmente en la progresión tumoral.

A pesar de los hallazgos descritos que claramente apuntan hacia un papel fundamental del estroma tumoral en la biología del cáncer de piel, aún es necesario determinar la función de la mayor parte de los componentes del estroma. De este modo, se estará en disposición de desarrollar nuevas herramientas terapéuticas en cáncer de piel basadas en la modificación del estroma utilizando terapias inmunorreguladoras y antiinflamatorias (tales como fármacos tipo imiquimod, esteroides e inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales) y drogas capaces de modificar la composición de dicho estroma, como ya se ha sugerido de forma preliminar (78). Asimismo, numerosos trabajos demostraron el papel de los vasos sanguíneos del estroma en el mantenimiento tumoral, sugiriendo la utilidad de la terapia anti-angiogénica en cáncer.

2.3 Tratamiento quirúrgico de las lesiones neoplásicas

Desde un punto de vista clínico, la mayoría de los CNM se presentan de forma localizada y tienden a crecer y extenderse localmente sin afectar a estructuras vecinas. Sin embargo, existe un subgrupo de CNM que puede tener un comportamiento más agresivo con invasión local extensa, múltiples recurrencias y, en ocasiones, diseminación linfática y e invasión metastásica de órganos distales.

El tratamiento del CNM consiste, fundamentalmente, en la extirpación quirúrgica del total del tumor y de la aplicación de tratamientos locales, lo cual suele ser suficiente en los CNM localizados que no muestran extensión a tejidos periféricos o distales. En general, los tumores de bajo grado se extirpan con un margen de seguridad de entre 4 y 6 mm, suturándose el defecto mediante cierre primario o reconstrucción con colgajo o injerto. Para los tumores de alto grado se recomienda la cirugía micrográfica de Mohs o la resección con suficiente margen de seguridad en tejidos periféricos. Cuando esto no es posible, el tratamiento de elección es la radioterapia y/o la quimioterapia, con resultados muy variables entre pacientes (79).

A pesar de que existen diversas opciones terapéuticas para el tratamiento de los CEC de alto riesgo, la extirpación quirúrgica completa, con márgenes histológicos libres de neoplasia, continúa siendo el tratamiento de elección. Para la extirpación quirúrgica se han de obtener márgenes de escisión oncológica suficientes, de forma que es habitual generar daños que afecten a otros tejidos y órganos, como es el caso de los NPs (79).

2.4 Ingeniería Tisular de la piel

En el caso de la piel, son numerosos los modelos de piel bioartificial generados mediante IT que se han descrito hasta el momento. Aunque muchos de estos modelos han demostrado utilidad terapéutica para el tratamiento de pacientes afectados de graves quemaduras y otras patologías relevantes (80), la utilidad potencial de la piel artificial generada mediante IT no se limita a esta aplicación clínica.

En este sentido, la piel humana artificial constituye un modelo altamente controlado en el que es posible reproducir la fisiología y la fisiopatología de la piel humana en diferentes condiciones experimentales, permitiendo reproducir en laboratorio diversos tipos de enfermedades de la piel que serían muy difíciles de estudiar en el paciente.

Un ejemplo de ello sería el CEC. Para el estudio de este tipo de neoplasia, tradicionalmente se han analizado tumores de distinto grado obtenidos de pacientes afectados de cáncer de piel. Sin embargo, este tipo de muestras únicamente permite estudiar un momento concreto del desarrollo tumoral y no permite realizar estudios evolutivos ni determinar los factores que van ocurriendo a lo largo del tiempo en el tumor. Por el contrario, las biopsias ofrecen una foto fija de uno de los estadios finales del proceso tumoral, una vez que el cáncer de piel se ha desarrollado y presenta sintomatología clínica. A este respecto, el desarrollo de la IT ofrece por primera vez la posibilidad de elaborar en laboratorio modelos tridimensionales de distintos tejidos y órganos humanos capaces de reproducir la patología de diferentes enfermedades humanas, incluyendo los tumores de la piel. Las oportunidades que ofrecen estas técnicas son múltiples pues, por primera vez, los investigadores están en disposición de generar en laboratorio modelos de enfermedad, permitiendo seguir su evolución en cultivo y probar distintos agentes terapéuticos sin necesidad de utilizar animales de experimentación (81).

En lo que respecta a la piel artificial humana, el Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 de la Universidad de Granada ha desarrollado un sustituto de piel humana

(Figura 4) que se está utilizando para el tratamiento de grandes quemados en un hospital de referencia para este tipo de quemaduras con gran éxito hasta el momento, como ha sido comentado en secciones anteriores de esta Tesis Doctoral. Es en este contexto donde se plantea la necesidad de dar un salto cualitativo en el campo de la IT y proceder al diseño y a la fabricación de modelos de tejido humano patológico, siendo este uno de los principales retos de la IT del siglo XXI. Al disponer de una fuente de tejido virtualmente inagotable para experimentación y desarrollo de nuevas terapias, los sustitutos artificiales de la piel humana podrían utilizarse para el desarrollo de terapias útiles en el tratamiento de la patología grave de la piel, incluyendo el cáncer de piel.

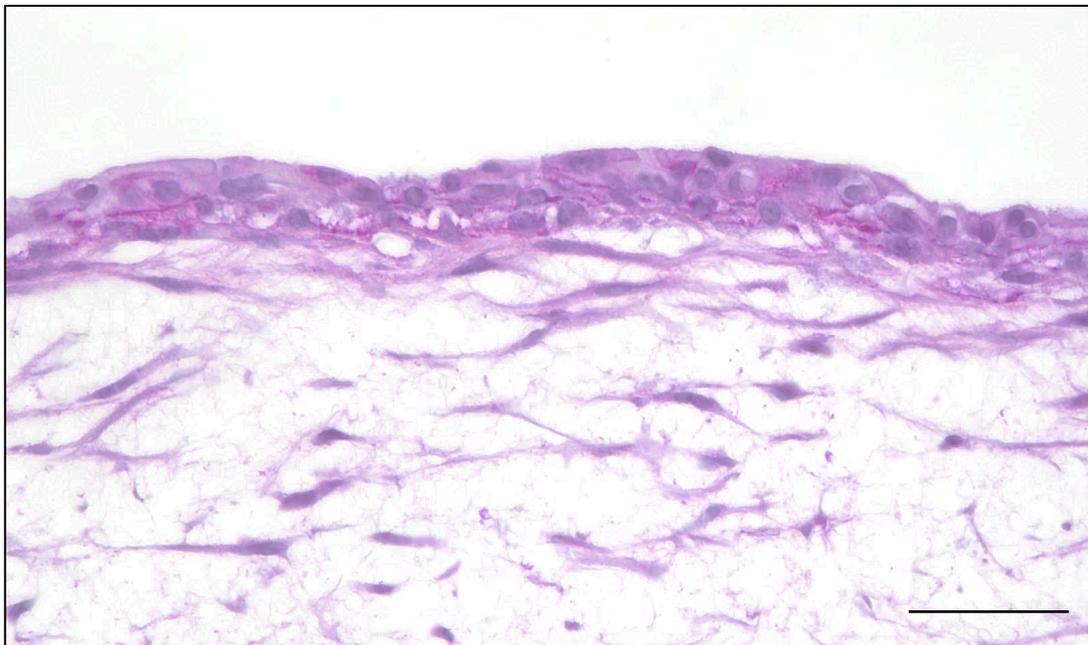


Figura 4: Piel artificial basada en HFA sometida a la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS). Los queratinocitos epidérmicos se organizan en diferentes estratos en la parte superior del HFA que forma el estroma dérmico con fibroblastos humanos. Barra de escala 50 μ m

Hasta el momento, son muy escasos los modelos de tejido humano artificial patológico que se han utilizado para simular un tumor de piel. El primero de ellos fue el modelo de Commandeur (82), que utilizaba un sistema organotípico basado en líneas celulares cultivadas sobre matrices de colágeno de origen animal. Modelos más recientes son los de Brauchle, quien logró generar un sustituto de piel humana utilizando igualmente líneas celulares y biomateriales de colágeno animal (83, 84). Aunque estos modelos suponen un avance en el

campo, ninguna de estas pieles artificiales son plenamente biomiméticas del tejido humano, lo cual obliga a continuar investigando en este campo.

En nuestro caso, el mencionado modelo de piel de fibrina-agarosa desarrollado por el Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 de la Universidad de Granada fue el primero a nivel de la Comunidad Autónoma que obtuvo la aprobación de la AEMPS para uso en pacientes (y el primero en un centro sanitario público en España). A diferencia de los mencionados modelos de Commandeur y Brauchle, el modelo basado en HFA es plenamente biomimético de la piel humana e incluye únicamente células procedentes de la piel humana normal (de cultivos primarios) y biomateriales de fibrina-agarosa altamente biocompatibles. Al tratarse de un modelo totalmente biomimético, es de suponer que su aplicación hacia la generación de piel artificial patológica (modelos de cáncer de piel) sea capaz de reproducir de forma mucho más fidedigna la patología humana. De este modo, se generan herramientas útiles para la investigación de mecanismos biológicos y funcionales de tumorigénesis, progresión y extensión del cáncer de piel en una piel artificial que realmente reproduce las condiciones de la piel humana nativa. Todo ello posibilitaría el estudio de numerosos factores histológicos, genéticos, bioquímicos y biomecánicos relacionados con este tumor (incluyendo el papel del estroma) y, por tanto, la evaluación de protocolos terapéuticos y el ensayo de nuevas terapias basadas en el mencionado modelo.

3 LESIONES DE NERVIOS PERIFÉRICOS

3.1 Conceptos básicos del sistema nervioso periférico

El sistema nervioso es considerado uno de los sistemas más complejos del organismo desde el punto de vista estructural, molecular y funcional. Se trata de una red altamente organizada que se extiende por todo nuestro cuerpo encargada de procesar información y generar respuestas específicas(85). El componente funcional y principal del sistema nervioso es el tejido nervioso, uno de los tejidos fundamentales que constituyen el cuerpo humano (86).

Anatómicamente el sistema nervioso puede dividirse en el sistema nervioso central, compuesto por el cerebro y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico que emerge directamente del sistema nervioso central y está compuesto por órganos altamente especializados llamados NP y ganglios nerviosos (85, 86). Como parte de la presente Tesis Doctoral, se desarrollarán nuevas estrategias de IT para la reparación de lesiones estructurales de NP, por lo cual solo se desarrollará el sistema nervioso periférico en secciones posteriores.

3.1.1. Características histológica

Los NPs son órganos delicados que emergen del sistema nervioso central y crean una red compleja y altamente organizada hasta conectar con los órganos y tejidos diana. Histológicamente, los NP están compuestos por dos tejidos bien diferenciados: el tejido nervioso o parénquima y el tejido conectivo o estroma (39).

Parénquima

El parénquima de los NP está organizado en unidades conductoras especializadas llamadas fibras nerviosas periféricas (FNP), las cuales son capaces de conducir un impulso eléctrico. Esta compleja estructura es la

responsable de transmitir la información hacia y desde el sistema nervioso central a través de impulsos nerviosos aferentes (sensibles) y eferentes (motores) (85-87). Estructuralmente, las FNP están compuestas por el axón neural, la envoltura de la célula de Schwann (CS) y una membrana basal externa. De acuerdo con el mecanismo de interacción de la CS y el axón, las FNP pueden dividirse en fibras nerviosas mielínicas o amielínicas con importantes implicaciones fisiológicas. Las vainas de mielina periféricas son esenciales para reducir la capacitancia iónica a lo largo de la membrana axoplásmica del NP. Estas estructuras aumentan la velocidad del potencial de acción facilitando la conducción iónica en las fibras mielínicas de los NP (69, 85, 87).

Las FNP mielínicas son el resultado de una interacción específica entre una CS única y una región concreta del axón. Cuando una CS rodea un segmento axonal único, elabora una vaina de mielina compuesta por varias capas alrededor del axón. Durante este proceso, la membrana plasmática de la CS se envuelve alrededor del axón (85, 87). Dos porciones opuestas de CS forman el mesaxón interno y externo que comienzan a rodear un segmento axonal y finalmente forman la vaina de mielina por una compresión progresiva de la membrana CS (67, 87-89). Sin embargo, a lo largo de las vainas de mielina se puede encontrar una región no compactada, las incisuras de Schmidt-Lanterman (90, 91). Estas interrupciones oblicuas forman una ruta para el paso de las sustancias a través de las hojas de mielina de la CS y, de hecho, algunos estudios sugieren que las vías de difusión radial para el transporte podrían ser 3 millones de veces más rápidas que la difusión a través del citoplasma (92, 93). Las vainas de mielina son interrumpidas por una región axonal libre llamada nodo de Ranvier. Los nodos de Ranvier son sitios de discontinuidad entre sucesivas vainas de mielina enriquecidos en canales iónicos. En esta región, el axón es descubierto por pequeñas interdigitaciones de las CS adyacentes: los bucles paranodales y las microvellosidades nodales. Esta distribución estructural de las CS en las fibras mielínicas genera segmentos internodales definidos por la longitud de las CS (85, 87, 91).

Las FNP amielínicas están compuestas por varios axones neuronales agrupados por una única CS. Durante la formación de estas fibras, un grupo de axones pequeños son envueltos por una serie secuencial de CS separadas unas de otras por lenguas citoplasmáticas. Las CS que están asociadas con axones amielínicos a menudo se denominan células Remark, ya que Robert Remark fue el primero en reconocer la FNP en 1838. La invaginación de los axones está marcada por una membrana plasmática denominada mesaxón. La membrana de axón y la membrana de mesaxón están separadas, permitiendo que los fluidos de los tejidos endoneurales alcancen el espacio periaxonal. Este espacio intercelular permite la difusión de los iones cuando se produce un potencial de acción (85, 87, 94).

La mayoría de los NPs contienen una mezcla de FNP mielínicas y amielínicas. Esta población heterogénea de FNP es evidente en las secciones transversales de NP teñidas con azul de Toluidina o microscopía electrónica, donde es posible observar diferencias en el diámetro de las fibras, el diámetro de los axones y el grosor de la vaina de mielina (95).

Estroma

Si bien el parénquima, que es el tejido eléctricamente excitable dentro del NP, ha sido objeto de estudio académico e interés clínico durante muchos años, la importancia del tejido estromal ha sido subestimada hasta los últimos años. El tejido conectivo de los NP no sólo proporciona estructura, resistencia mecánica y protección a las FNP, sino que también es la fuente de la vascularización del parénquima y una herramienta vital para la reorientación axonal después de las transecciones de los nervios (85, 87). El tejido estromal rodea las FNP y las aísla del microambiente externo. En las secciones transversales de los NP se observa fácilmente que las FNP están rodeadas por un tejido conectivo laxo denominado endoneuro, que a su vez está limitado por un tejido conectivo fino y más denso, el perineuro (Figura 5). El perineuro es una estructura mecánicamente fuerte que rodea e individualiza los fascículos nerviosos. Además, los fascículos nerviosos están rodeados simultáneamente por un tejido conectivo externo conocido como epineuro que culmina la arquitectura del nervio (69, 85, 87, 96).

El epineuro es la capa externa de tejido conectivo de los nervios que está compuesta por una densa MEC. Esta MEC desempeña un papel fundamental en la resistencia biomecánica bajo las tensiones nerviosas. Está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo I, II y III, seguidas de fibras elásticas. La organización de estas fibras permite cierto grado de torsión pero limita la sobredistensión evitando los desgarros axonales (69, 85, 87, 96).

El perineuro es una capa estromal altamente especializada que se extiende desde el sistema nervioso central y continúa con las cápsulas de los husos musculares y las terminaciones sensoriales encapsuladas. El perineuro desempeña una función protectora crucial en los NP a través de la barrera perineural, ya que la MEC perineural proporciona la mayoría de las propiedades biomecánicas de estos órganos y una barrera de difusión metabólicamente activa (96, 97). Morfológicamente, los colágenos de tipo I y II y las fibras elásticas se organizan en capas concéntricas orientadas en láminas circunferenciales, oblicuas y longitudinales (69). Estas capas organizan las células perineurales y suelen estar rodeadas por una doble membrana basal que, además, aporta componentes moleculares a la barrera perineural impidiendo la difusión de moléculas más grandes. Curiosamente, el epineuro y el perineuro están conectados por una MEC laxa que facilita el deslizamiento de un fascículo independientemente de los adyacentes.

El endoneuro es un tejido conectivo laxo que se encuentra en el compartimento interno de los fascículos de los NP y proporciona un microambiente adecuado para la función del parénquima. Su MEC está altamente organizada en tubos endoneurales de fibras de colágeno compuestos de dos capas distintas (85). La capa externa compuesta por fibras de colágeno orientadas longitudinalmente y la capa endoneural interna compuesta por fibras de colágeno orientadas oblicuamente o circunferencialmente fuera de la membrana basal de la FNP. Dentro del endoneuro se puede encontrar una estructura cilíndrica hialina. Esta estructura se denomina cuerpos de Renault y aunque su función sigue siendo poco clara, probablemente actúa como protección mecánica del parénquima después de neuropatías compresivas (85, 98).

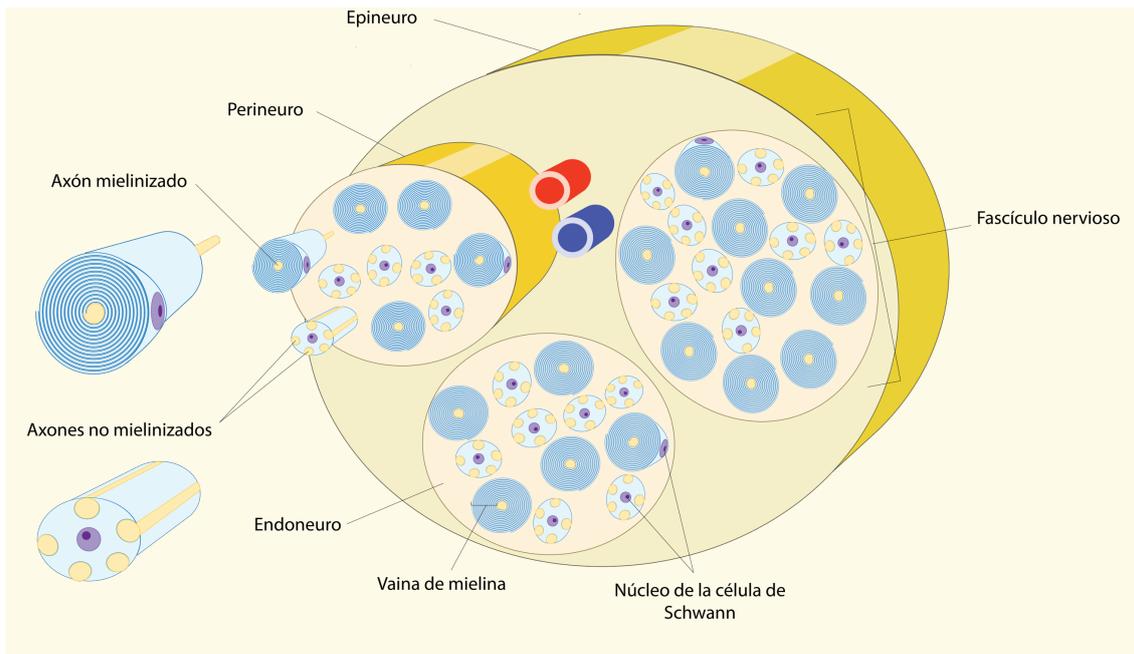


Figura 5. Representación esquemática de la configuración histológica de un NP acompañado de una sección transversal de un nervio multifascicular. En la parte superior se observa la configuración estructural de los componentes fundamentales constituyentes del estroma y parénquima de los NPs. En la parte inferior se identifican los componentes de colágeno y mielina coloreados en rojo y azul respectivamente gracias a la técnica MCOLL.

La vascularización nerviosa comienza por el epineuro donde las arterias segmentarias emiten ramas a lo largo de la longitud del nervio para formar el *vasa nervorum*. Estas ramas se dividen en grandes vasos principalmente longitudinales que se anastomizan formando la red de arteriolas epineurales. Posteriormente, estas arteriolas envían vasos caracterizados por una capa

muscular poco desarrollada en ramas oblicuas que cruzan el perineuro. Una vez en el endoneuro, los vasos sanguíneos se convierten inmediatamente en capilares de gran diámetro, orientados longitudinalmente, que permiten el flujo de sangre en ambas direcciones. Estos vasos sanguíneos establecen la barrera hemato-nerviosa donde también los pericitos endoneurales han demostrado ser esenciales para una correcta función de barrera (87, 96, 99).

3.1.2. Regeneración y degeneración de los nervios periféricos

Parte de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se centraron en la generación de nuevas estrategias de IT para promover y aumentar el potencial regenerativo del NP. En este contexto, esta sección proporciona una información breve pero crucial para entender cómo los NP puede regenerarse después de un daño estructural.

Las patologías de los NP pueden dar lugar a diversos grados de lesión de las fibras nerviosas y pueden clasificarse principalmente en neuropatías periféricas relacionadas con la degeneración axonal o la desmielinización de segmentos, o en lesiones estructurales causadas por la extirpación quirúrgica de tumores o por daños traumáticos (87, 100). En la siguiente sección se analizarán el segundo tipo de neuropatías, es decir las causadas por la extirpación quirúrgica de tumores o por daños traumáticos.

Aunque el NP tiene una capacidad extraordinaria para regenerar su parénquima y su estroma después de un daño estructural bajo un microambiente adecuado, la reinervación de los órganos diana no siempre conduce a una recuperación motora o sensorial adecuada y la mala dirección de los axones conduce a una reinervación inadecuada o parcial de los órganos dianas (101).

Después de las lesiones estructurales del NP, se producen complejos cambios fisiopatológicos no sólo en el lugar de la lesión sino también en los segmentos proximal y distal del nervio y en el cuerpo de las células nerviosas que se describen brevemente a continuación y en la Figura 6.

Los cuerpos neuronales que se encuentran, tras una transección nerviosa, desconectados del axón distal, experimentan un complejo cambio funcional y las neuronas pasan de un estado de transmisión a un estado de regeneración para promover la reconexión axonal (87, 100). La respuesta típica se caracteriza por un aumento del volumen del cuerpo celular acompañado de excentricidad nuclear, retracción de las dendritas y desorganización de los cuerpos de Nissl (cromatólisis). Los cambios metabólicos que se producen en el cuerpo celular provocan una disminución de la síntesis de los productos relacionados con la neurotransmisión y un aumento de la síntesis de las proteínas asociadas al crecimiento y los componentes estructurales de la membrana (102). Además, la axotomía desencadena cambios de iones y cambios de excitabilidad. En este sentido, se insertan en la membrana diferentes tipos de canales de sodio que contribuyen a la hiperexcitabilidad eléctrica. Esta hiperexcitabilidad de la membrana del soma también se acompaña de las descargas ectópicas que se desarrollan en los sitios lesionados y en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal que se cree que juegan un papel crucial en la generación y mantenimiento del dolor neuropático (87, 102, 103).

En el segmento proximal los axones degeneran desde el sitio de la lesión hasta cierta distancia atrás en un proceso conocido como degeneración retrógrada. En este proceso el axón se retrae sobre uno o varios segmentos internodales dejando atrás el compartimiento endoneural como cilindros vacíos (87). Después de algunas horas, surgen espontáneamente brotes terminales y colaterales respectivamente que degeneran rápidamente. El tiempo necesario para que aparezcan los brotes definitivos se ha denominado retraso inicial y va acompañado de una estabilización citoesquelética estructural. El proceso de germinación es altamente complejo con un comportamiento variable intrínseco, en el que se pueden encontrar proyecciones directas, laterales y arbóreas en el mismo modelo de regeneración. Después del brote, los axones avanzan en conos de crecimiento guiados por las CS y la membrana basal de los tubos endoneurales hasta que se reconecta el órgano diana. Tras la reconexión, el axón se agranda radialmente hasta su diámetro de madurez con una maduración progresiva del citoesqueleto (87, 100, 102).

En el segmento distal, inmediatamente después de la transección, comienza un lento proceso de degeneración conocido como degeneración Walleriana. Este proceso implica la degeneración de las vainas de mielina, la proliferación de las CS y el reclutamiento de macrófagos (87, 104). Se produce la degeneración intrínseca del axón lesionado, que es un evento clave en la degeneración Walleriana ya que desencadena una compleja respuesta multicelular. Las membranas axonales se fusionan y sus extremos se sellan mientras que el citoesqueleto se degenera por proteólisis en una desintegración granular. Paralelamente, las vainas de mielina se retraen de los nodos de Ranvier y las incisuras de Schmidt-Lanterman se dilatan para finalmente romper la vaina y formar glóbulos. La degeneración Walleriana se acompaña de una desdiferenciación de las CS y un reclutamiento de respuesta inmune (104). En este contexto, los macrófagos también se acumulan en el lugar de la lesión y no sólo participan en la eliminación de los desechos, sino que también modulan el microambiente local y se polarizan en un fenotipo antiinflamatorio que contribuye a la regeneración axonal (105).

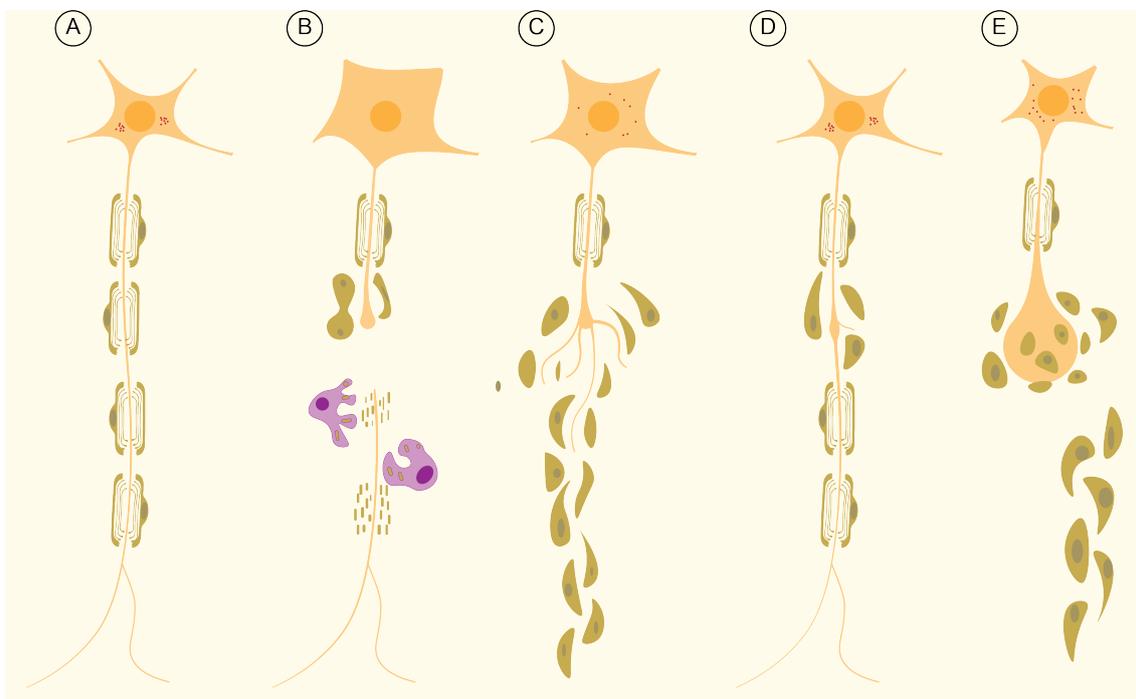


Figura 6. Representación gráfica de los cambios morfológicos después de una lesión del NP. A: Configuración estructural normal de una neurona mielinizada asociada con diferentes CS, B: Tras la transección nerviosa, el soma neuronal aumenta de volumen y el segmento distal entra en una degeneración Walleriana, C: Del extremo proximal surgen espontáneamente brotes terminales al mismo tiempo que las CS proliferan y los guían hasta

el órgano diana, D: Cuando se consigue una reconexión de los órganos distales el axón se agranda radialmente hasta su madurez y se recuperan las características morfológicas normales, E: Cuando los conos de crecimiento no alcanzan el segmento nervioso distal la transección permanente del nervio puede generar neuromas causando daño neuropático crónico.

Durante este complejo proceso, las CS participan activamente en la orientación y el recrecimiento axonal. Una vez que se interrumpe la interacción axón-CS, la vaina de mielina es degradada por los macrófagos y las CS empiezan a proliferar organizarse en columnas. La proliferación comienza a partir de ambos lados del segmento axonal y como resultado forman cordones longitudinales llamados bandas de Büngner (87). Este proceso también se apoya en otras células presentes en el lugar de la lesión que promueven el rebrote axonal, la revascularización y la síntesis de una MEC transitoria (85, 87, 106). Los axones se asocian al crecer distalmente entre sus membranas basales. Luego el brote axonal que surge del segmento proximal intenta alcanzar las columnas de SC para promover la reinervación de los órganos objetivo (85, 87).

En los casos de una lesión nerviosa severa, los axones en regeneración no siempre consiguen cruzar el espacio de lesión y los conos de crecimiento no alcanzan el segmento nervioso distal. Los brotes axonales muestran un crecimiento aberrante y puede generarse en el extremo proximal un neuroma (85, 87). Consecuentemente, la diana distal se denerva crónicamente y a su vez, la transección permanente del nervio puede generar daño neuropático crónico (102, 103).

3.2 Estrategias de reparación de los nervios periféricos

La regeneración nerviosa espontánea descrita en la sección anterior, desafortunadamente solo ocurre bajo circunstancias perfectas y en casos de daños menores nerviosos. La mayoría de las lesiones de NP requieren de intervenciones quirúrgicas para restaurar la continuidad y función nerviosa. Dicha intervención dependerá de factores como la complejidad de la lesión, el tiempo entre lesión y reparación, el tamaño del nervio, y la longitud de la lesión

y la disponibilidad de injertos nerviosos. En la presente sección se discutirán los métodos clínicos utilizados habitualmente: la reparación directa y el uso de auto y alo injertos, mientras que en la sección posterior se discutirán las aproximaciones experimentales por IT (Figura 7).

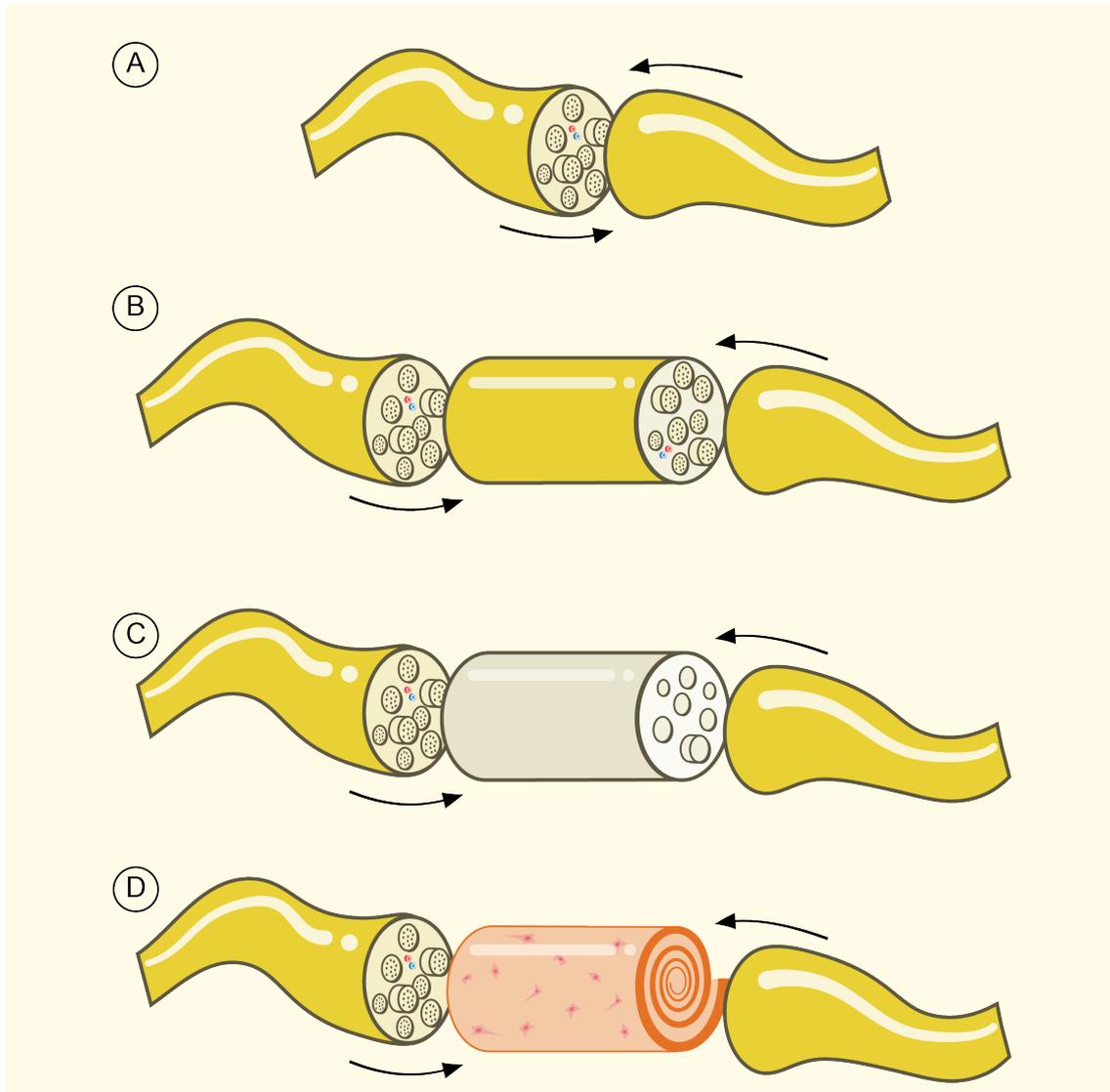


Figura 7. Tratamiento quirúrgico actual y estrategias de IT para las lesiones de NP. A y B estrategias actuales para la reparación de NP, A neurorrafia directa de extremo a extremo, B uso de autoinjertos nerviosos. C y D estrategias por IT para la reparación de NP, C gracias al uso de aloinjertos descelularizados de NP y D a través de sustitutos de nervio bioartificial.

3.2.1. Reparación directa

La reparación directa denominada también neurorrafia de extremo a extremo, puede aplicarse en lesiones nerviosas pequeñas donde se puedan aproximar ambos extremos nerviosos sin tensión. Tras diseccionar el nervio del tejido circundante se obtiene una mayor movilidad y se pueden salvar distancias más grandes. Con esta técnica, ambos extremos nerviosos quedan suturados juntos gracias a suturas epineurales o perineurales, o una combinación de ambas. Sin embargo, es importante que la reparación directa se haga con un ajuste fascicular de ambos extremos, proximal y distal, para recuperar la funcionalidad nerviosa (107). Sin embargo, la reparación directa de extremo a extremo no suele ser una opción en los traumas complejos debido al daño segmentario del nervio o la imposibilidad de hacer una reparación libre de tensión (39, 87, 100, 107).

3.2.2. Autoinjertos

Tradicionalmente, para las reparaciones de lesiones nerviosas grandes, segmentarias o complejas donde se ha producido la pérdida de sustancia, se han utilizado injertos nerviosos autólogos, es decir, autoinjertos. Los autoinjertos son el tratamiento actual más utilizado en este tipo de lesiones pues proporcionan los componentes necesarios para la regeneración nerviosa, incluidas CS viables, tubos endoneurales y MEC propia del tejido a reparar. Además, como el injerto es obtenido del mismo paciente no se requieren procesos de inmunosupresión, pero sí una segunda intervención (39, 107, 108).

Sin embargo, el uso de autoinjertos desgraciadamente tiene algunas desventajas como la necesidad de una segunda intervención quirúrgica y la morbilidad en el sitio donante acompañada del desarrollo de un posible neuroma. Además, la incapacidad de utilizar nervios motores lleva consigo la dificultad de regenerar este tipo de nervios pues se ha demostrado que los injertos nerviosos sensitivos resultan en recuperación funcional deteriorada de los nervios motores (109). Es por ello que los autoinjertos se asocian con un mayor tiempo operatorio, pérdida sensorial, formación de cicatrices y la formación de neuromas

debilitantes. Todo ello se refleja en la tasa de éxito de estos injertos que no supera el 50% en pacientes (39, 87, 100, 109, 110).

3.2.3. Aloinjertos

Algunas de las limitaciones consideradas con los autoinjertos nerviosos pueden ser superadas por los aloinjertos como la necesidad de una segunda intervención que es evitada gracias a la recolección de aloinjertos nerviosos de donantes vivos o cadavéricos. Además, cuando los aloinjertos provienen de donantes cadavéricos no encontramos limitaciones en longitud ni complejidad nerviosa facilitando de esa forma una mejor coincidencia en tipo de nervio, diámetro o número de fascículos (39, 107, 111, 112).

Los aloinjertos presentan además las principales ventajas de los autoinjertos, como la de poseer la arquitectura típica de un nervio nativo y los componentes propios de la MEC. Sin embargo, el principal problema se genera en tanto en cuanto la respuesta inmunitaria del paciente detecta el injerto como extraño. Se producen entonces reacciones inmunitarias adversas a la integración del injerto que requieren del uso intenso de inmunosupresores durante aproximadamente 18 meses poniendo al paciente en riesgo de infecciones oportunistas e incluso de neoplasias (39, 107, 111-113).

3.3 Ingeniería Tisular del nervio periférico

Hasta la fecha, el tratamiento de los pacientes con pérdida o daño total o parcial de NP es un gran desafío en la práctica clínica. Las limitaciones de las actuales terapias han conducido la investigación hacia la búsqueda de nuevas alternativas para la generación de sustitutos nerviosos por IT.

El gran reto de la IT es el de generar un sustituto neural adecuado para reparar grandes lesiones nerviosas, y que proporcionen un microambiente proregenerativo mientras mantenga la fuerza mecánica suficiente para proteger y aislar la zona de intersección. Además, estos sustitos deben proveer la resistencia mecánica necesaria para resistir las fuerzas de tensión y compresión,

y proteger la regeneración tisular a lo largo de la zona de intersección. Esta zona es el área crítica entre los segmentos nerviosos proximales y distales en la que el proceso de regeneración debe avanzar para reinervar los tejidos y órganos distales. Es importante entonces conocer los procesos que acontecen en esta zona crítica en aquellos casos en los que se necesita un material guía para reconectar ambos extremos nerviosos. En este contexto, se pueden diferenciar cinco fases principales que ocurren de forma secuencial en la zona de intersección: la fase de fluido, la fase de matriz, la fase de migración celular, la fase axonal y la fase de mielinización (39, 54, 100, 110). En la fase inicial, la brecha se llena con un influjo de exudado plasmático procedente de los segmentos proximal y distal, que contienen principalmente factores neurotróficos, precursores de la MEC. A continuación, se forma una MEC laxa, compuesta en su mayor parte por un coágulo de fibrina que conecta ambos segmentos nerviosos. Posteriormente comienza la migración celular alrededor de la segunda semana y células de ambos segmentos comienzan a migrar progresivamente, alineándose y en esta MEC de fibrina transitoria (39, 110). Con el avance de la migración celular, las células producen un MEC más estable mientras degradan progresivamente la fibrina. Ahora el estroma regenerado proporciona los factores físicos y químicos necesarios para promover y guiar la regeneración axonal desde el segmento proximal al distal. Después de la fase axonal comienza la fase de mielinización, en la que las CS cambian su fenotipo y comienzan a envolver axones estabilizados y más maduros para formar la vaina de mielina, lo que da lugar a cierta reparación funcional (39, 54, 110).

A continuación, se discutirán algunas de las aproximaciones más comúnmente utilizadas que están generando resultados prometedores en estudios preclínicos.

3.3.1. Descelularización

En los últimos años, la descelularización se ha descrito como un método eficiente para la generación de andamiajes biológicos a partir de tejidos nativos para diferentes aplicaciones en la IT (39, 49, 51-53). Este método se diseñó con el fin último de eliminar la respuesta inmunitaria que desencadena la introducción de

injertos no autólogos en el huésped. Como las moléculas de la MEC se encuentran altamente conservadas entre individuos e incluso entre especies, la respuesta inmunitaria dependerá principalmente en la presencia del material celular del injerto (114). Es por ello que este método pretende eliminar el contenido celular del tejido (para evitar el rechazo del huésped), manteniendo a su vez la estructura tridimensional de la MEC. Estos aloinjertos descelularizados presentan numerosas ventajas con respecto a las terapias utilizadas actualmente ya que eliminan la necesidad de una segunda intervención quirúrgica y la morbilidad en el sitio donante acompañada de un posible neuroma asociada con el uso de autoinjertos nerviosos, al igual que generan un recurso ilimitado de injertos listos para su utilización.

Para determinar la eficacia de la descelularización Crapo *et al* (114) fijaron un criterio para cuantitativamente determinar los límites para aceptar una descelularización tisular. Propusieron que la eliminación del material nuclear: fuera inferior a 50ng de ADN de doble cadena por mg de peso seco de tejido, fuera menor a 200 pb de longitud de ADN y que no se pueda encontrar material nuclear visible en secciones tisulares teñidas con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o hematoxilina-eosina (HE). Para cumplir los criterios mencionados anteriormente la descelularización puede realizarse mediante el uso de métodos químicos, físicos y/o una combinación de ambos. La elección del método de descelularización dependerá mayoritariamente de la naturaleza y composición molecular del tejido en cuestión.

En este sentido, en las últimas décadas se han desarrollado diferentes aloinjertos nerviosos descelularizados que han mostrado resultados experimentales prometedores (39, 49), e incluso algunos han sido aprobados por la FDA para su uso en humanos (115). En general, la mayoría de la literatura reciente reafirma la utilización de detergentes como el método más eficiente para la eliminación del componente celular en los NP (50, 116, 117) o para la generación de hidrogeles de base natural (118).

Para mejorar la descelularización de los tejidos y la conservación de la MEC, algunos autores combinaron eficazmente diferentes detergentes con agentes de

descelularización (químicos o biológicos) o métodos (físicos y químicos) con resultados prometedores (51, 117). Pese al uso extendido de los detergentes para la generación de sustitutos nerviosos descelularizados, muchas son las investigaciones que están optando por combinar estos agentes decelularizantes con enzimas específicas que favorezcan la eliminación de la información genética de las células. A este respecto, en un reciente estudio demostró que la combinación de detergentes anfotéricos y nucleasas son estrategias eficaces para eliminar eficazmente las células y preservar la compleja MEC de aloinjertos de NP(49). Este estudio demostró una tasa de descelularización exitosa y una preservación de las moléculas fibrilares y no fibrilares de la MEC, así como unas propiedades biomecánicas adecuadas *ex vivo* (49). Posteriormente, este mismo aloinjerto descelularizado ha demostrado su utilidad para la reconstrucción de lesiones del nervio ciático de 10 mm en ratas con una alta regeneración tisular y recuperación funcional (119).

3.3.2. Conductos bioartificiales

Los sustitutos de nervio artificial (SNA) son una alternativa al uso del autoinjerto para reparar lesiones nerviosas. Estas estructuras tubulares se diseñan para crear un microambiente controlado donde pueda darse la regeneración nerviosa de forma que incremente el número, la velocidad y la longitud de los axones en regeneración (39, 120-122).

Para generar SNA por IT, además de cumplir con los criterios establecidos en secciones anteriores, el sustituto de nervio bioartificial (SNB) ha de ser capaz de guiar a los axones en regeneración hacia el extremo distal a la vez que limitar la generación de axones mal direccionados desde el extremo proximal. Además, los SNB se deben caracterizar también por favorecer la difusión de nutrientes, mientras evitan la formación de tejido cicatricial y neuromas (39, 54, 101, 122).

La primera generación de SNB consistían en tubos vacíos que permitían el aislamiento del ambiente regenerativo, evitando de esa forma la dispersión de factores críticos para la regeneración. Uno de los SNB más utilizadas en el ámbito clínico es el conducto de colágeno comercial liofilizado de tipo I lleno de

solución salina denominado (115), que ha demostrado ser eficaz en modelos de reparación nerviosa en ratas y monos y está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en seres humanos (115, 123). Sin embargo, su eficacia disminuye ante defectos nerviosos largos o complejos (25, 39, 54, 110, 123).

Aunque muchos de estos SNB han obtenido la aprobación por la FDA (115) para su uso clínico, los resultados clínicos no superaban los niveles de regeneración del autoinjerto, probablemente debido a la ausencia de estructuras guías dentro de los mismos. Por consiguiente, la segunda generación de SNB se centró en la generación de diseños complejos con mayor capacidad de conducción de los brotes axonales (39, 54, 120-122). Esta segunda generación de SNB no se desarrolla únicamente con una mayor complejidad estructural, sino también biológica, reflejando una MEC más parecida a la nativa. Desde el punto de vista físico y estructural, se obtuvieron importantes avances mediante la incorporación de biomateriales o nanofibras alineadas al microambiente regenerativo (39, 40, 122). Desde el punto de vista biológico, algunos autores demostraron un aumento significativo de la regeneración de las NP mediante el uso de biomateriales funcionalizados y biológicamente activos gracias a la incorporación de factores de crecimiento y, especialmente, mediante la incorporación de biomateriales que contienen diferentes fuentes celulares (39, 124-127). Estos avances sugieren que la regeneración nerviosa se produce más eficientemente en tanto en cuanto más nos acercamos al microambiente y la estructura regenerativa biomimética (39, 40, 109, 122).

En este sentido y como hemos comentado en secciones anterior nuestro grupo de investigación desarrolló un hidrogel híbrido natural y biodegradable compuesto por fibrina humana y agarosa tipo VII (55). Este HFA ya demostró, combinado con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo e introducido como relleno intraluminal de un conducto de colágeno comercial, proporcionar un microambiente adecuado proregenerativo que dio lugar a una mejora significativa de los perfiles clínicos, funcionales, electromiográficos e histológicos (11, 46). Estos estudios anteriores sugieren que los conductos de colágeno comercial y el HFA celular contribuyeron sinérgicamente al proceso de

regeneración del NP y a la reinervación de los órganos diana distales. A pesar de estos resultados, el HFA no tiene las propiedades biomecánicas adecuadas para ser utilizados directamente en la reconstrucción del NP por sí mismos.

En este contexto, se demostró recientemente que las propiedades biomecánicas y estructurales del HFA pueden mejorarse significativamente de forma controlada con la técnica de nanoestructuración (11, 41). Este proceso de fabricación permitió recrear con éxito el tamaño y la forma de los NP con propiedades estructurales, biomecánicas prometedoras, acompañadas de una alta biocompatibilidad *ex vivo*(11). Sin embargo, aún no se ha estudiado la posible utilidad clínica del sustituto de nervio bioartificial basado en fibrina-agarosa nanoestructurado (SNBFAN).

Debido a las prometedoras propiedades estructurales y biológicas que ofrece el nuevo SNBFAN para la reconstrucción de NP, y en vista de los supuestos efectos sinérgicos de los conductos de colágeno HFA y conductos de colágeno comerciales, se ha realizado, como parte de la presente Tesis Doctoral, un estudio *in vivo* para determinar la utilidad de estos sustitos en la reparación del NP.

IV HIPÓTESIS

La elaboración de modelos biomiméticos de cáncer de piel humana que reproduzcan fielmente esta patología en el laboratorio generaría una herramienta para el estudio de los mecanismos que rigen la biología tumoral, la extensión y la metástasis, posibilitando de este modo un mejor conocimiento de la biología del cáncer de piel y el desarrollo de nuevos tratamientos para esta patología. La aplicación de métodos y técnicas de biofabricación optimizadas en el grupo de investigación y aplicadas a la generación de modelos de neoplasias de piel artificial permitirá generar modelos biomiméticos de piel patológica de CEC basados en biomateriales de fibrina-agarosa. Las estrategias propuestas en esta Tesis Doctoral podrían aportar nuevos conceptos en el ámbito de la carcinogénesis y la progresión tumoral de la piel.

Del mismo modo, el desarrollo de esta Tesis Doctoral aspira a estudiar la utilidad del biomaterial de fibrina-agarosa para la reconstrucción y regeneración del NP humano. La generación de nuevos sustitutos de NP a partir de estos biomateriales combinados con células madre mesenquimales podría suponer un avance importante en el campo de la IT y contribuiría a la reparación microquirúrgica de lesiones críticas de NP que actualmente no disponen de un tratamiento altamente eficaz. Los sustitutos bio-artificiales generados mediante la combinación de biomateriales, células madre y técnicas de nanoestructuración permitirá crear sustitutos nerviosos que aportarán factores moleculares básicos para promover la regeneración tisular.

Por todo ello, las estrategias propuestas en este proyecto de Tesis Doctoral aportarán nuevos enfoques relacionados con la utilidad potencial de los biomateriales de fibrina-agarosa desarrollados por el Grupo de Investigación utilizados en diferentes aplicaciones relacionadas con la IT.

V OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo general de este proyecto de Tesis Doctoral es desarrollar nuevos modelos biomiméticos de cáncer de piel no melanoma basados en biomateriales de fibrina-agarosa para evaluar mecanismos biológicos y protocolos terapéuticos en oncología, así como generar y determinar el perfil de regeneración tisular y recuperación funcional *in vivo* de nuevos sustitutos de NP generados con los mismos biomateriales.

Objetivos específicos:

1. Generar nuevos modelos biomiméticos de cáncer de piel no melanoma mediante la utilización de hidrogeles de fibrina-agarosa, células epiteliales, células estromales y células cancerígenas.
2. Evaluar el modelo a nivel histológico para determinar los procesos celulares y moleculares involucrados en la progresión tumoral *in vitro*.
3. Generar nuevos sustitutos neurales bio-artificiales del nervio periférico mediante la combinación de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa y células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo.
4. Determinar el perfil de regeneración tisular y recuperación funcional en el tratamiento de lesiones de 10 mm en un modelo animal de daño nervioso irreversible.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

1 GENERACIÓN DE MODELOS BIOMIMÉTICOS DE CÁNCER DE PIEL NO MELANOMA:

1.1 Muestras y obtención de cultivos primarios

En este proyecto de Tesis Doctoral se han utilizado varias fuentes celulares para generar el modelo de CNM. Concretamente para la constitución del epitelio se utilizaron dos líneas celulares ampliamente descritas en la literatura: la línea celular A431 y la línea celular Ker-CT ambas adquiridas en ATCC. La línea celular A431 se establece a partir de un carcinoma epidermoide de una mujer de 85 años de edad derivado de tumores sólidos (128). La línea celular Ker-CT es una línea celular inmortalizada derivada de queratinocitos epidérmicos humanos normales provenientes de un paciente hombre sano; esta inmortalización se llevó a cabo mediante la sobreexpresión de telomerasa y Cdk4 utilizando vectores retrovirales (129) y demostró mantener las características típicas de queratinocitos humanos en cultivos organotípicos (130, 131).

Para la generación del estroma dérmico se utilizaron fibroblastos humanos que fueron aisladas de biopsias de tejido sano tal y como se describió previamente(6, 7, 10). Los fibroblastos se obtuvieron gracias a pequeñas biopsias de piel humana normal de donantes sanos sometidos a cirugía menor en el Departamento de Cirugía Plástica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, España. Los fibroblastos se obtuvieron gracias a la disgregación en pequeños fragmentos del tejido conectivo de manera mecánica para posteriormente digerirla enzimáticamente mediante una mezcla de Dulbecco's Eagle modificado (DMEM) y 2 mg/ml de Clostridium histolyticum colagenasa I (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) a 37°C. Los fibroblastos desprendidos se recogieron por centrifugación y se expandieron en frascos de cultivo(7, 8, 44).

Los fibroblastos se cultivaron en medio comercial DMEM suplementado con 1% de solución de antibióticos y 10% de suero fetal bovino (DMEMc). El mismo medio también se utilizó para cultivar la línea celular A431. La línea celular Ker-

CT se cultivaron en una mezcla 3:1 de DMEM y medio de cultivo Ham F12 complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de antibióticos, 24 g/ml de adenina, 0,4 g/ml de hidrocortisona, 5 g/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina de cólera (todos de Sigma-Aldrich) (7, 58, 65). Nos referimos a este medio como medio QC.

Ambas estirpes celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (37° C y 5% de CO₂), el medio de cultivo se renovó cada tres días y la confluencia se controló diariamente mediante microscopía de contraste de fase (Nikon, Eclipse Ti-U). Los cultivos subconfluentes se trataron con tripsina-EDTA (Sigma Aldrich) y se subcultivaron en nuevos frascos de cultivo.

1.2 Generación de hidrogeles de piel humana normal y carcinoma.

Los modelos de piel humana normal y carcinoma se generaron utilizando insertos porosos de 0.4 µm de 1,1 cm² (Starstedt, Alemania), como se describió anteriormente (7, 8, 59). Brevemente, el estroma se generó por primera vez utilizando una mezcla de fibrina humana obtenida del plasma sanguíneo y de agarosa tipo VII al 0,1% en PBS. Para producir el sustituto dérmico de 1 ml, se añadieron 760 µl de plasma humano a 125 µl de DMEM. Para prevenir la fibrinolisis en gel, la mezcla fue complementada con 15 µl de ácido tranexámico (Amchafibrin, Fides Ecopharma, España). Luego se añadieron 50 µl de CaCl₂ al 2% para inducir la polimerización de la fibrina, seguida de la adición inmediata de 50 µl de agarosa concentrada derretida (2% en PBS) a 40°C. La concentración final de agarosa en el sustituto del estroma fue del 0,1%. Finalmente, la mezcla fue rápidamente alicuotada en insertos porosos y se dejó solidificar a 37°C durante 2 h.

Es estos HFA se incorporarán diferentes tipos celulares para configurar los siguientes grupos de estudio que reflejan los diferentes estadios de extensión del cáncer melanoma según la profundidad de las células malignas. Además, para estudiar la influencia del estroma celular en los modelos de piel ortotípicos

se generarán estromas celulares y acelulares. En esta línea se configuraron los siguientes grupos experimentales (Figura 8):

-Grupo Control: piel humana artificial ortotípica generada con un estroma que contiene 300.000 fibroblastos humanos de piel y un epitelio compuesto por 56.500 queratinocitos humanos no patológicos de la línea KerCT.

- Grupo Control acelular: piel humana artificial con estroma acelular y un epitelio compuesto por queratinocitos no patológicos 56.500 queratinocitos de la línea KerCT.

- Grupo CEC: Cáncer de piel no melanoma en distintos estadios histológicos de extensión de las células malignas con estroma artificial ortotípico. Este modelo fue generado con un estroma que contiene 300.000 fibroblastos humanos de piel y un epitelio compuesto por 56.500 queratinocitos humanos patológicos CEC de la línea celular A431.

- Grupo CEC Acelular: Cáncer melanoma en distintos estadios histológicos de extensión de las células malignas con estroma artificial acelular. El cual fue generado con un estroma acelular y un epitelio compuesto por 56.500 queratinocitos humanos patológicos CEC de la línea A431.

Finalmente, los modelos de piel se cultivaron durante 2 días sumergidos en el medio de cultivo para posteriormente ser sometidos a una técnica de cultivo aire-líquido durante 14 días para inducir la diferenciación adecuada del epitelio multicapa. Los tejidos se mantuvieron en cultivo a 37°C con un 5% de CO₂. Se tomaron muestras para su análisis en el momento del cambio de fase aire-líquido y posteriormente cada 2 días para ver la evolución temporal del CEC.

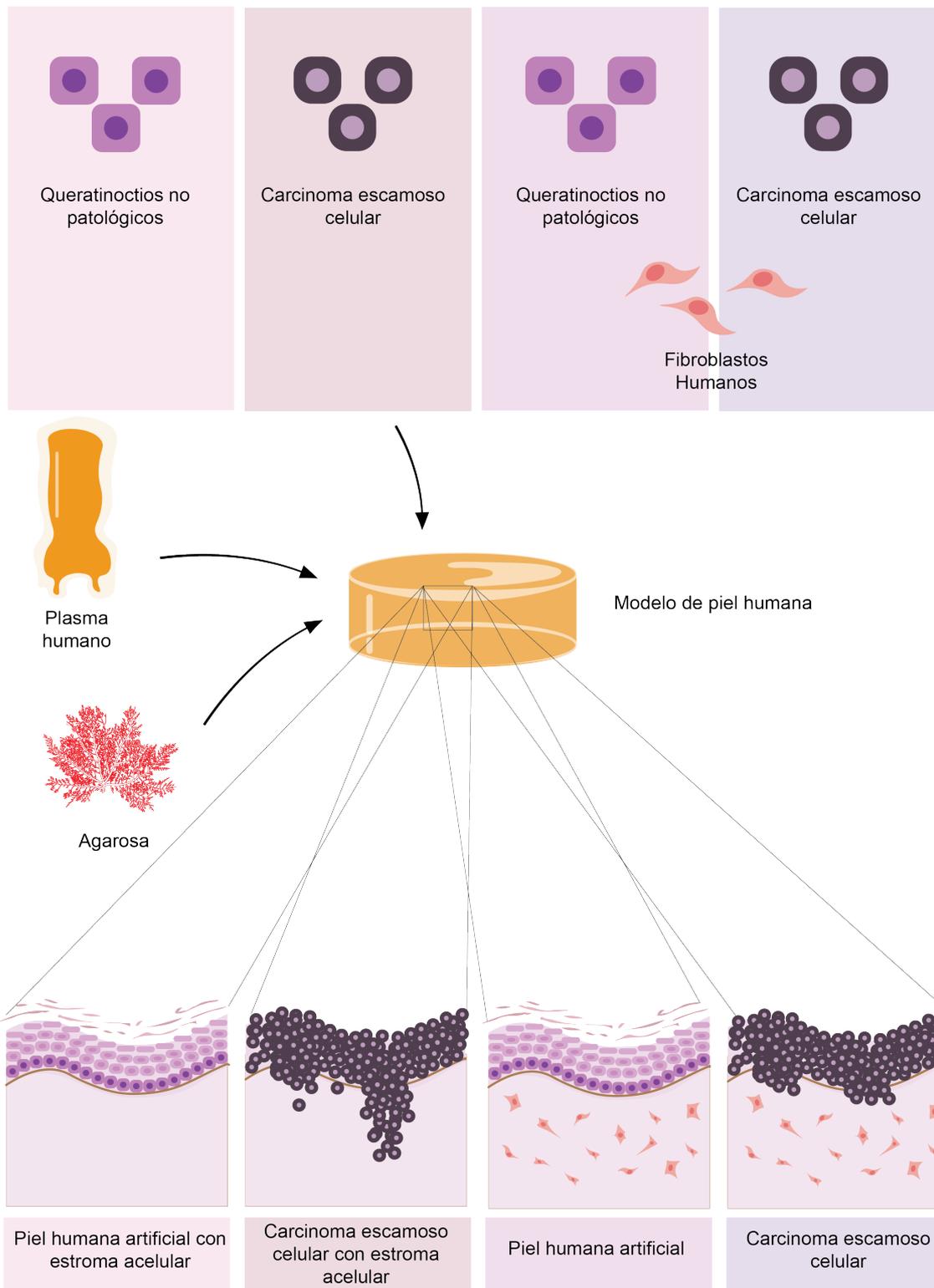


Figura 8: Generación de hidrogel de piel humana normal y carcinoma. Todos los modelos se generan utilizando el HFA combinando diferentes componentes celulares. Para la generación de los modelos con estroma acelular se siembran en la superficie del hidrogel queratinocitos no patológicos y células derivadas de CEC para el modelo control y patológico respectivamente. Para la generación de modelos con estroma celular además se introducen fibroblastos humanos en el HFA.

1.3 Caracterización histológica y estructural

Para determinar los patrones estructurales existentes en los diferentes modelos creados en este proyecto, se utilizaron técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas (IHC). Para los análisis histológicos, los distintos modelos de piel se fijaron en formalina neutra al 10% y se incluyeron en parafina. Los cortes histológicos fueron teñidos posteriormente con hematoxilina-eosina (HE). En cada muestra, se determinaron parámetros de integridad, morfología celular y estructura del estroma. Para el análisis de la MEC, se utilizaron los métodos de tinción de azul alcian (AB), ácido peryódico de Schiff (PAS) y rojo picrosirius (PS) para estudiar la presencia de glucosaminoglicanos, carbohidratos y fibras de colágeno. Con el fin de determinar el comportamiento biológico de las células tumorales frente a la piel no tumoral se utilizaron técnicas IHC. En este sentido se evaluó la proliferación celular, la expresión de CKs basales y superficiales, las uniones intercelulares y la formación y/o degradación de la membrana basal.

Los detalles técnicos de los procedimientos IHC y los anticuerpos utilizados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para la detección IHC

Anticuerpo	Dilución	Pretratamiento	Nº Catálogo
Rabbit anti-cytokeratin 5	Ready to use	Citrate buffer, pH 6, 95°C for 25 min	Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000491QD
Mouse anti-cytokeratin 10	Ready to use	Citrate buffer, pH 6, 95°C for 25 min	Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000150QD
Mouse anti-cytokeratin (AE1-AE3)	Ready to use	EDTA, pH 8, 95°C for 25 min	Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-001000QD
Rabbit Anti-Human Ki-67	Ready to use	EDTA, pH 8, 95°C for 25 min	(Clone SP6) Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000310QD
Mouse anti-human PCNA	Ready to use	EDTA, pH 8, 95°C for 25 min	(Clone PC10) Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000903QD
Mouse anti-claudin-1	Ready to use	Citrate buffer, pH 6, 95°C for 25 min	Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000523QD
ImmPRESS™ anti-rabbit IgG (peroxidase)	Ready to use	-	Vector® Laboratories; MP-7401
ImmPRESS™ anti-mouse IgG (peroxidase)	Ready to use	-	Vector® Laboratories; MP-7402

2 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DE NERVI PERIFÉRICO:

2.1 Generación de sustitutos 3D bio-artificiales con biomateriales naturales y células mesenquimales

En esta Tesis Doctoral se utilizaron células madre mesenquimales del tejido adiposo. Estas células fueron aisladas a partir de una biopsia de la grasa inguinal de ratas Wistar, para lo cual se siguieron protocolos previamente descritos (46). Concretamente, las biopsias de tejido adiposo fueron mecánicamente fragmentadas en pequeños trozos y digeridas con solución de colagenasa tipo I al 0,3% (Gibco BRL Life Technologies) durante 8 h en 37°C. Una vez se digirió la MEC, se aislaron las células por centrifugación y luego se cultivaron en un medio basal DMEM complementado con un 10% de FBS y una solución de cóctel antibiótico-antimicótico (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% de CO₂), el medio de cultivo se renovó cada 3 días y las células se expandieron hasta el pase IV.

El perfil expresión de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo de rata se determinó mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia como se ha informado anteriormente (132, 133). La citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo NovoCyte® 1000 (ACEA, Biosciences Inc., Estados Unidos) y las células demostraron ser positivas para los marcadores CD 90 (99,43%) y CD 29 (99,67%) y negativas para los marcadores CD 45 (0,07%). Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia y la información técnica de los anticuerpos utilizados se pueden encontrar en la Figura 11 y la Tabla 2, respectivamente.

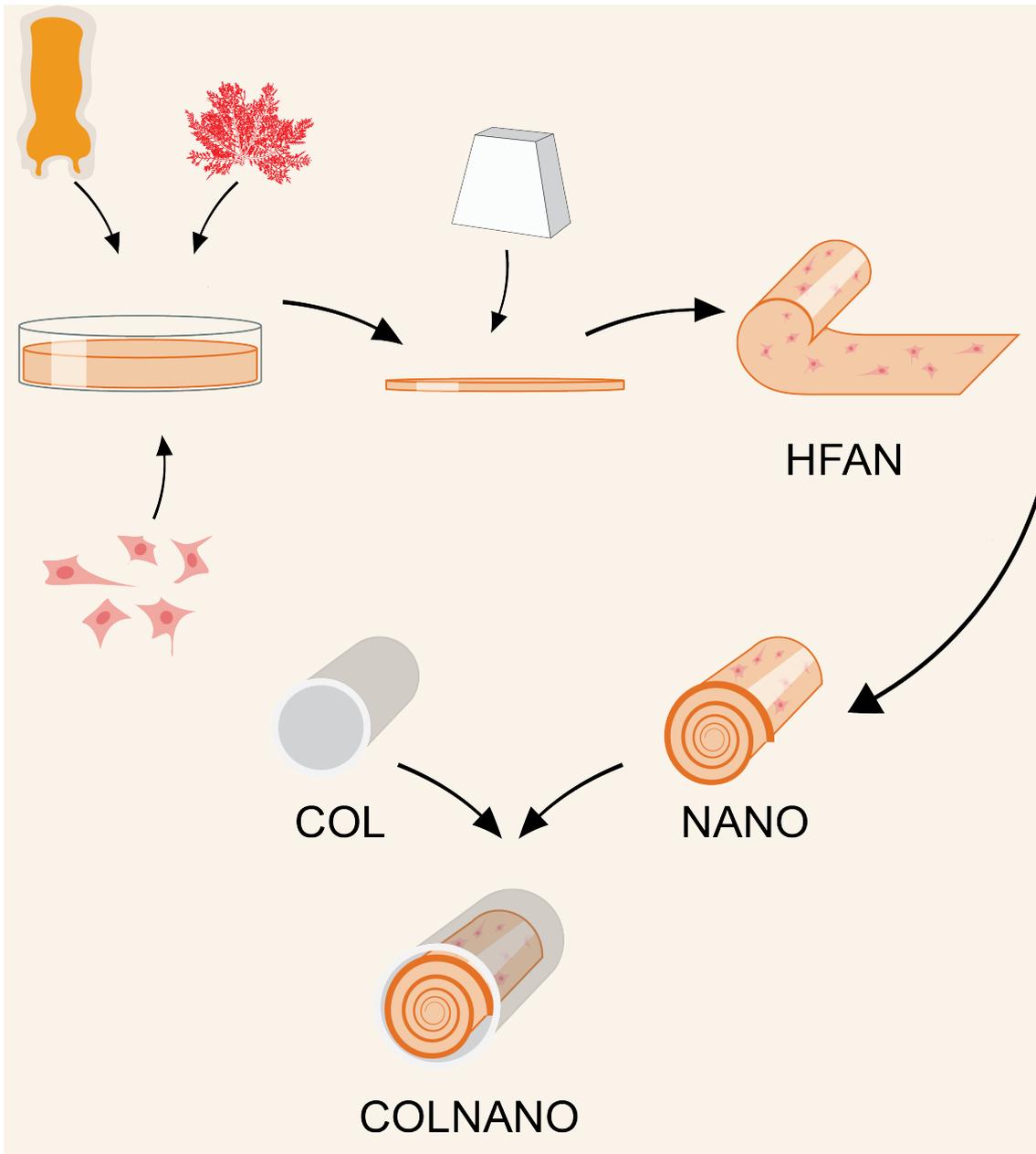


Figura 9. Representación esquemática de la fabricación de sustitutos bio-artificiales a partir de HFAN con células madre mesequimales del tejido adiposo. Se muestra cómo a partir de un FAH sin comprimir es posible fabricar un SNBFAN cilíndrico multicapa de dimensiones deseadas.

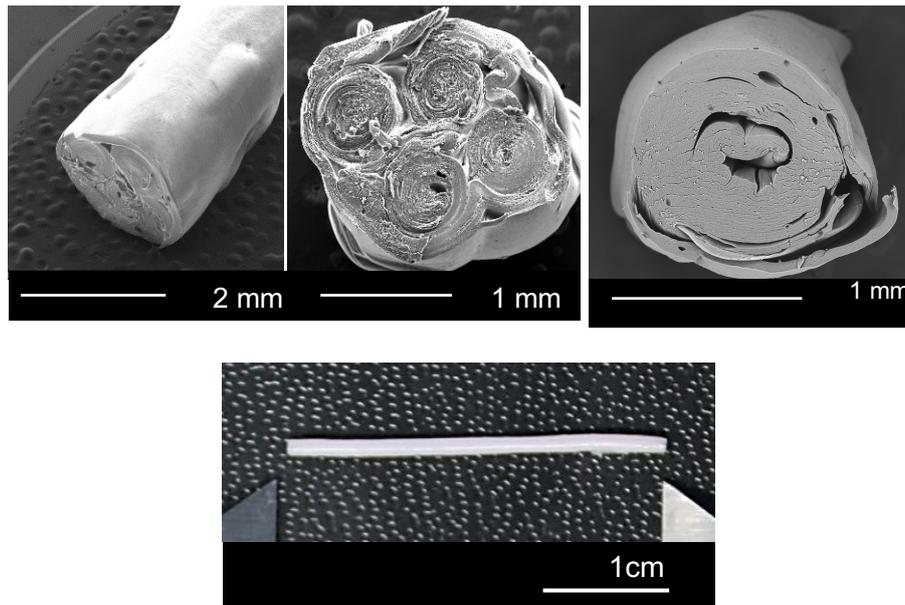


Figura 10: Aspecto macroscópico y de microscopía electrónica de barrido de los SNBFAN. Se muestran ejemplos de los SNBFAN utilizados para reparar el defecto nervioso en este estudio y ejemplos de SNBFAN multifasciculados que pueden generarse con esta metodología si es necesario.

En segundo lugar, los HFA que contienen células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo se elaboraron con una mezcla compuesta por 7,6 ml de plasma humano, 0,15 ml de ácido tranexámico (Amchafibrin, Fides Ecopharma, España) y 1,25 ml de medio basal conteniendo 5×10^4 células/ml. Posteriormente se añadió 1 ml de CaCl_2 al 2% y 0,5 ml de agarosa tipo VII, que se mezclaron cuidadosamente y se decantaron en placas de Petri de 60 mm para mantenerse en condiciones de cultivo estándar hasta su completa gelificación. Tras la gelificación, se añadieron 5 ml de medio basal a cada constructo para su posterior mantenimiento en cultivo durante 24h.

Para generar el SNBFAN, se siguió un protocolo anteriormente descrito que nos permitió producir sustitutos personalizados con propiedades biomecánicas y dimensiones específicas que aseguraban la viabilidad y funcionalidad celular (11). Brevemente, los HFA fueron cuidadosamente desmoldados de las placas de Petri y luego nanoestructurados. Los hidrogeles se cortaron simétricamente ($3 \times 3 \times 3$ cm) para luego colocarlos entre un par de membranas de filtros de nylon ($0,22 \mu\text{m}$) y papeles absorbentes de 3 mm de Whatman debajo de una superficie de vidrio plano. Inmediatamente después se aplicó una presión

mecánica uniforme y homogéneamente distribuida (500 g) durante 2,5 min, obteniendo un HFA nanoestructurado de alta densidad (HFAN) (11, 41). En este punto, se pudo fabricar SNBFAN con dimensiones específicas (longitud y/o diámetro) o número de fascículos (uni-fascicular o multi-fascicular). En este caso, se generaron SNBFAN uni-fasciculares compuestos por HFAN multicapa de 1 cm de longitud y aproximadamente 1,5 mm o 1 mm de diámetro, basados en las dimensiones del nervio ciático de rata adulto, y de acuerdo con la longitud de la lesión de nervio a reparar (Figura 9 y 10).

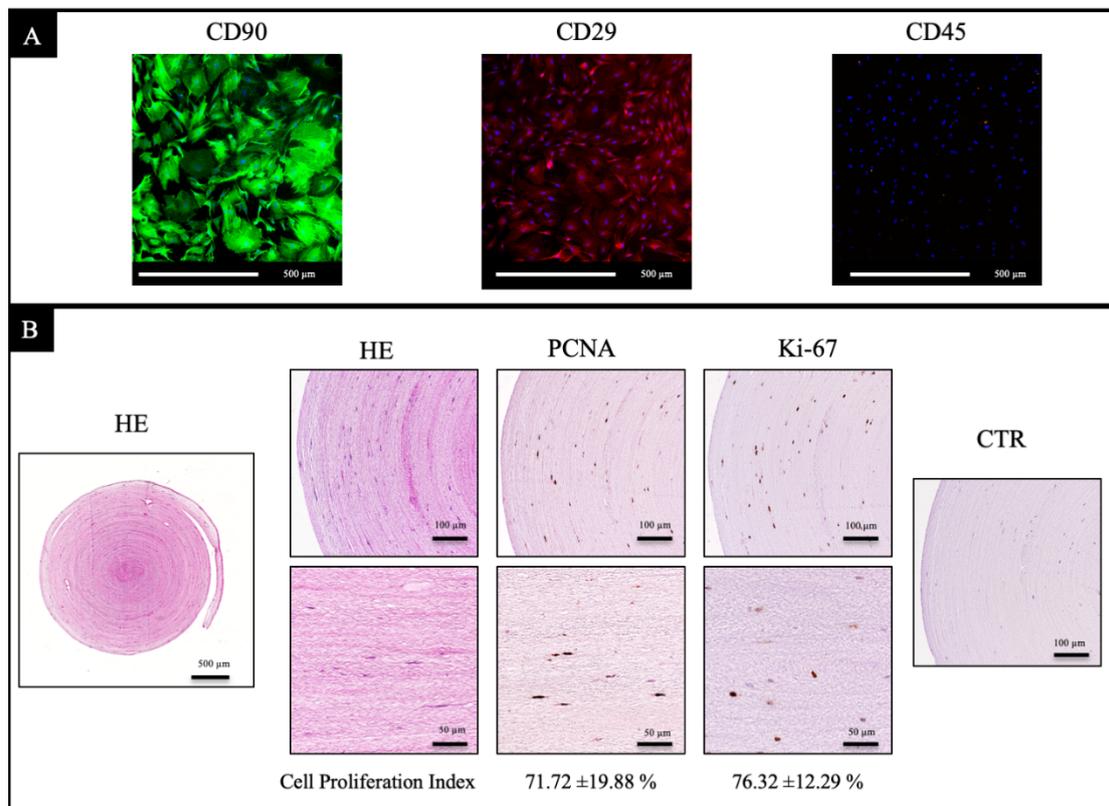


Figura 11: Caracterización y distribución de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo. (A) Imágenes representativas del patrón de inmunotinción de los marcadores de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo de rata. (B) Se exhibe el patrón histológico del SNBFAN, la distribución de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo con HE así como la presencia y porcentajes de células proliferantes (índice de proliferación celular) detectados por IHC para los marcadores PCNA y Ki-67, respectivamente.

Además, para asegurar la viabilidad de las células madres mesenquimales del tejido adiposo contenidas en el SNBFAN, la proliferación celular se determinó por IHC para PCNA y el Ki-67 después de 48 h de cultivo como se describió anteriormente (25, 46). En este sentido, el índice de proliferación celular de las células madre mesenquimales del tejido adiposo fue del 71,72% para el PCNA y del 76,32% para el Ki-67 (Figura 11).

La información técnica de los anticuerpos utilizados se resume en la Tabla 2.

3 ESTUDIOS PRECLÍNICOS EN EL MODELO DE LESIÓN DE NERVIOS CIÁTICOS DE RATAS:

3.1 Procedimientos quirúrgicos y grupos de estudio experimentales

Inicialmente, 20 animales fueron sometidos a anestesia general con una inyección intraperitoneal de una solución compuesta por acepromazina (Calmo-Neosan®; 0,001 mg/g de peso corporal), ketamina (Imalgene 1000®; 0,15 mg/g de peso corporal) y atropina (0,05 µg/g de peso corporal). Posteriormente, se expuso el nervio ciático izquierdo y se extrajo cuidadosamente un segmento de 10 mm, dejando todos los nervios ciáticos derechos como control no operado

A continuación, los animales fueron asignados al azar a los siguientes grupos experimentales (n = 5 en cada uno):

- Grupo control autoinjerto (Auto), donde el fragmento extraído del nervio se rotó 180° y se utilizó para reparar el defecto
- Grupo Nano (Nano), en el que la lesión nerviosa fue reparada microquirúrgicamente utilizando SNBFAN de 10 mm de longitud y 1,5 mm de diámetro
- Grupo Nano de colágeno (Col-Nano), en el que los defectos nerviosos fueron reparados con conductos de colágeno comerciales tipo I (NeuraGen®, Integra® Life Sciences Corp., Estados Unidos) rellenos con un SNBFAN de 10 mm de longitud y 1 mm de diámetro.
- Control nativo (CTR-Nativo), donde se utilizaron animales sanos para las comparaciones.

Después de la cirugía los animales fueron transferidos a jaulas individuales y recibieron tratamiento analgésico postoperatorio con metamizol en el agua de bebida durante 48 h. Todas las intervenciones fueron realizadas por un único

investigador utilizando la misma técnica (suturas epineuriales) y material de sutura (10/0 material absorbible).

3.2 Evaluación *in vivo* de los sustitutos nerviosos bioartificiales para la reparación del nervio periférico

3.2.1. Evaluación clínica

Para determinar el perfil de recuperación de las funciones sensoriales y motoras después de la reparación nerviosa a través de SNB, se sometió a los animales a una serie de pruebas ampliamente utilizadas a las 4 y 12 semanas después de la cirugía (39, 111, 134). A este respecto, se realizó una evaluación de las auto-amputaciones encontradas en la región afectada, así como de las úlceras neurotróficas que aparecieron en la región plantar en las que además se midió su diámetro para realizar un pronóstico de su evolución. Además, se realizó una medición de la longitud plantar, que se utilizó como indicador de la retracción neurogénica de los músculos inervados por el nervio ciático. Finalmente se realizó la prueba de presión o "*pinch test*" y la prueba de abducción digital o "*toe-spread test*" para evaluar la recuperación sensorial y motora respectivamente.

Para la prueba de presión o "*pinch test*", se aplicó un estímulo de presión leve a la piel de la pierna operada desde el dedo del pie hasta la articulación de la rodilla, hasta que se observó una reacción de retracción tal y como se describió en investigaciones anteriores (46, 111). Esta reacción se calificó en una escala de cuatro puntos como sigue: 0 = sin respuesta de retroceso, 1 = respuesta al estímulo por encima del tobillo, 2 = respuesta a la estimulación distal del tobillo en la región del talón/plantar y 3 = respuesta a la estimulación en la región del metatarso.

La prueba de abducción digital o "*toe-spread*" consistió en la evaluación de la reacción de extensión y abducción de los dedos del pie durante la suspensión del animal por la cola. Estos resultados se calificaron en una escala de cuatro

puntos como sigue: 0 = ningún movimiento de los dedos, 1 = algún signo de movimiento de los dedos, 2 = abducción de los dedos, y 3 = abducción de los dedos con extensión (111, 134).

Para la medida de la longitud del pie, las patas traseras de la rata se sumergieron en una tinta azul, y se permitió a los animales caminar por el sendero en un dispositivo de 1 m de longitud, 10 cm de ancho y 15 cm de altura cubierto con papel blanco, dejando sus huellas traseras en el papel. La longitud del pie se midió como la distancia desde el talón hasta el tercer dedo del pie.

Además, este estudio fue complementado con una evaluación clínica y electromiográfica (EMG) dos veces, a las 4 y 12 semanas después de la cirugía. Los análisis a las 4 semanas se realizaron para confirmar el impacto clínico y funcional de la lesión nerviosa, mientras que el objetivo de la evaluación de 12 semanas era determinar con precisión las diferencias entre los grupos durante una regeneración activa y una recuperación funcional parcial, como se recomienda en la literatura (87). Después de la segunda evaluación EMG, los animales fueron alojados durante otros 14 días y luego se les practicó la eutanasia. Este período se utilizó para favorecer la curación de los músculos (hemorragia e inflamación debido al EMG) para posteriores análisis morfométricos e histológicos. Por lo tanto, todos los análisis histológicos se realizaron a las 14 semanas después de la cirugía.

Para realizar este proceso se siguieron protocolos anteriormente descritos (46). Brevemente, los animales fueron levemente anestesiados (1/10 de las dosis utilizadas para la anestesia general) con ketamina y acepromazina para estudiar la función muscular en reposo. Se determinó la actividad eléctrica espontánea de los músculos *gastrocnemius (lateral y medial)* y *tibialis anterior*. Estos músculos fueron analizados usando agujas concéntricas y un electromiograma Topas de 4 canales (Schwarzer GmbH R, Munich, Alemania) con filtros de paso de banda de 5-5.000 Hz. Cada músculo fue sometido a tres mediciones en tres áreas diferentes. Los resultados de denervación y reinervación se puntuaron usando la siguiente escala de cuatro puntos como sigue: 0 = ausente (sin signos en ninguna de las tres áreas musculares); 1 = leve (signos en una de las tres

áreas); 2 = moderado (signos en dos áreas), o 3 = severo (signos en las tres áreas). Se calculó el porcentaje de animales con grados específicos de denervación o reinervación para cada grupo de estudio. La pierna derecha de cada animal operado (CTR) y ambas piernas de los animales independientes no operados (CTR-Nativo) también fueron analizadas como controles.

3.2.2. Estudios *postmortem*

Después de las evaluaciones clínicas y funcionales, los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia. Una vez confirmado el sacrificio de los animales, y a fin de asegurar una fijación óptima y una disección *postmortem* adecuada, se fijaron los animales mediante la técnica de perfusión intracardiaca (119, 135). Brevemente, se limpió el sistema circulatorio mediante la inyección de 500 ml de solución salina en el ventrículo izquierdo. Una vez que el sistema circulatorio estaba completamente limpio, se perfundieron 500 ml de formalina neutra al 10% para fijar químicamente todo el cuerpo del animal. Después de la fijación, los nervios ciáticos (operados y sanos) y el músculo distal fueron cuidadosamente disecados para su posterior análisis.

Evaluación morfométrica de los músculos

Para evaluar el grado de atrofia de los músculos inervados por el nervio ciático izquierdo operado, se midió el peso y el volumen de toda la parte inferior de la pierna a las 14 semanas después de la operación. La parte inferior de las piernas, que contienen varios músculos exclusivamente inervados por el tronco del nervio ciático, fue expuesta y luego desarticulada de la rodilla y el tobillo. Para la evaluación del peso, las piernas disecadas fueron retiradas del fijador, secadas en papel absorbente y pesadas en una máquina de pesaje digital (Sartorius BP 121S, precisión: 0,1 mg, Sigma-Aldrich). Para la evaluación del volumen, las piernas disecadas se sumergieron en un tubo de ensayo (50 ml) que contenía 30 ml de PBS, el aumento del volumen del PBS representa el volumen de la parte inferior de las piernas de acuerdo al principio de Arquímedes. En este estudio, se calculó el porcentaje de pérdida de peso y volumen entre la pierna operada y la contralateral de cada animal, incluyendo las piernas de

animales sanos (CTR-Nativo). El porcentaje de pérdida se calculó siguiendo investigaciones anteriores : $[(\text{músculo lateral de la lesión/lateral}) * 100] - 100$ (136). Estos valores se utilizaron para realizar comparaciones estadísticas.

Análisis histológico, estructurales y ultraestructurales

Los animales perfundidos se utilizaron para evaluar en primer lugar el aspecto macroscópico de los nervios reparados para valorar la continuidad nerviosa, la uniformidad, las adherencias o las reacciones inflamatorias.

Posteriormente se disecaron los nervios, los implantes y los músculos para su procesamiento por histología. Para los análisis histológicos, se disecaron cuidadosamente los NP e implantes sanos, se seccionaron transversalmente y se obtuvo la porción central para los análisis de microscopía óptica y electrónica transmisión (MET). Para la microscopía óptica, las muestras se sumergieron en fijador durante otras 24 h. En el caso de los músculos, tras la evaluación morfométrica, se diseccionaron los músculos *tibialis anterior* y *gastrocnemius* de ambas piernas. Los músculos se sumergieron en fijador durante 24h, se seccionaron transversalmente y se fijaron durante otras 24h (un total de 48h de fijación química). Los tejidos fijados se colocaron en casetes histológicos, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 5 μm de espesor (95).

En este estudio, todas las secciones se tiñeron con HE para la evaluación histológica general. Además, se utilizó el método histoquímico de la MCOLL para evaluar la histología general durante los procesos de remielinización y reorganización de las fibras de colágeno en los NP y los implantes, como se describió anteriormente (95, 137-139). La presencia y distribución de las CS y de los axones recién formados se evaluaron mediante técnicas IHC indirecta para la proteína S-100 y GAP-43, respectivamente, tal y como se describió anteriormente (137, 139).

Los detalles técnicos de los procedimientos IHC y los anticuerpos utilizados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos usados para el análisis por citometría e inmunodetección.. FC = citometría de flujo; IF = inmunofluorescencia; IHC = inmunohistoquímica

Anticuerpo	Dilución	Pretratamiento	Aplicación	Nº Catálogo
FITC/Mouse monoclonal anti-CD90 (Clone OX-7)	1:300	-	FC	ByoLegend, San Diego (Cal), USA cat. no. 202503
	1:200		IF	
PerCP/Cy5.5/Hamster anti-CD-29	1:75	-	FC	ByoLegend, San Diego (Cal), USA cat. no. 102227
	1:50		IF	
PE/Mouse monoclonal anti-CD-45	1:100	-	FC/IF	ByoLegend, San Diego (Cal), USA cat. no. 202207
Mouse monoclonal anti-PCNA (clone PC10)	1:100 0	Citrate buffer, pH 6, 95°C for 25 min	IHC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany cat. no. P8825
Rabbit monoclonal anti-Ki67	-	EDTA buffer pH 9, 95°C for 25 min	IHC	Master Diagnostica, Granada, Spain cat. no. MAD-000310QD
Rabbit polyclonal anti-S100	1:400	Citrate buffer, pH 6, 95°C for 25 min	IHC	Dako Cytomation, Glostrup, Denmark cat. no. Z0311
Rabbit polyclonal anti-GAP-43 (ab-41)	1:50	EDTA buffer, pH 9, 95°C for 25 min	IHC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany cat. no. Sab4300525
Horse anti-mouse/rabbit IgG (peroxidase)	-	-	IHC	Vector Laboratories, CA, USA cat. no. MP-7500

Con el fin de determinar el grado de atrofia muscular y la reacción estromal fibrosa debida a la reparación del NP, las secciones transversales de los músculos *tibialis anterior* y *gastrocnemius* se tiñeron con los métodos PS y tricrómico de Masson (TMS) (95, 139). Además, se utilizaron secciones histológicas de músculos sanos como control nativo.

Para el análisis de la MET se obtuvieron pequeñas muestras de tejido inmediatamente después de la perfusión intracardíaca y se fijaron posteriormente con glutaraldehído tamponado neutro al 2,5%, seguido de tetraóxido de osmio al 2%. Las muestras fijas se deshidrataron, incrustadas en resina epoxídica. Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uracilo y citrato de plomo, se transfirieron a rejillas de malla y se analizaron en

microscopios electrónicos de transmisión JEOL JEM 1200 EX II o en un Carl Zeiss SMT LIBRA 120 PLUS.

Análisis estadísticos

Todos los datos cuantitativos obtenidos de las evaluaciones clínicas y la morfometría muscular se analizaron con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Todas las variables no normalmente distribuidas (abducción digital, prueba de presión, pérdida de volumen, pérdida de peso, y los resultados de EMG) se compararon con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En el caso de las úlceras y las amputaciones, variables que se expresaron en porcentaje, se utilizó la prueba exacta de Fisher para las comparaciones estadísticas. En todos los casos, los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos en las pruebas de dos colas. Todos los datos y comparaciones estadísticas se calcularon con el software SPSS Statistics 24.

VII RESULTADOS

1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS MODELOS DE CÁNCER DE PIEL NO MELANOMA

1.1 Caracterización histológica y estructural

La aplicación de las técnicas y protocolos de IT que se describen en el apartado metodológico permitió generar nuevos modelos de cáncer de piel no melanoma humano basados en biomateriales de fibrina-agarosa.

El análisis histológico del modelo de piel artificial no patológico utilizado como control reveló la presencia de un epitelio sobre el sustituto dérmico de fibrina y agarosa (Figura 12), con la presencia de una capa unicelular de queratinocitos en el primer tiempo de desarrollo en cultivo sumergido. Cuando el epitelio se expuso al contacto directo con el aire, se pudieron identificar 2-3 capas de células epiteliales a tiempo 2 (Figura 12) que tendrían a adoptar una morfología escamosa. Finalmente, a tiempo final, tras 12 días de cultivo aire-líquido, estas células se diferenciaron en un epitelio maduro en el que en la capa más superficial presentaba signos evidentes de descamación y una epidermis estratificada con 8-10 capas. Esta maduración epitelial fue claramente favorecida por la presencia de fibroblastos dérmicos en el estroma. En este caso, se pudo observar que, incluso en el estado de inmersión, los queratinocitos presentan una morfología plana o pavimentosa reflejo de una mayor diferenciación celular. Asimismo, el análisis de la dermis humana artificial generada mediante bioingeniería mostró un desarrollo adecuado de los fibroblastos en el HFA con una progresión en la proliferación de los mismos conforme al tiempo experimental. Es destacable observar como la disposición de los mismos a lo largo del HFA no es homogénea, y se establecen dos zonas diferenciadas. Una más próxima a la barrera epitelial, con una mayor densidad celular, y otra situada subyacente a la misma donde la densidad celular disminuye, lo que puede ser reflejo de la creación de una capa papilar más laxa y una capa reticular más densa y profunda que se encuentra en la configuración de la dermis humana (Figura 12, B), aunque sin las típicas crestas y papilas del tejido nativo.

En el modelo patológico de CEC, encontramos diversas peculiaridades a lo largo del tiempo estudiado. En primer lugar, se encontró que en las fases tempranas de enfermedad se apreciaban las características tumorales prominentes como la agregación de células tumorales y una rápida invasión del estroma acelular que es controlada, en el caso del estroma celular, por la presencia de los fibroblastos. Posteriormente, se generaron modelos de enfermedad en etapa tardía en los que observamos un epitelio totalmente ocupado por CEC en el que predomina la desorganización espacial y donde se ponen de manifiesto algunas estructuras típicas tumorales como los gránulos de secreción (Figura 13).

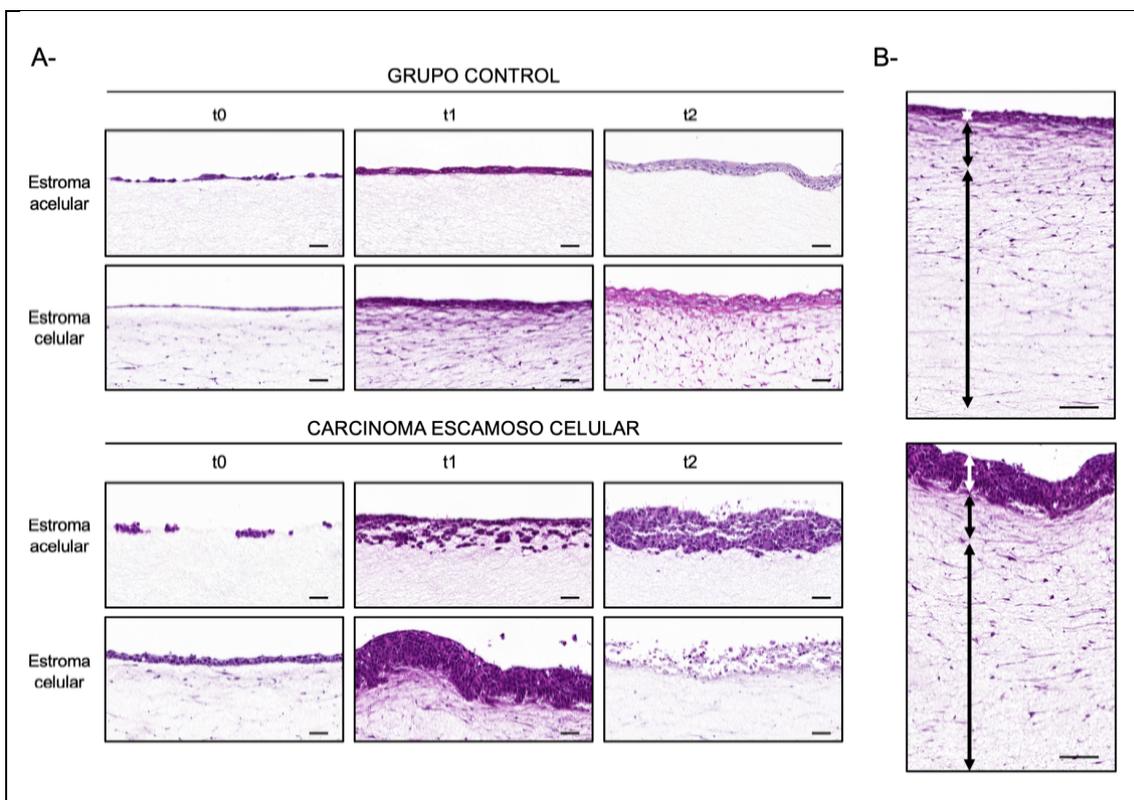


Figura 12: Análisis histológico de los modelos no patológicos y de carcinoma generados en este trabajo. A- Estudio de la epidermis de los modelos generados por ingeniería tisular. Se muestran modelos no patológicos control y patológicos con estromas acelulares y celulares en la parte superior e inferior, respectivamente. Barra de escala: 50 μ m. B- Estudio de la dermis celular del modelo control y patológico. Barra de escala: 25 μ m. En ambos casos las muestras han sido teñidas por HE.

Durante la progresión de la piel no patológica y de la enfermedad *ex vivo*, los queratinocitos y los fibroblastos se comportan de manera diferente. En el modelo de piel normal, se produce la síntesis de los componentes típicos de la MEC como carbohidratos, proteoglicanos o colágeno, que se ponen de manifiesto mediante las tinciones PAS, AB o PS, respectivamente. En el grupo control de piel no patológica, se encontró gran expresión de estos componentes tras 14 días en cultivo, especialmente en la zona de la dermis más cercana al epitelio, zona de alta deposición de componentes colágenos y proteoglicanos (Figura 13). El estudio IHC reveló una sutil expresión de colágeno tipo IV en la barrera dermo-epidérmica en el modelo no patológico y, especialmente, en el modelo generado con una dermis celular (Figura 15). Contrariamente, las células del CEC no se diferencian hacia fenotipos normales y tienden a migrar rápidamente a la dermis cuando no encuentran impedimento celular en ella en el grupo de dermis acelular. Sin embargo, llama la atención la reacción positiva de estos componentes en algunos gránulos de secreción del epitelio neoplásico.

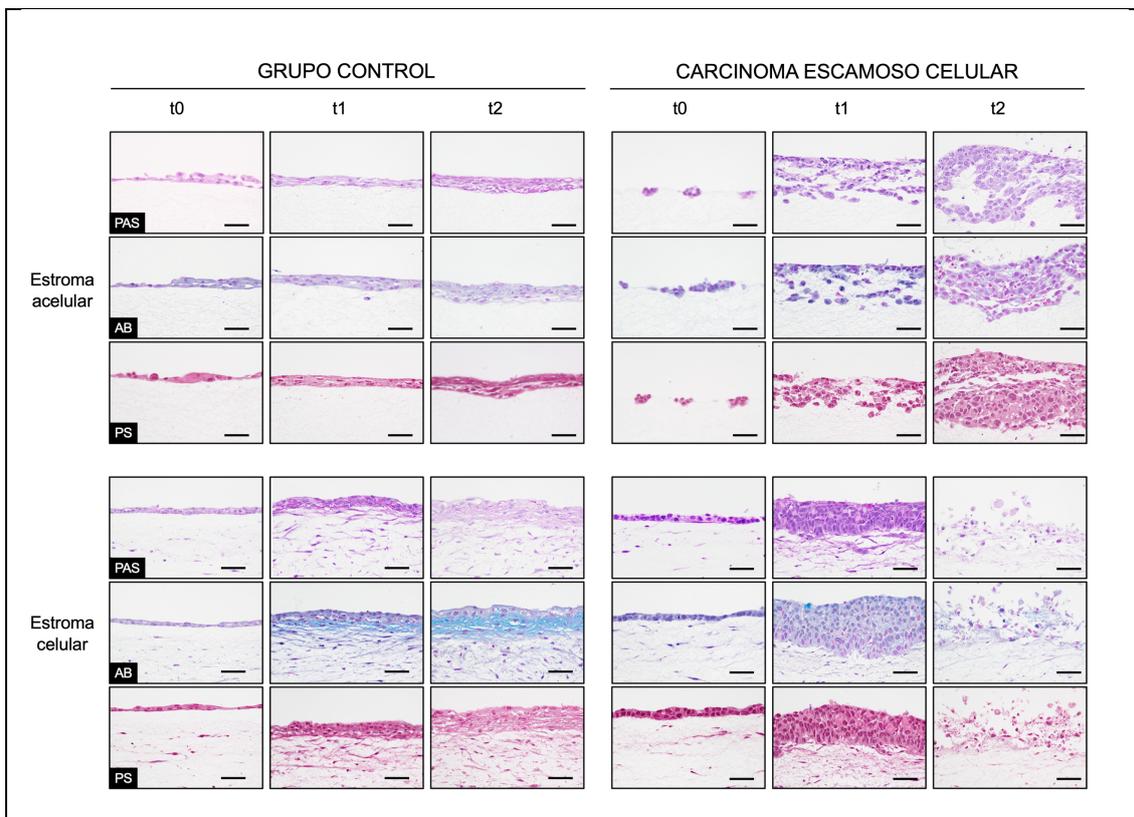


Figura 13: Análisis histológico de la matriz extracelular de los modelos no patológicos y de carcinoma generados en este trabajo. Se muestran modelos con estromas acelulares y celulares en la parte superior e inferior, respectivamente. En ambos casos, las muestras han

sido teñidas utilizando las siguientes tinciones histoquímicas: ácido peryódico de Schiff (PAS), azul alcian (AB) y rojo picrosirius (PS) para demostrar la presencia y la organización espacial de carbohidratos, proteoglicanos y fibras de colágeno respectivamente. Barra de escala: 50 μm .

La IHC es una herramienta clave en el diagnóstico diferencial entre distintos tipos de cáncer de apariencia similar (140, 141). En este sentido, en este trabajo se realizó un estudio por IHC de marcadores típicos epiteliales y tumorales que reveló una expresión progresiva de los biomarcadores típicos del CEC en el grupo patológico (Figura 14 y 15).

En primer lugar, el análisis de los marcadores epiteliales de expresión de CKs mostró elevada analogía entre ambos modelos (el control y el carcinoma), salvo en el caso de la CK10, que presentó tendencias opuestas (Figura 14). La expresión de CK5, marcador de los estratos basales de la piel, resultó ser intensa en todas los modelos, lo que pone de manifiesto la incapacidad de generar sustitutos totalmente diferenciados bajo las presentes condiciones de cultivo y temporalidad de estudio. No obstante, la CK10 se expresó de modo diferencial, y en el caso del modelo de piel no patológico, se encontró únicamente a nivel apical en los estratos más superficiales, poniendo de relevancia la diferenciación celular terminal de estos queratinocitos. Dicha diferenciación no se produjo en el caso del modelo patológico de CEC, pues no se encontró reacción positiva a este marcador en ninguno de los tiempos estudiados.

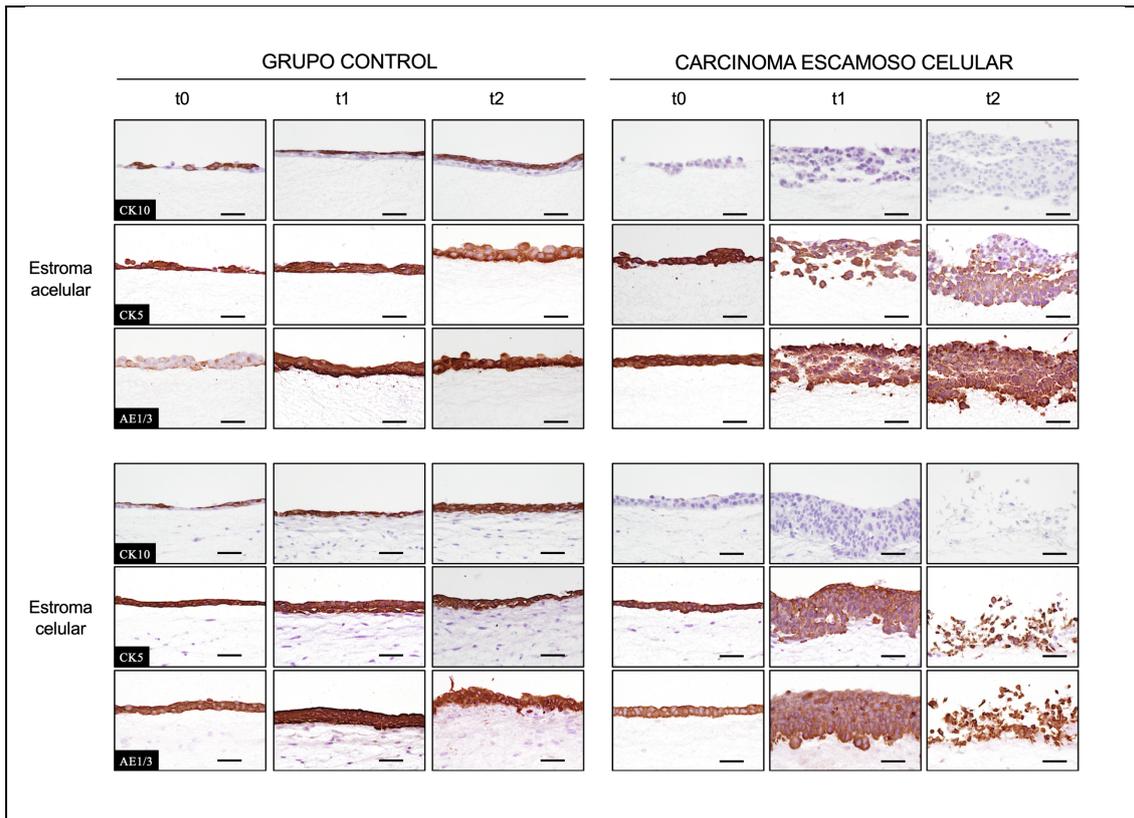


Figura 14: Análisis inmunohistoquímicos de la epidermis de los modelos no patológicos y de carcinoma generados en este trabajo. Se muestran modelos con estromas acelulares y celulares en la parte superior e inferior, respectivamente. En ambos casos, las muestras han sido sometidas a técnicas de inmunodetección para citoqueratina 10 (CK10), citoqueratina 5 (CK5) y citoqueratinas AE1/3 (CKAE1/3). Barra de escala: 50 μ m.

Por último, el estudio de los marcadores de proliferación celular Ki67 y PCNA demostró una alta capacidad proliferativa en el modelo de piel artificial no patológica y de carcinoma epidermoide de piel (Figura 15). Además, curiosamente, la capa epidérmica del modelo patológico presentaba un contacto celular típico, el cual es típico de la agregación tumoral, que se puso de relieve por la alta expresión de proteínas de unión intercelular como la claudina (Figura 15).

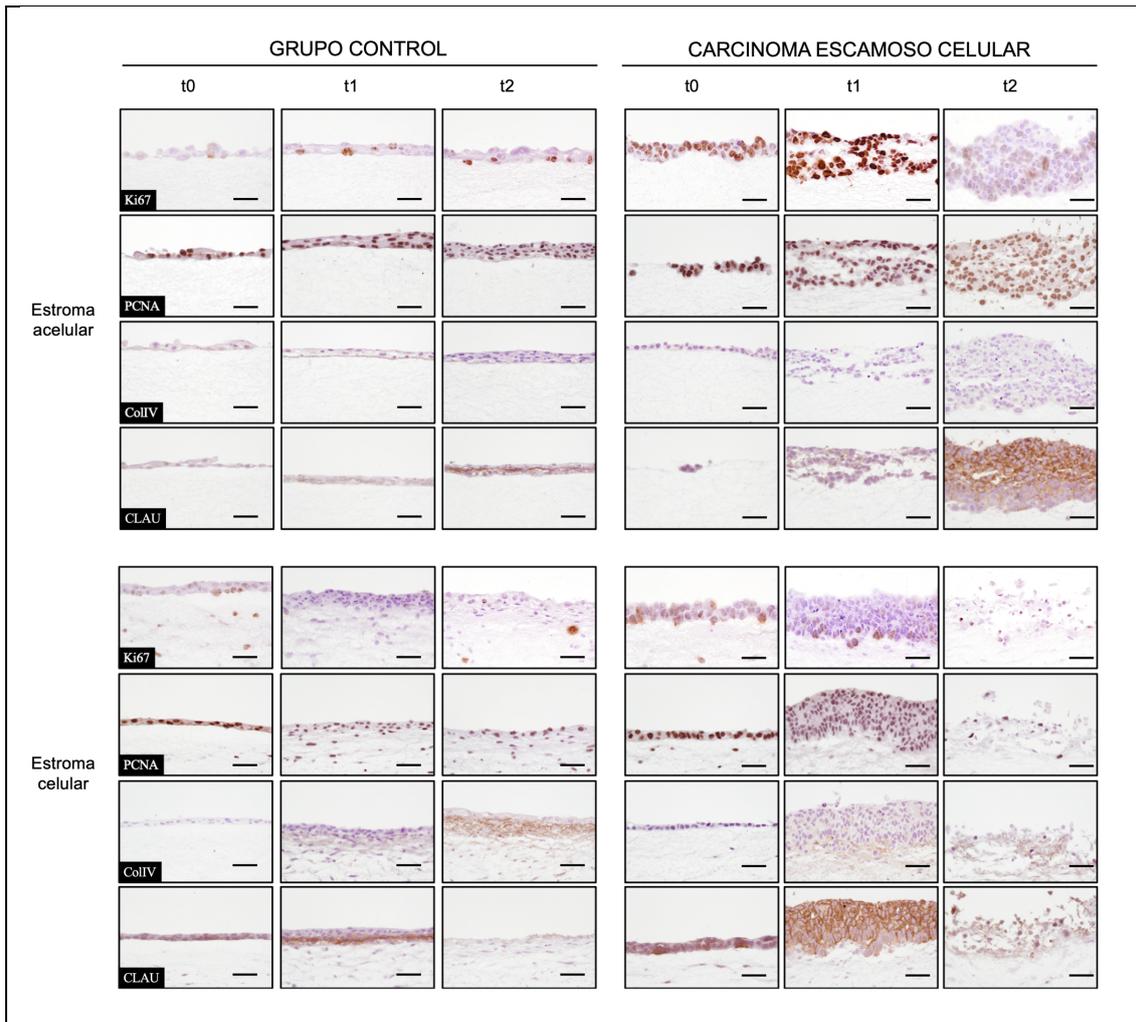


Figura 15: Análisis inmunohistoquímicos en modelos no patológicos y de carcinoma generados en este trabajo Se muestran modelos con estromas acelulares y celulares en la parte superior e inferior, respectivamente. En todos los casos las muestras han sido sometidas a técnicas de inmunodetección para proteínas asociadas con la proliferación celular (Ki67 y PCNA), componentes propios de la membrana basal (colágeno IV - ColIV) y proteínas de unión intercelular (claudina - CLAU). Barra de escala: 50 μ m.

2 EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LESIONES NERVIOSAS REPARADAS POR IT:

2.1 Evaluación *in vivo* de los sustitutos de nervio para la reparación de nervios periféricos

2.1.1. Implantación y aspecto macroscópico posquirúrgico

En este estudio, uno de los objetivos era determinar si, desde el punto de vista estructural y quirúrgico, el SNBFAN (Nano) y el SNBFAN utilizado como relleno intraluminal de los conductos de colágeno (Col-Nano) eran alternativas adecuadas para reparar lesiones del nervio ciático de 10 mm en las ratas. La metodología utilizada permitió generar SNBFAN con un tamaño (longitud y diámetro), forma y consistencia comparables a los nervios a reparar. Desde el punto de vista quirúrgico, los SNBFAN fueron fáciles de manipular durante el proceso de implantación y permitieron reparar los defectos nerviosos en un tiempo y con una técnica comparables a la empleada con los autoinjertos de nervios (Figura 16). En cuanto al grupo Col-Nano, los SNBFAN se incorporaron fácilmente como rellenos intraluminales de los conductos de colágeno durante la cirugía, y los defectos se repararon utilizando la técnica convencional de tubulización sin ningún inconveniente técnico.

A las 14 semanas tras la reparación neural, el grupo Auto mostró una completa reparación de los defectos sin ningún signo de daño estructural, aunque se observó un tejido conectivo laxo que cubría el área reparada (Figura 16). En el caso del grupo Nano, el análisis macroscópico reveló que el SNBFAN permitió reparar con éxito los defectos del nerviosos sin signos de adherencias o adenopatías locales (Figura 16). Del mismo modo, el análisis postquirúrgico confirmó que los conductos de colágeno con el SNBFAN permitieron reparar el defecto y los conductos de colágeno permanecieron en la superficie sin ninguna adherencia, compresión o deformación del conducto (Figura 16).

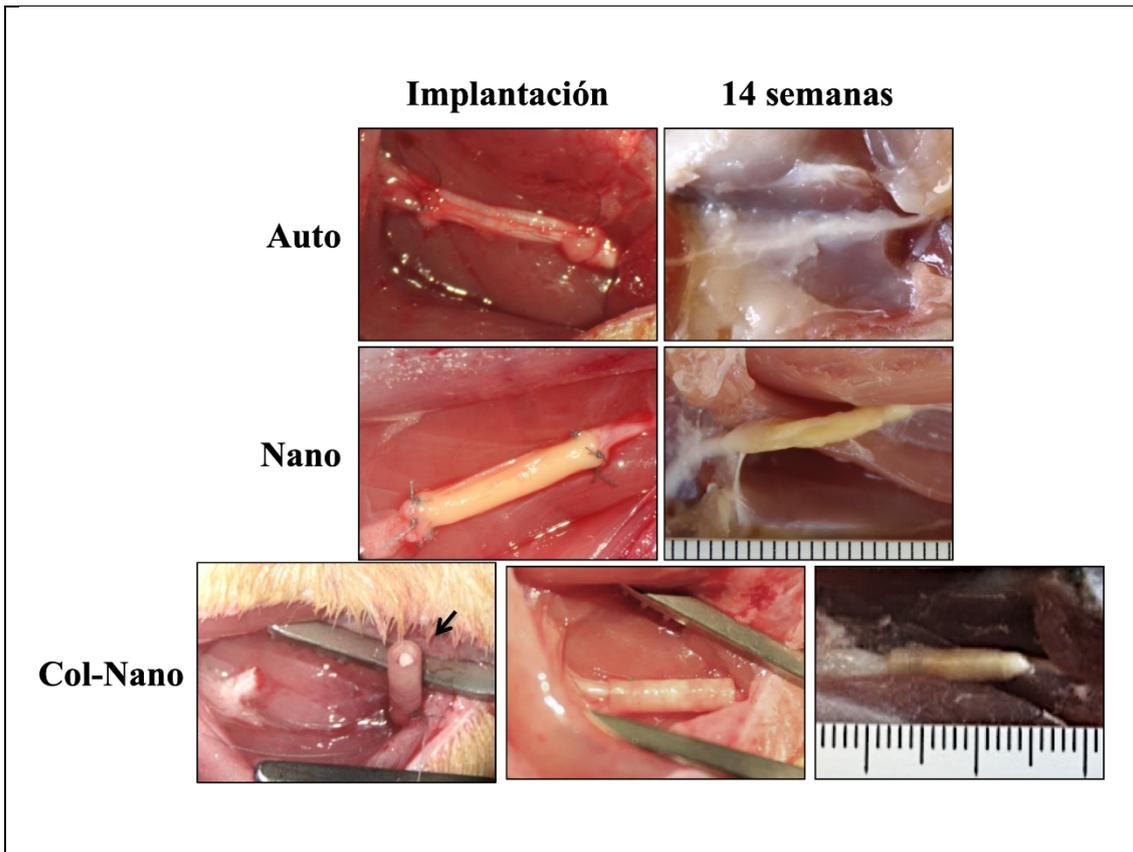


Figura 16: Implantación y aspecto postoperatorio de los nervios ciáticos reparados. Estas imágenes muestran el aspecto macroscópico de los nervios reparados y los resultados postoperatorios de los autoinjertos (Auto), SNBFAN (Nano) y los conductos de colágeno llenos de un SNBFAN (Col-Nano). En todos los casos, la lesión nerviosa fue reparada con éxito después de 14 semanas. En el grupo Col-Nano, los conductos de colágeno se suturaron primero en uno de los extremos de los nervios, rellenos con un SNBFAN (flecha) de 1 mm de diámetro y luego el extremo del nervio opuesto fue insertado y suturado en los conductos. Tenga en cuenta que todas las imágenes a las 14 semanas se tomaron después de la perfusión.

2.1.2. Resultados clínicos

En este estudio, los parámetros clínicos y funcionales se evaluaron a las 4 y 12 semanas tras de la reparación de los defectos nerviosos, los resultados se muestran en la Tabla 3. Los porcentajes de auto-amputación a las 4 semanas fueron mayores en el grupo Auto (80%) en comparación con los grupos Nano y Col-Nano (20% cada uno). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, excepto para la comparación entre el grupo Auto vs. el grupo CTR nativo ($p < 0,05$, Tabla 3).

Curiosamente, el porcentaje de auto-amputaciones aumentó en los grupos Nano y Col-Nano (alcanzando el 60% y el 40%, respectivamente), y las diferencias sólo fueron significativas para las comparaciones entre el grupo CTR-Nativo y el grupo Auto y Nano ($p < 0,05$, Tabla 3).

La evaluación de las úlceras neurotróficas plantares a las de 4 semanas reveló que sólo los animales de los grupos Auto desarrollaron estas lesiones (60% de los animales). Estos valores fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) que los de los grupos Nano y Col-Nano, en los que no se produjeron estas lesiones. Además, el 66,6% de estas úlceras (grupo Auto) superaron los 2 mm de diámetro (Tabla 3). El análisis a las 12 semanas mostró una disminución de la presencia de úlceras en el grupo Auto (de 60 a 20%) y un aumento en el grupo Nano (de 0 a 40%), no observándose variación en el grupo Col-Nano (0%). Sin embargo, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas (Tabla 3). Curiosamente, el 100% de las úlceras del grupo Auto y el 50% del grupo Nano fueron superiores a 2 mm, siendo las diferencias entre los grupos Auto vs. Nano y Col-Nano estadísticamente significativas ($p < 0,05$, Tabla 3).

La evaluación de la retracción neurogénica de los músculos inervados por el nervio ciático se evaluó a través de la medición de la longitud del pie a las 12 semanas. Este análisis reveló valores más bajos de la longitud del pie, lo que confirma la retracción neurógena, en el grupo Auto (34,01-mm), seguido del grupo Nano (37,39-mm) y luego del grupo Col-Nano (40-mm). Las diferencias sólo fueron significativas para las comparaciones entre el grupo CTR-Nativo vs. el grupo Auto y para el grupo Auto vs. el grupo Col-Nano ($p < 0,05$, Tabla 3).

La prueba de presión de recuperación sensorial o “*pinch test*” a las 4 semanas mostró valores superiores, mejor recuperación sensorial, en el grupo Nano (2/3), que en los grupos Auto (1.6/3) y Col-Nano (0.8/3). Aunque se observaron signos de recuperación sensorial, especialmente en el grupo Nano, estos valores fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) que la reacción sensorial observada en animales sanos (grupo CTR-Nativo) (3/3). Además, cuando comparamos estos valores entre los grupos experimentales, las diferencias entre el grupo Auto vs. Nano no fueron significativas ($p > 0.05$), pero las diferencias fueron

estadísticamente significativas cuando comparamos los valores de los grupos Nano vs. Col-Nano ($p < 0.05$, Tabla 3). La prueba de presión de recuperación sensorial después de 12 semanas mostró una ligera disminución de estos valores en los grupos Auto (de 1,6/3 a 1/3) y Nano (de 2/3 a 1,6/3) y un ligero aumento en el grupo Col-Nano (de 0,8/3 a 1,4). Las diferencias entre estos grupos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$, Tabla 3), y todos los animales operados mostraron valores significativamente más bajos que el grupo nativo de CTR ($p < 0,05$, Tabla 3).

Finalmente, la evaluación de la función motora de los músculos digitales con la prueba de abducción digital o "*toe-spread*" reveló que ninguno de los animales operados generaba una respuesta motora comparable con la respuesta motora de los animales sanos, ni a las 4 ni a las 12 semanas, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Tabla 3). Curiosamente, después de 4 semanas sólo se observaron leves signos de función motora en el grupo Nano (0,4/3), pero estos valores no fueron significativamente más altos ($p > 0,05$) que los valores observados en los grupos Auto y Col-Nano (Tabla 3). Cuando se evaluó la función motora después de 12 semanas estos valores se incrementaron en el grupo Nano (de 0,4/3 a 1/3) y un ligero incremento en el grupo Auto (de 0/3 a 0,2/3), pero no se observaron signos de recuperación de la función motora en el grupo Col-Nano (0/3), que fue significativamente inferior al grupo Nano ($p < 0,05$, Tabla 3).

Tabla 3: Resultados cuantitativos de recuperación clínica y funcional.

Grupos n=5	% AutoAmputaciones	% Úlceras neurotróficas	% Úlceras neurotróficas (>2mm)	Longitud plantar (mm)	Prueba de presión	Prueba de abducción digital
Análisis postquirúrgicos a las 4 semanas						
CTR-nativo	0	0	0	-	3,00 ± 0	3,00 ± 0
Auto	80 ^a	60 ^{a,b,d,e}	66,67 ^{a,b,d}	-	1,60 ± 0,55 ^{a,e}	0,00 ± 0,00 ^a
Nano	20	0 ^b	0 ^b	-	2,00 ± 0,71 ^{a,c,e}	0,40 ± 0,55 ^a
Col-Nano	20	0 ^d	0 ^d	-	0,80 ± 0,84 ^{a,c}	0,00 ± 0,00 ^a
Análisis postquirúrgicos a las 12 semanas						
CTR-nativo	0	0	0	39,17 ± 2,04	3,00 ± 0	3,00 ± 0
Auto	80 ^a	20	100 ^{a,b,d,e}	34,01 ± 2,47 ^{a,d}	1,00 ± 0,71 ^a	0,20 ± 0,45 ^a
Nano	60 ^{a,e}	40 ^e	50 ^{b,e}	37,39 ± 2,57	1,6 ± 0,55 ^a	1,00 ± 0,71 ^{a,c}
Col-Nano	40 ^e	0	0 ^d	40,04 ± 1,67 ^d	1,40 ± 0,55 ^a	0,00 ± 0,00 ^{a,c}

La tabla muestra todos los resultados cuantitativos realizados a las 4 y 12 semanas después de la reparación del NP. Los resultados de las auto-amputaciones y las úlceras neurotróficas se expresan en porcentaje, mientras que los resultados de las pruebas de longitud del pie, pellizco y extensión del dedo del pie se muestran como valores medios ± desviación estándar. En este estudio los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos en dos pruebas de cola. Las diferencias significativas se indican de la siguiente manera: a= Diferencias significativas con el grupo de CTR b= Diferencias significativas entre el grupo Auto vs. Nano, c= Diferencias significativas entre el grupo Nano vs. Col-Nano, d= Diferencias significativas entre el grupo Auto vs Col-Nano, e= Diferencias significativas entre 4 semanas y 12 semanas para cada condición.

2.1.3. Resultados electromiográficos

En primer lugar, el análisis de la pierna derecha de cada animal operado (CTR) y de las dos piernas de los animales independientes no sometidos a cirugía (grupo CTR-Nativo) reveló un patrón de reclutamiento normal con potenciales de unidad motriz normales y sin actividad espontánea en reposo. Por el contrario, el análisis EMG de los grupos experimentales mostró una amplia variación de los signos de denervación y reinervación (Tabla 4).

En un período de seguimiento de 4 semanas, la mayoría de los grupos experimentales mostraron claros signos de denervación (Tabla 4). El porcentaje de denervación muscular (*gastrocnemius* y *tibialis anterior*) fue más grave en el grupo Col-Nano (el 100% de los músculos *tibialis anterior* y *gastrocnemius medial* estaban gravemente denervados), seguido del grupo Nano y el grupo Auto, respectivamente (Tabla 4). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para la comparación del grupo Col-Nano vs. el grupo Auto para todos los músculos analizados ($p < 0,05$) y para el músculo *gastrocnemius* para la comparación de los grupos Nano vs. Auto ($p < 0,05$). Curiosamente, se observaron algunos signos de reinervación en los músculos *gastrocnemius* y *tibialis anterior* en el grupo Auto en esta etapa (Tabla 4). El análisis de los

animales a las 12 semanas del procedimiento quirúrgico reveló cambios significativos en el porcentaje de denervación y, especialmente, en el perfil de reinervación de todos los grupos experimentales (Tabla 4). En el grupo Auto, se observó una disminución significativa del porcentaje de denervación muscular en todos los músculos, y ninguno de los animales mostró signos de denervación en los músculos *gastrocnemius medial* y *tibialis anterior* en este momento. Estos valores se acompañaron de un ligero, pero no estadísticamente significativo ($p > 0,05$, Tabla 4) aumento del perfil de reinervación en este grupo Auto. El perfil EMG del grupo Nano reveló una ligera disminución no significativa del perfil de denervación, sin que ninguno de los músculos estuviera severamente denervado después de 12 semanas. En este grupo de animales, encontramos una mejora significativa ($p < 0,05$) del perfil de reinervación de todos los músculos a las 12 semanas de seguimiento, y el perfil de reinervación del músculo lateral del *gastrocnemius* era comparable al del grupo Auto en este momento (Tabla 4). Aunque las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$), los perfiles de reinervación del *gastrocnemius medial* y del *tibialis anterior* fueron ligeramente superiores en el grupo Nano en comparación con el grupo Auto (Tabla 4). Por último, el análisis de los animales de Col-Nano a las 12 semanas demostró una ligera mejora no significativa ($p > 0,05$) del perfil de denervación encontrado después de 4 semanas. Sin embargo, ninguno de los músculos mostró signos de reinervación y no difirió de los resultados encontrados en la etapa anterior (Tabla 4).

Tabla 4: Perfil electromiográfico de los músculos inervados por los nervios ciáticos reparados.

Grupos n=5	Músculos	% Denervación				% Reinnervación			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Electromiografía después de 4 semanas de reparación del NP									
Auto	<i>Gastrocnemius lateral</i>	40	40	20	0	0	67	33	0
	<i>Gastrocnemius medial</i> ^c	0	80	20	0	0	100	0	0
	<i>Tibialis anterior</i> ^c	0	20	80	0	0	100	0	0
Nano	<i>Gastrocnemius lateral</i> ^{a,f}	0	20	40	40	100	0	0	0
	<i>Gastrocnemius medial</i> ^{d,f}	20	0	40	40	100	0	0	0
	<i>Tibialis anterior</i> ^{d,f}	0	20	0	80	100	0	0	0
Col-Nano	<i>Gastrocnemius lateral</i> ^a	0	0	20	80	100	0	0	0
	<i>Gastrocnemius medial</i> ^{a,c,d}	0	0	0	100	100	0	0	0
	<i>Tibialis anterior</i> ^{a,c,d}	0	0	0	100	100	0	0	0
Electromiografía después de 12 semanas de reparación del NP									
Auto	<i>Gastrocnemius lateral</i>	100	0	0	0	0	60	40	0
	<i>Gastrocnemius medial</i> ^c	0	100	0	0	20	40	40	0
	<i>Tibialis anterior</i> ^c	100	0	0	0	20	60	20	0
Nano	<i>Gastrocnemius lateral</i> ^{a,b,f}	0	60	40	0	0	60	40	0
	<i>Gastrocnemius medial</i> ^{b,f}	20	40	40	0	0	80	20	0
	<i>Tibialis anterior</i> ^{a,f}	0	20	80	0	0	80	20	0
Col-Nano	<i>Gastrocnemius lateral</i> ^{a,b,d}	0	0	60	40	60	40	0	0
	<i>Gastrocnemius medial</i> ^{a,b,c}	0	20	20	60	80	20	0	0
	<i>Tibialis anterior</i> ^{a,c}	0	20	60	20	60	40	0	0

Los resultados se muestran como el porcentaje de animales de cada grupo experimental con signos específicos de denervación o reinnervación en los músculos *gastrocnemius* (*lateral* y *medial*) y *tibialis anterior* a las 4 y 12 semanas después de la cirugía. Cada músculo fue sometido a tres mediciones en tres áreas diferentes, y los resultados se puntuaron de la siguiente manera: 0 = ausente (sin signos en ninguna de las tres áreas musculares); 1 = leve (signos en una de las tres áreas); 2 = moderado (signos en dos áreas), o 3 = severo (signos en las tres áreas). En este estudio se consideraron estadísticamente significativos los valores $p < 0,05$ en dos pruebas de cola. Las diferencias significativas se indican a continuación: a= Diferencias significativas en los resultados de denervación con el grupo Auto, b= Diferencias significativas en la denervación entre el grupo Nano vs. el grupo Col-Nano, c= Diferencias significativas en la denervación entre 4 semanas vs. 12 semanas para cada grupo, d= Diferencias significativas en los resultados de la reinnervación con el grupo Auto, e= Diferencias significativas en la reinnervación entre el grupo Nano vs. el grupo Col-Nano, f= Diferencias significativas en la reinnervación entre 4 semanas vs. 12 semanas para cada grupo

2.1.4. Regeneración del Nervio Periférico: Histología y Ultraestructura

El análisis histológico realizado a las 14 semanas de los nervios reparados confirmó un proceso de regeneración activa en todos los grupos experimentales lo que se pone de manifiesto al teñir la sección central de los injertos con HE. En el caso de las lesiones nerviosas reparadas con la técnica de autoinjerto (grupo Auto), el proceso de regeneración se observó principalmente a nivel intrafascicular, aunque también se observa tejido nervioso regenerado en el tejido conectivo epineural del injerto. En este grupo, el proceso se caracterizó por la presencia de fascículos nerviosos de FNP relativamente pequeñas recién formados. Además, no se encontró ningún signo de reacción inflamatoria en ningún animal (Figuras 17 A,B). Curiosamente, a menudo se observó un número variable de fascículos de regeneración entre los rbdomiocitos, lo que confirma cierto grado de dispersión del proceso de regeneración del NP (Figura 17 B, recuadro). El análisis de HE de los SNBFAN implantados (grupo Nano) confirmó que estos nuevos sustitutos apoyaban un proceso de regeneración de NP activo y abundante (Figuras 17 A,B). La regeneración tuvo lugar a través del tejido conectivo que cubría los sustitutos implantados con un patrón histológico similar al observado en el grupo Auto, lo que significa la presencia de nuevos fascículos nerviosos y FNP recién formados. Además, como en el grupo Auto, también se observó algún grado de regeneración de NP asociado a los tejidos musculares circundantes (Figura 17 B, recuadro). En cuanto a los sustitutos implantados, en su mayoría se biodegradaron después de 14 semanas. El proceso de biodegradación se restringió a la superficie del biomaterial y se compuso de una reacción inflamatoria bien delimitada compuesta por macrófagos mononucleares bien organizados y algunos glóbulos blancos perivasculares (Figuras 17 A,C). En el caso de los defectos de los NP reparados por conductos de colágeno rellenos de SNBFAN (grupo Col-Nano), la histología reveló un tejido nervioso regenerado menos abundante que en los grupos Auto y Nano. En este grupo, la regeneración se restringió al área de la MEC entre la pared del conducto de colágeno y el proceso de biodegradación interna del SNBFAN. El tejido regenerado estaba compuesto por fascículos recién formados y con escasa

organización estructural. En cuanto a los biomateriales, los conductos de colágeno estaban bien conservados, con un proceso de biodegradación asociado por células multinucleares gigantes y alguna infiltración mononuclear. El SNBFAN intraluminal mostró el mismo proceso de biodegradación que el observado en los grupos Nano, aunque la estructura estaba más preservada (Figuras 17 A,C). Finalmente, el análisis MET confirmó que el SNBFAN en los grupos Nano y Col-Nano fue activamente degradado por los macrófagos mononucleares (Figura 17 D).

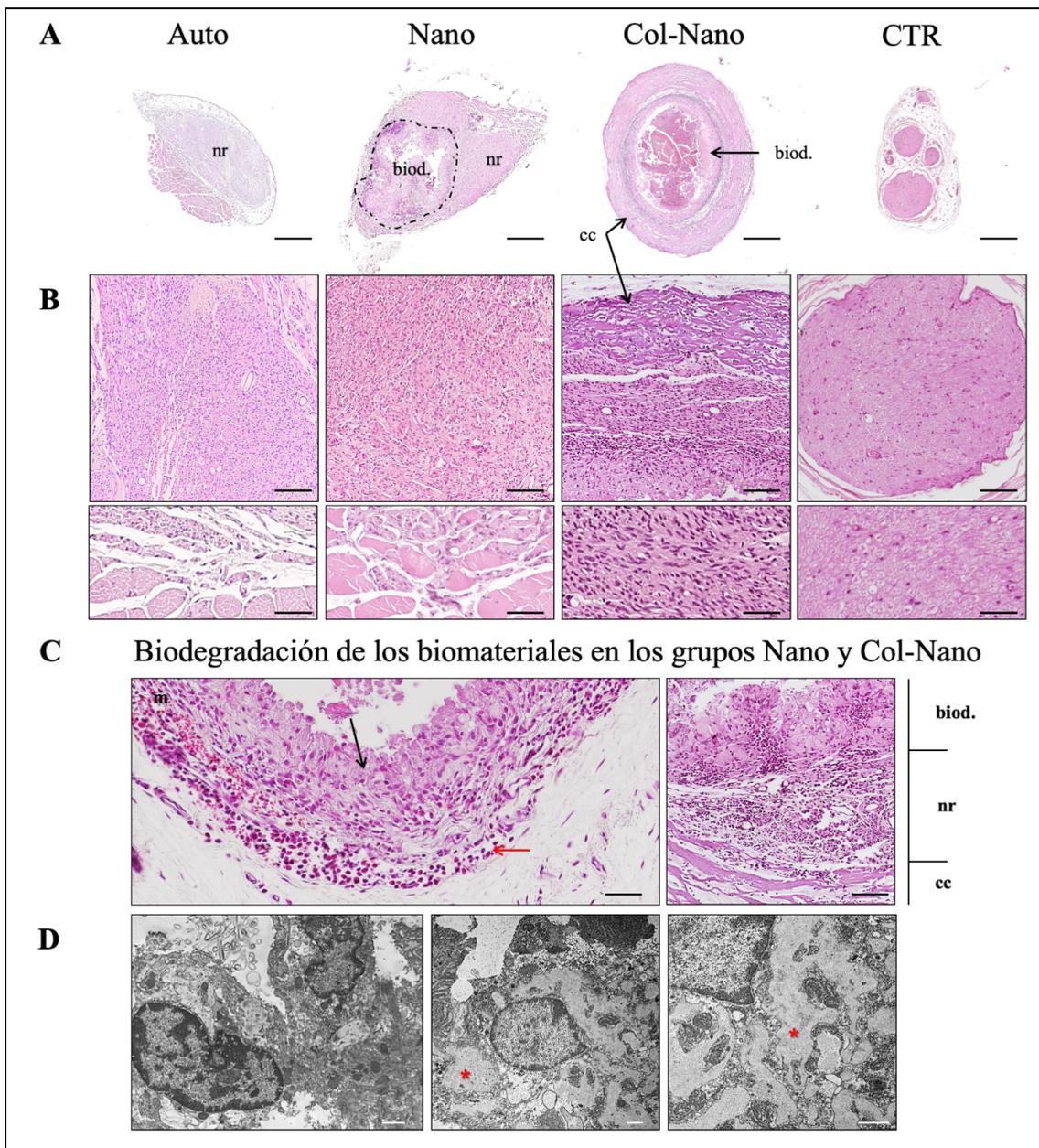


Figura 17: Resultados microscópicos de la regeneración del NP y la biodegradación de los biomateriales. Las figuras muestran la tinción de HE a bajo (A) y medio (B,C) aumento

de la sección transversal de la porción central de los nervios reparados por autoinjertos (Auto), SNBFAN (Nano) y conductos de colágeno llenos de SNBFAN (Col-Nano). Además, se incluyó una sección histológica transversal representativa de un nervio sano (CTR). En (A) se ofrece una visión general del proceso de regeneración, donde la regeneración del nervio se indica como (nr) en todos los grupos. En los grupos Nano y Col-Nano la biodegradación activa de la HFA se indica con (biod.) mientras que el conducto de colágeno en Col-Nano con (cc). Las imágenes en (B) muestran con un aumento moderado el patrón histológico de la regeneración del NP en cada grupo y también el control nativo. En los grupos Auto y Nano se encontraron algunos fascículos nerviosos regeneradores dispersos asociados al músculo esquelético circundante (insertos). Las figuras en (C) muestran imágenes representativas de la biodegradación de la FAH [en los grupos Nano (izquierda) y Col-Nano (derecha)] y del conducto de colágeno (grupo Col-Nano) por los macrófagos huéspedes (flechas negras). En asociación con los macrófagos, también se observó una cantidad variable de células mononucleares (flechas rojas). En la imagen de la derecha correspondiente al grupo Col-Nano se indican las tres zonas bien diferenciadas, la biodegradación de HFA (biod.), la zona de regeneración del NP (nr) y la biodegradación del conducto de colágeno (cc). Las imágenes MET en (D) confirmaron la presencia de macrófagos activos en los grupos Nano (izquierda) y Col-Nano (centro y derecha), donde los grandes fagosomas se indican con asteriscos rojos. Barra de escala = 500 μm en (A), 100 μm y 50 μm (recuadros) en (B), 50 μm (izquierda) y 100 μm (derecha) en (C) y 1 μm en (D).

El contenido de mielina y colágeno se pone de manifiesto con el método histoquímico de MCOLL el cual demostró cierto grado de mielinización y reorganización de la MEC de colágeno durante el proceso de regeneración del NP (Figura 18 A). El análisis del grupo Auto reveló una alta cantidad de FNP mielínicas inmersas en una MEC de colágeno laxa (Figura 18 A). De manera similar, en el grupo Nano se observaron abundantes FNP mielínicas en el tejido en regeneración, pero el colágeno de la MEC resultó ser más abundante, especialmente alrededor de los fascículos nerviosos recién formados (Figura 18 A). En el caso del grupo Col-Nano, no se observó una reacción histoquímica evidente para la mielina, aunque se detectó una cantidad importante de colágeno que acompañaba al proceso de regeneración del NP (Figura 18 A). Finalmente, el análisis MET confirmó la presencia de FNP con una vaina de mielina bien formada, así como FNP no mielínicas en los grupos Auto y Nano. Curiosamente, el análisis MET confirmó la presencia de FNP amielínicos y mielínicos en el grupo Col-Nano, pero la vaina de mielina era considerablemente más delgada y menos organizada que la vaina de mielina observada en los otros grupos

experimentales (Figura 18 B). A pesar del alto grado de mielinización observada en los grupos Auto y Nano, los resultados de la microscopía óptica y electrónica no fueron comparables al grosor y la regularidad de las FNP observadas en el control (Figuras 18 A,B).

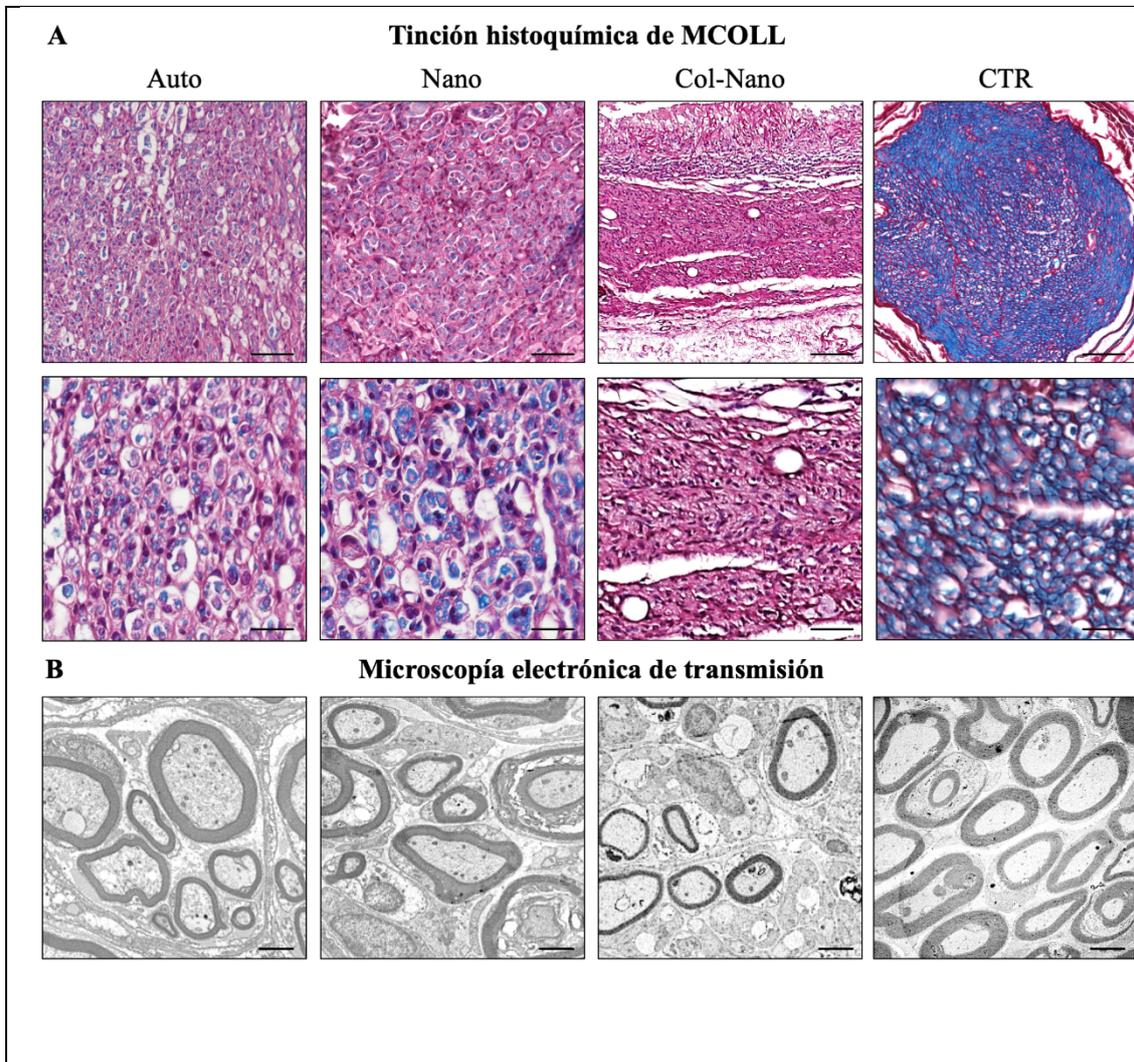


Figura 18: Análisis histoquímico y ultraestructural de la regeneración de los NPs y la mielinización. Las figuras en (A) muestran el patrón de regeneración del NP, el grado de mielinización (reacción histoquímica azul) y la reorganización del colágeno (rojo) con tinción histoquímica MCOLL a un aumento moderado y mayor en cada condición experimental (Auto, Nano y Col-Nano) y control nativo (CTR). Las imágenes TEM en (B) confirman la presencia de FNP mielínicas en todos los grupos experimentales y CTR. Barra de escala = 100 μm (imágenes superiores) y 50 μm (imágenes inferiores) en (A) y 2 μm en (B).

Para confirmar el proceso de regeneración del NP, las CS y los axones recién formados se identificaron por IHC mediante el uso de anticuerpos contra las proteínas S-100 y GAP-43, respectivamente (Figura 19). El análisis IHC del

grupo Auto reveló una inmunorreacción abundante y consistente para S-100 y GAP-43 a nivel intrafascicular e interfascicular, confirmando la presencia de un proceso activo de regeneración de NP como se había observado anteriormente en los análisis histológicos, histoquímicos y ultraestructurales (Figura 19). En el grupo Nano, se encontró una abundante inmunorreacción para el S-100 y el GAP-43 asociada al tejido en regeneración con un patrón similar al observado en el grupo Auto (Figura 19). El estudio IHC del grupo Col-Nano confirmó la presencia de un proceso activo de regeneración de NP, pero no fue comparable con el patrón y la cantidad observada en los grupos Nano y Auto (Figura 19).

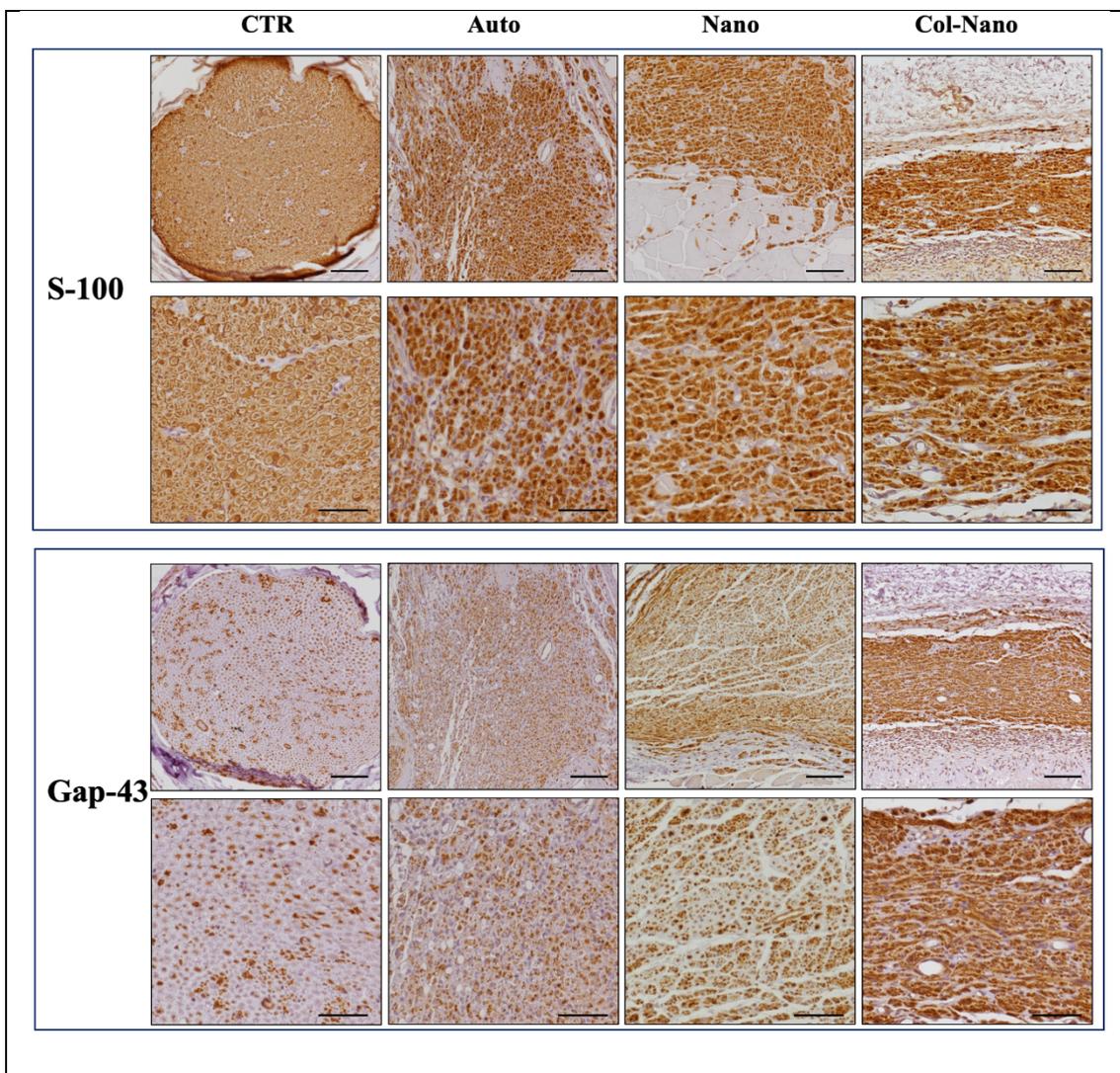


Figura 19: Evaluación IHC de las células de Schwann y de los axones en regeneración. La tinción IHC (reacción marrón) de S-100 se utilizó para revelar la presencia y distribución de CS, mientras que la Gap-43 se utilizó como marcador de los axones en regeneración recién formados. Ambas inmunotinciones se realizaron en cada grupo experimental (Auto, Nano y

CII-Nano) y en el control nativo (CTR). Barra de escala = 100 μm en aumentos menores y 50 μm en aumentos mayores.

2.1.5. Resultados de la morfometría e histología muscular

La atrofia muscular es una consecuencia bien conocida que tiene lugar después de un daño en el NP, y este proceso es un indicador aceptable e informativo del grado de reinervación muscular tras la reparación y regeneración del NP (111, 134). El análisis cuantitativo de los músculos de la parte inferior de la pierna inervados por los nervios ciáticos reparados después de 14 semanas reveló una importante pérdida de peso y volumen en comparación con las piernas de control derechas en cada grupo (Figura 20). En general, el peso de las piernas sanas osciló entre 7,8 y 7,1 g (media $7,5 \pm 0,2$ g) y el volumen de 8 a 6,6 ml (media $7,1 \pm 0,5$ ml), mientras que las piernas operadas oscilaron entre 3,3 y 4,7 g (media $3,8 \pm 0,6$ g) y 2,7 a 4,6 ml (media $3,5 \pm 0,8$ ml) (Figura 20). Al comparar el porcentaje de pérdida de peso y volumen se encontró una ligera diferencia en el grupo de CTR-Nativo (0,94% y 3,1%, respectivamente). En cuanto a los animales operados, la menor pérdida porcentual se encontró en el grupo Auto, en el que los animales perdieron el 32,67% del peso y el 29,6% del volumen (Figura 20). Cuando los animales fueron reparados con sustitutos bio-artificiales del nervio, los porcentajes de pérdida de peso y volumen fueron significativamente más altos en los grupos Nano (54,4% del peso y 54,5% del volumen) y especialmente en el grupo Col-Nano (56,8% del peso y 60,4% del volumen) en comparación con los animales del grupo CTR-Nativo y Auto (Figura 20). Aunque el porcentaje de pérdida fue mayor en los animales del grupo Col-Nano que, en el grupo Nano, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,251$ para el peso y $p = 0,281$ para el volumen).

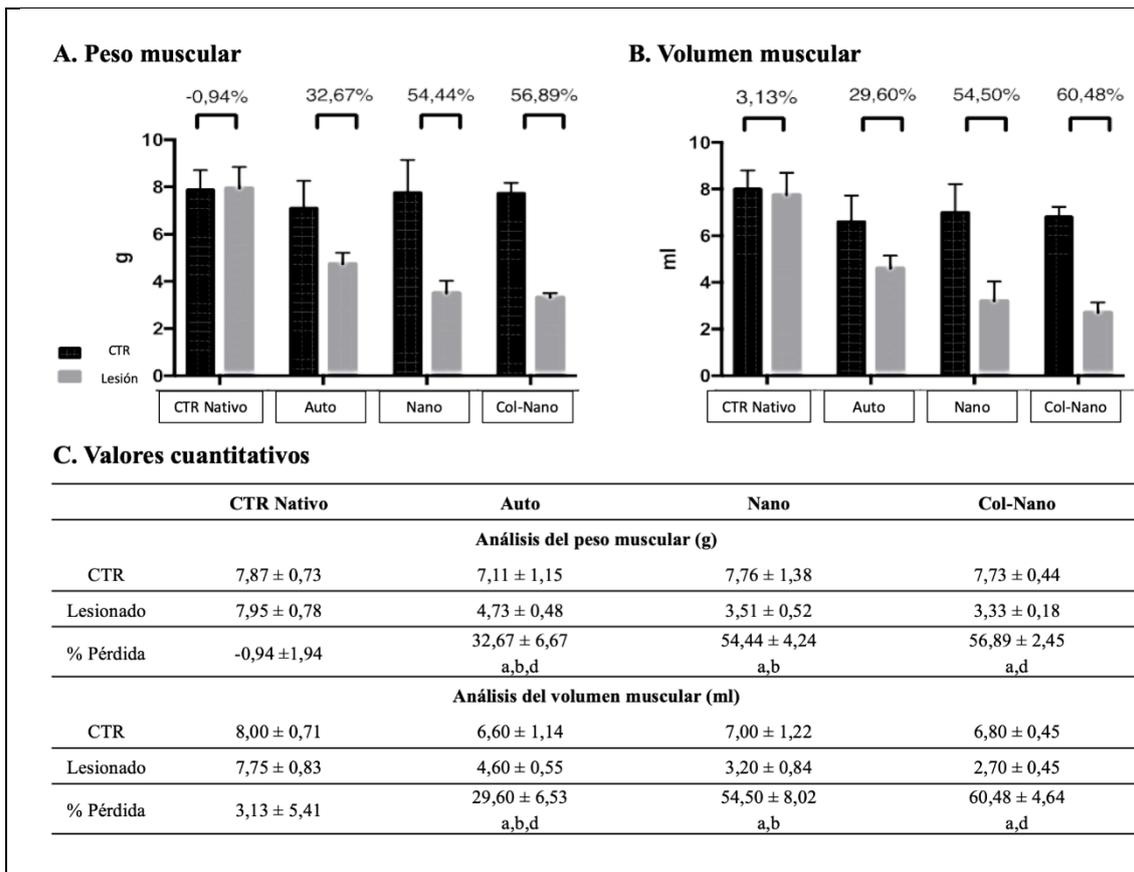


Figura 20: Resultados cuantitativos de la pérdida de peso y volumen de los músculos.

Los gráficos (A,B) muestran los resultados cuantitativos del peso y volumen del músculo de la lesión (gris) y control de la pierna derecha (negro) de los animales operados de cada condición experimental (Auto, Nano y Col-Nano) y control nativo (CTR). La tabla en (C) muestra el peso y la media del volumen ± valores de desviación estándar en gramos (g) y mililitros (ml), respectivamente. Además, la atrofia muscular se indica por el % de pérdida entre el CTR y la pierna lesionada de cada animal. En este estudio, las diferencias significativas se indican de la siguiente manera: a Diferencias significativas con el grupo de CTR, b Diferencias significativas entre el grupo Auto vs. Nano, c Diferencias significativas entre el grupo Nano vs. Col-Nano, d Diferencias significativas entre el grupo Auto vs. Col-Nano. Los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos en las pruebas de dos colas.

Los análisis histoquímicos de las secciones transversales de los músculos *tibialis anterior* y *gastrocnemius* confirmaron los hallazgos del EMG y, especialmente, el diferente grado de atrofia observado por la evaluación morfométrica entre los grupos experimentales (Figura 21). En el grupo Auto, la histología reveló leves signos de atrofia en los dos músculos analizados. El patrón histológico se caracterizó por la presencia de rbdomiocitos bien delimitados y distribuidos aleatoriamente con ciertos signos de atrofia, como la internalización nuclear y la

reducción del tamaño de las células. Además, no observamos signos de fibrosis o infiltración en el tejido adiposo con los métodos PS y TMS (Figura 21). En general, los músculos de este grupo mostraron un patrón histológico similar al de los músculos sanos utilizados como controles (Figura 21). En el grupo Nano, el grado de atrofia en ambos músculos fue más evidente que en el grupo Auto. En este caso, se observó una atrofia agrupada, que se caracterizó por la presencia de grupos de rbdomiocitos pequeños y angulosos. En cuanto a la MEC, la histoquímica reveló un ligero aumento del contenido de colágeno, así como la presencia de algunos adipocitos (Figura 21). El grado de atrofia observado en el grupo Col-Nano fue considerablemente mayor que en los grupos Auto y Nano. En este grupo, ambos músculos eran en su mayoría atróficos, compuestos por pequeños fascículos musculares que contenían rbdomiocitos moderadamente a severamente atrofiados. Además, se observó un aumento considerable de las fibras de colágeno y algunos adipocitos ocasionales (Figura 21). Los análisis histológicos de los músculos confirmaron los resultados morfométricos y del EMG.

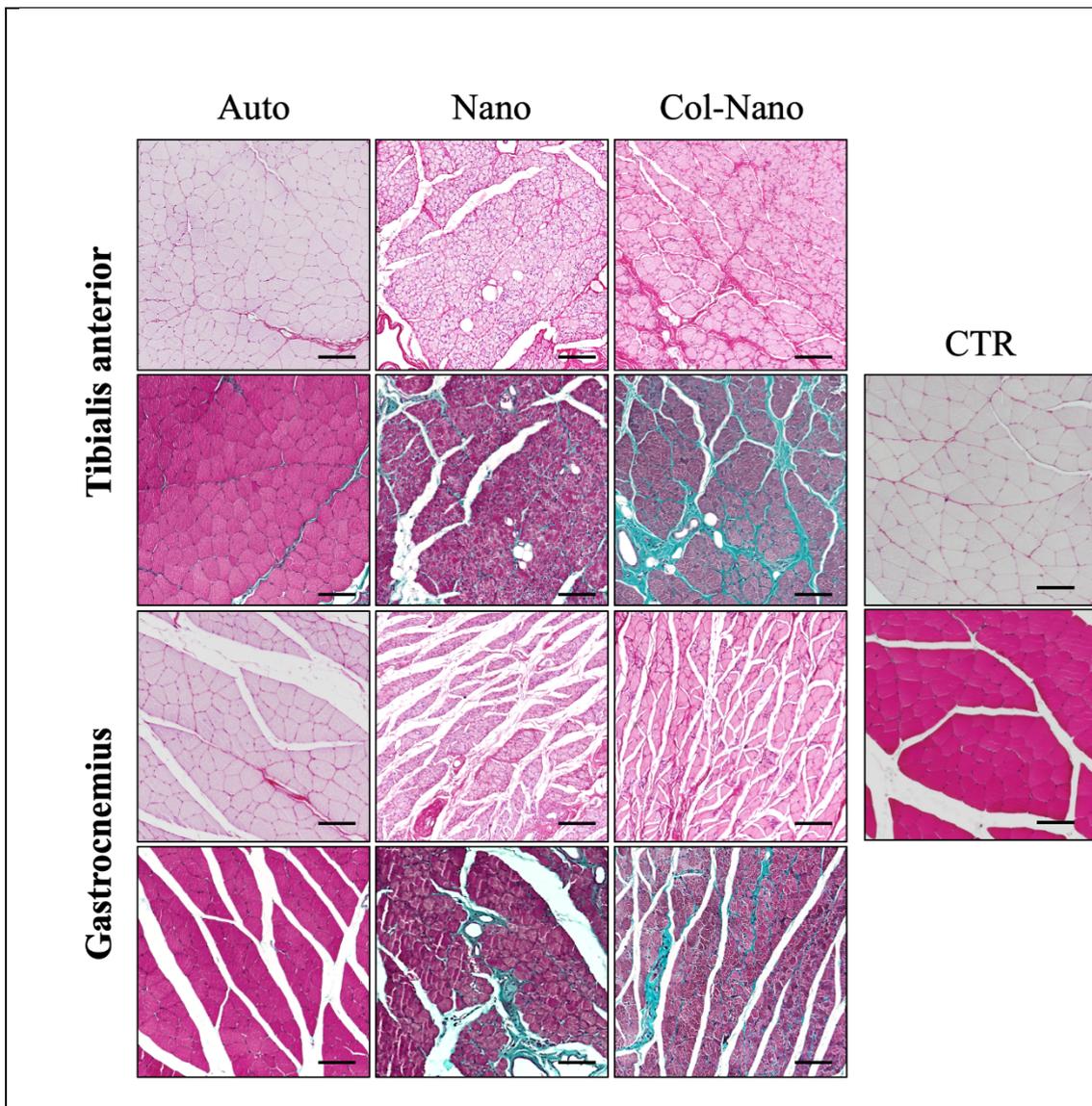


Figura 21: Perfil histológico de los músculos inervados por los NPs reparados. Las figuras muestran el patrón histológico de los músculos *tibialis anterior* y *gastrocnemius* teñidos con rojo picrosirius (PS) (imágenes superiores para cada uno) y tricrómico Masson (TMS) (imágenes inferiores para cada uno) métodos de cada condición experimental (Auto, Nano y Col-Nano) y control nativo (CTR). Obsérvese que el patrón histológico de los grupos Auto era comparable al del control nativo, mientras que en los grupos Nano y especialmente en el Col-Nano se pueden observar diferentes grados de atrofia e incluso de fibrosis. Barra de escala = 100 μ m en cada uno.

VIII DISCUSIÓN

El desarrollo de la IT permite elaborar sustitutos que se asemejen en estructura y composición a las características funcionales de tejidos u órganos específicos para desarrollar terapias que mejoren la calidad de los pacientes en la práctica clínica. Sin embargo, la IT no solo permite elaborar herramientas terapéuticas ante problemas clínicos, sino que, además, abre la posibilidad de generar modelos tridimensionales de distintos tejidos y órganos humanos capaces de reproducir la estructura de los tejidos humanos nativos para poder ser utilizados como modelos de enfermedad, permitiendo seguir su evolución en cultivo y desarrollar nuevos tratamientos. De esta forma en la presente Tesis Doctoral se han abordado las dos principales aproximaciones de la IT. En un primer lugar, y como uno de los objetivos generales, durante el desarrollo de este proyecto se ha generado un modelo patológico de CNM que nos permitirá estudiar el transcurso de la enfermedad y descubrir nuevas dianas farmacológicas que mejoren su tratamiento. En segundo lugar, y paralelamente a este primer objetivo, se han elaborado alternativas para la reconstrucción de los daños nerviosos, dando además una solución clínica por IT a los problemas asociados a las reparaciones de NPs.

En lo que respecta al modelo de piel patológica, se consiguió generar un modelo de CEC, comprendido dentro de los CNM, basado en el modelo de piel humana artificial de fibrina-agarosa que fue previamente descrito por el grupo de investigación que ha demostrado utilidad clínica potencial. En este sentido, el modelo de piel artificial generado a partir de HFA ha demostrado previamente ser un modelo altamente biomimético (7, 10, 65), reflejo de lo cual ha sido el primer modelo aprobado por la AEMPS para su uso compasivo en pacientes con daño corneal y en grandes quemados con resultados clínicos muy positivos (80). La generación de modelos patológicos a partir de HFA resultó ser una herramienta útil para recrear modelos patológicos de piel humana con los componentes fundamentales que afectan a la neoplasia de la piel y a la diseminación tumoral.

En la presente Tesis Doctoral se muestra el desarrollo de un nuevo equivalente de CEC de piel humana consistente en un modelo organotípico que contiene, además del biomaterial, fibroblastos humanos primarios y células neoplásicas,

que recrea con precisión el microambiente de la piel humana patológica. Este modelo se comparó con el modelo de piel normal anteriormente descrito que, como era de esperar, demuestra la producción de elementos propios de la MEC de la piel normal, como es el colágeno y los proteoglicanos, así como el perfil de expresión distintivo de las proteínas de la membrana basal de colágeno de tipo IV y marcadores de diferenciación epidérmica (CK5, CK10 y CKAE1/3, y desmoplaquina). La incorporación de las células neoplásicas en su nicho ambiental original en la unión dermo-epidérmica, favoreció el comportamiento fisiopatológico de estas células, las cuales conservan su potencial proliferativo e invasivo en el modelo, formando grupos de células invasoras desde tiempos tempranos de estudio, especialmente en aquellos modelos que presentan un estroma acelular. En este caso, las células tumorales no encuentran resistencia celular para la diseminación e invasión por la dermis artificial, poniendo en evidencia la importancia de los fibroblastos en el ambiente tumoral. Además, la no presencia de fibroblastos en la matriz de HFA podría asociarse a una matriz mucho más pobre en componentes propios de la MEC en todos los casos, lo que también contribuiría a una rápida invasión por parte de las células tumorales.

La profundidad de la invasión es un factor de pronóstico en este tipo de neoplasias, pues su evolución requiere la degradación progresiva de la membrana basal. En este proceso, se ha demostrado que también hay cambios en la MEC, incluyendo modificaciones de la expresión de sus componentes que conducen a un aumento de la tasa de proliferación celular y una inhibición de la apoptosis, entre otros efectos (142, 143). En estos casos, existe una mayor interacción con las células del estroma, como fibroblastos asociados al cáncer. En los modelos patológico *ex vivo*, se encontró que los fibroblastos generaron una MEC más compleja en la dermis, la cual podría dificultar la rápida diseminación tumoral. Sin embargo, algunos estudios sugieren que estas células podrían verse afectadas por las células tumorales y cambiar fenotípicamente para iniciar la secreción de proteasas tales como las metaloproteinasas (142-144). La remodelación de la MEC es, pues, fundamental para la invasión y migración de las células neoplásicas, y los fibroblastos asociados al cáncer suelen jugar un papel clave en el proceso, por ejemplo, a través de la síntesis de metaloproteinasas y lamininas, como se demostró previamente (76-78). Todo

ello podría favorecer la degradación del colágeno tipo IV de la membrana basal, cuya ruptura es un punto de inflexión en la progresión del cáncer y la invasión. Con ello, se desarrollaría un microambiente protumoral, con síntesis de metaloproteinasas que abrirían un camino a través del colágeno tipo I, de la dermis, permitiendo al cáncer ganar territorio (142). Las características histopatológicas comparativas observadas en los CEC primarios derivados de las diferentes etapas de la enfermedad del *American Joint Committee on Cancer* confirman que el modelo tridimensional equivalente a la piel es fisiológicamente representativo de la enfermedad clínica lo que nos permitirá en el futuro generar nuevos protocolos terapéuticos más efectivos para combatir la progresión tumoral. Dada la naturaleza progresiva del CEC, el rastreo de marcadores no sólo proporcionará pistas importantes para comprender la iniciación y la exacerbación del cáncer, sino que también aportará una nueva perspectiva a la prevención y el tratamiento del mismo.

Por otro lado, en el transcurso de esta Tesis Doctoral, se ha evaluado el mismo biomaterial de fibrina-agarosa para la reparación de lesiones de NP *in vivo* a partir de SNB.

Para la generación de los SNB, se utilizaron dos elementos principales, el HFA y las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, que han demostrado en previos estudios (46) ser una potencial alternativa al uso del autoinjerto, el cual sigue siendo actualmente método "*Gold standard*" para la reparación de lesiones críticas de NP (111, 113). En este estudio el HFA se utilizó para generar SNBFAN que se utilizaron para reparar la lesión por sí mismos a la par que como relleno intraluminal de los conductos de colágeno comerciales. El proceso de regeneración de los NP y la recuperación funcional se evaluaron mediante análisis clínicos, funcionales e histológicos.

Como hemos comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, los sustitutos bioartificiales de NP deben tener propiedades estructurales, físicas y biológicas adecuadas para reparar con éxito los defectos nerviosos que apoyan, e idealmente aumentan, el proceso de regeneración y la recuperación funcional (39, 54, 134). Desde el punto de vista quirúrgico, es importante que los sustitutos

de los nerviosos puedan responder a necesidades anatómicas específicas (por ejemplo, la longitud, el diámetro y el número de fascículos), que sean fáciles de manipular y de suturar para garantizar una reparación adecuada del NP sin tensión, y que estén disponibles para su uso en el menor período de tiempo posible. A este respecto, los autoinjertos de nervio, proporcionan efectivamente propiedades biológicas y físicas adecuadas para una regeneración tisular y recuperación funcional en cerca del 50% de los casos. Sin embargo, el uso de nervios donantes sensitivos para reparar los motores rara vez responde a las necesidades anatómicas (109) y no siempre están disponibles, lo cual obliga a los investigadores a encontrar alternativas más eficientes (39, 40). En este sentido, la mayoría de las estrategias de IT que se centran en la generación de SNB, actualmente no pueden fabricarse en un plazo de tiempo oportuno o, como es el caso de los dispositivos comerciales aprobados por la FDA, están disponibles con una gama preestablecida de dimensiones y es posible que difícilmente cumplan las exigencias anatómicas.

En este estudio, mostramos la idoneidad de dos estrategias de IT basadas en biomateriales naturales para la reparación de NP, que se generaron siguiendo un procedimiento controlado y altamente reproducible previamente descrito (11). Por un lado, con nuestro SNBFAN, fue posible recrear con éxito la forma, el diámetro y la longitud del NP a reparar, demostrando así que el SNBFAN puede responder a necesidades anatómicas específicas. Por otra parte, los SNBFAN demostraron ser adecuados para su uso como relleno intraluminal de los conductos comerciales de reparación nerviosa. En lo que respecta al diseño del SNBFAN, se generaron enrollando láminas finas de HFAN para generar una estructura multicapa consistentes que incorporaba células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en su interior, con la ventaja de que estas células demostraron ser viables, funcionales y con capacidad de proliferación (positivas para Ki- 67 y PCNA). Además, este procedimiento sencillo, rápido y económico tiene la ventaja de que puede programarse unas horas antes de la cirugía, lo que permite cumplir con los requisitos de tiempo deseables para una reparación oportuna de los defectos nerviosos (124, 127). Asimismo, en nuestro *in vivo* hemos demostrado que los SNBFAN han resultado ser quirúrgicamente fáciles de manejar durante la implantación quirúrgica, con

una estabilidad mecánica y un grado de flexibilidad adecuados, lo que permitió llevar a cabo una reparación libre de tensión, al igual que los autoinjertos nerviosos.

Curiosamente, a pesar de estas ventajas, las pruebas de tracción demostraron que el SNBFAN no era totalmente equiparable a la respuesta biomecánica de los nervios ciáticos nativos de las ratas de laboratorio (por ejemplo, $0,30 \pm 0,04$ MPa de Módulo de Young frente a los valores medios de $8,5 \pm 2,48$ MPa, respectivamente) (25). Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral demostramos que, independientemente de las diferencias biomecánicas, nuestros SNBFAN fueron lo suficientemente consistentes y resistentes como para ser utilizados con éxito en la reparación de los defectos neurales asegurando la continuidad del nervio después de 14 semanas en la totalidad de los casos.

En cuanto al uso de los conductos nerviosos comerciales rellenos de SNBFAN en la reparación de NP, esta metodología permitió reparar eficientemente todos los defectos nerviosos sin complicaciones macroscópicas detectables tras 14 semanas. Técnicamente, esta estrategia fue considerablemente más rápida y fácil que el uso de SNBFAN solo o de autoinjertos de nervios porque la reparación se hizo siguiendo la técnica de tubulización convencional. En cuanto a la idoneidad de esta estrategia combinada en la reparación de NP, es bien aceptado que el uso de componentes intraluminales, especialmente los que contienen células, es capaz de enriquecer el microambiente regenerativo con la consiguiente mejora de la regeneración tisular y la recuperación funcional (25, 54, 124, 126, 127, 145, 146). En este estudio, la incorporación de SNBFAN en los conductos de nerviosos comerciales evitó la deformación y la compresión física de estos dispositivos comerciales durante el período analizado. De forma similar algunos autores han demostrado también la generación de sustitutos nerviosos celulares basados en hidrogeles de colágeno cubiertos por los dispositivos NeuraWrap™ (Integra, Estados Unidos) que se han utilizado con éxito para reparar una lesión nerviosa de 15 mm en ratas de laboratorio (147). El uso de los sustitutos generados en este estudio, en los que el SNBFAN es utilizado como relleno intraluminal de los conductos comerciales, está especialmente respaldado por estudios anteriores en los que se demuestra que

han conseguido reparar una lesión nerviosa de 10mm en ratas, acompañado de una regeneración tisular y recuperación funcional tras 12 semanas (11, 46). Por último, todos estos estudios previos apoyan la posible utilidad quirúrgica del uso del SNBFAN solos o como relleno intraluminal de los sustitutos de nervio en la reparación de NP.

Para determinar el grado de recuperación funcional de la reparación de NP, es necesario llevar a cabo evaluaciones clínicas y funcionales (39, 134, 146). El presente estudio demostró que la lesión creada comprometía gravemente los parámetros clínicos y funcionales de todos los animales después de 4 semanas, seguido de una recuperación parcial a las 12 semanas. Clínicamente, todos los animales operados desarrollaron autoamputaciones a lo largo del tiempo, reflejo de un déficit funcional en la inervación de la zona afectada. Sin embargo, encontramos un número consistentemente mayor de amputaciones en el grupo de autoinjertos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En cuanto a la presencia de úlceras neurotróficas, que se asocian a un deterioro de las funciones sensitivas y motoras (148), estuvieron sorprendentemente ausentes en los animales tratados con los conductos comerciales rellenos de SNBFAN a lo largo del tiempo. Sin embargo, estas lesiones fueron más frecuentes en los animales que fueron tratados con autoinjertos (20%) y SNBFAN (40%), sin diferencias significativas después de 12 semanas, siendo estos hallazgos acordes con estudios anteriores (148-150).

Además de estos parámetros, las lesiones del nervio ciático inducidas experimentalmente se asocian a la disfunción muscular y a la retracción muscular neurogénica, lo que puede reflejarse en las alteraciones de la longitud del pie del animal (46). En este estudio se observó un mayor grado de retracción muscular neurogénica en animales tratados con autoinjerto, mientras que las estrategias de IT (SNBFAN y conductos rellenos) se asociaron a mejores resultados. El desarrollo de estas lesiones a nivel del pie puede explicarse por una recuperación parcial de las funciones sensitivas y motoras evaluadas mediante las pruebas de presión y de abducción digital. Nuestros resultados fueron especialmente favorables con el uso de SNBFAN en comparación con el autoinjerto, siendo menos favorables cuando los nervios se repararon con los

conductos de colágeno rellenos de SNBFAN. Sin embargo, estos resultados no fueron comparables a la función normal observada en animales sanos. Estos resultados están en línea con estudios anteriores, como el que demuestra el uso de SNBFAN basados en conductos de fibrina para la reparación de lesiones nerviosas de defectos de 10 mm en ratas y en las que se consigue una recuperación funcional comparable a la de los autoinjertos tras 12 semanas de recuperación (151). Además, un estudio reciente demostró una recuperación funcional satisfactoria mediante el uso de conductos de quitosano rellenos de hidrogeles celulares de colágeno autoalineado en la reparación de un defecto de tamaño crítico de 15 mm en ratas (152).

Para determinar con precisión el grado de denervación y reinervación muscular, se realizaron estudios EMG de los músculos *gastrocnemius* y *tibialis anterior*, tal como se había recomendado anteriormente (39, 134, 153). Como era de esperar, estos análisis confirmaron un alto grado de denervación muscular a las 4 semanas en todos los animales. Curiosamente, después de 12 semanas, se demostró una disminución de la denervación muscular y un aumento de la reinervación muscular en los animales tratados con SNBFAN y autoinjertos. Sin embargo, encontramos aún cierto grado de denervación en el grupo SNBFAN, especialmente cuando se utilizaron conductos rellenos. Curiosamente, el perfil EMG de los animales tratados con SNBFAN resultó ser más favorable que los resultados obtenidos en estudios anteriores que utilizaban conductos nervioso comerciales rellenos de HFA celulares y acelulares sin nanoestructurar en el mismo modelo de animal y período de análisis (46). Además, los resultados de EMG obtenidos en este estudio están en concordancia con los resultados del porcentaje de pérdidas de masa y volumen. De hecho, se obtuvieron mayores porcentajes de pérdida peso y volumen con el uso de conductos rellenos, seguidos por el uso de SNBFAN, siendo estos resultados significativamente mayores que los obtenidos con la técnica de autoinjerto. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por los análisis histoquímicos de los músculos que revelaron una atrofia leve, moderada y grave de los rhabdomiocitos en los grupos de autoinjerto, SNBFAN y conductos rellenos, respectivamente. Por último, nuestros resultados sugieren que el uso del SNBFAN en la reparación de los NP promueve un perfil de recuperación clínica y funcional aceptable, y en algún

aspecto equivalente, al del uso de la técnica de autoinjerto en la reparación de lesiones nerviosa de 10 mm en ratas, estando estos resultados respaldados por modelos de ingeniería comparables descritos en la literatura (147, 151, 154, 155).

Los análisis histológicos son instrumentos útiles en la investigación de la regeneración de NP, ya que constituyen un complemento esencial de las técnicas de investigación clínica, funcional y electrofisiológica (95, 134). En este estudio, la microscopía óptica y la microscopía electrónica fueron cruciales para demostrar un proceso activo de regeneración del NP en la porción media de todos los sustitutos. No obstante, se observaron diferencias en la cantidad y el patrón de distribución del tejido regenerado, así como en la respuesta del tejido huésped a los injertos implantados. La histología del grupo del autoinjerto confirmó la presencia de elementos fasciculares con FNP con un grado de mielinización moderada (resultados de MCOLL y MET) a lo largo y entre las capas estromales, especialmente, a nivel intrafascicular. En el grupo SNBFAN el proceso de regeneración neural resultó ser comparable, aunque este se limitó al tejido conectivo que recubre los sustitutos implantados, no observándose signos de regeneración neural en el interior de los sustitutos. Sorprendentemente, la regeneración de tejido en los conductos rellenos fue considerablemente menos abundante y con un menor grado de mielinización que en los grupos de autoinjerto y SNBFAN. De hecho, la regeneración del tejido nervioso se limitó al tejido conjuntivo que se creó entre la pared del conducto y la superficie del SNBFAN intraluminal. En resumen, la histología demostró que el SNBFAN, usado solo o como relleno intraluminal, no fue capaz de promover la regeneración del tejido nervioso a través de las capas del biomaterial. No obstante, el uso directo del SNBFAN en la reparación del NP resultó ejercer como una plataforma física eficiente para mantener conectados ambos extremos nerviosos, promoviendo y guiando la regeneración del tejido nervioso a través de su tejido conectivo circundante, reafirmando así los resultados clínicos, funcionales y EMG. Por lo tanto, nuestros hallazgos histológicos están de acuerdo con la regeneración activa del tejido nervioso obtenida mediante el uso de estrategias comparables (147, 154, 156, 157).

En relación con los resultados menos favorables obtenidos con los conductos comerciales rellenos de biomaterial, nuestros resultados histológicos sugieren que este hallazgo podría estar relacionado con factores físicos (54, 95). Es ampliamente conocido el papel de los sustitutos de nervio para proporcionar un microambiente protector, cerrado y controlado, que guíe y promueva la regeneración del tejido nervioso entre los extremos nerviosos no críticas (39, 46, 54, 157). En este sentido, creemos que el uso combinado de un conducto externo relleno de un SNBFAN altamente denso puede reducir el área necesaria para una óptima regeneración tisular, y esto explicaría el menor grado de recuperación funcional y perfil electrofisiológico observada con esta estrategia. De hecho, se demostró experimentalmente que el uso de rellenos intraluminales de baja densidad mejora el proceso de regeneración y la recuperación funcional (39, 40, 54, 158, 159). Por otra parte, los rellenos intraluminales de mayor densidad, que se degradan lentamente pueden reducir la superficie disponible para la regeneración tisular, retrasando o incluso inhibiendo dicha regeneración (39, 54, 160, 161).

En relación con la respuesta del huésped frente a nuestros biomateriales, los análisis histológicos confirmaron que el SNBFAN, utilizados solos o como relleno intraluminal, son biodegradados progresivamente mediante una respuesta inflamatoria local del huésped compuesta principalmente por macrófagos. Estos hallazgos concuerdan con estudios anteriores en los que los sustitutos basados en HFA fueron reabsorbidos por un proceso de biodegradación comparable en el transcurso de pocas semanas (10, 46, 57, 65). Además, la histología también confirmó que los conductos de nerviosos comerciales protegían de la biodegradación al material de SNBFAN utilizado intraluminalmente. Esto podría reducir la superficie intraluminal necesaria para una regeneración óptima de los tejidos y reafirmaría la hipótesis expuesta anteriormente.

Por último, el uso de sistemas celulares en la reparación de NP demostró ser una alternativa eficaz para aumentar la regeneración y la recuperación funcional (46, 151, 152). En este estudio, se utilizaron células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo autólogas indiferenciadas para funcionalizar los SNBFAN. El uso de esta fuente celular está sustentado por el impacto positivo

que han mostrado en la regeneración de NP(40, 46, 125, 162). En este estudio, se obtuvieron perfiles aceptables de regeneración y recuperación funcional de los NP con el uso directo de SNBFAN en la reparación nerviosa. Sin embargo, por razones técnicas, no fue posible identificar las células implantadas dentro del SNBFAN, por lo que no podemos atribuir directamente a las células el efecto positivo encontrado sobre la regeneración del NP obtenido con nuestro SNBFAN. Por lo tanto, el destino y el papel potencial de estas células después de la implantación *in vivo* siguen siendo desconocidos y deberían determinarse en futuros estudios. Trabajos anteriores sugirieron que las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo podrían contribuir al proceso de regeneración a través de su diferenciación a un fenotipo similar a las CS, liberando factores neurotróficos esenciales y colaborando con la síntesis de una MEC esencial (46, 151, 162-165)

En definitiva, en la presente Tesis Doctoral se han utilizado las dos aproximaciones de IT para, en primer lugar, recrear modelos *ex vivo* de enfermedades, y para, en segundo lugar, generar sustitos artificiales como herramientas terapéuticas. Más concretamente, se han generado modelos biomiméticos que reproducen las condiciones patológicas de un tipo frecuente de cáncer de piel, lo que permitirá estudiar los mecanismos involucrados en la neoplasia y diseminación y generar protocolos terapéuticos más efectivos. Además, y paralelamente, en esta Tesis Doctoral se propone la utilización de sustitutos bioartificiales basados en HFA con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo para la reparación del NP que podrían ser una alternativa prometedora al uso de autoinjertos, el actual tratamiento de referencia, y resolver un problema clínico como son las reparaciones de lesiones de NP. En suma, todos estos desarrollos contribuyen a una mejor caracterización del biomaterial de fibrina-agarosa actualmente aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios para su uso como medicamento en diferentes aplicaciones.

IX CONCLUSIONES

1 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la investigación realizada en la presente Tesis Doctoral, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de los protocolos de Ingeniería Tisular desarrollados en la presente Tesis Doctoral permitió generar satisfactoriamente dos modelos de carcinoma escamoso celular de la piel humana basados en hidrogeles de fibrina-agarosa: un modelo de cáncer de piel no melanoma con estroma acelular y un modelo de cáncer de piel no melanoma humano con un estroma celular. Ambos modelos mostraron ser altamente biomiméticos respecto a los controles de piel humana nativa.
2. El análisis histológico llevado a cabo en los modelos de cáncer de piel no melanoma desarrollados, pone de manifiesto la idoneidad de los mismos para reproducir *ex vivo* la estructura y la fisiopatología de la piel humana nativa. En concreto, se consiguió generar un nuevo modelo para el estudio del desarrollo y la progresión del cáncer de piel no melanoma que mostró características propias de la diseminación tumoral, invasión de las células tumorales en el estroma y desorganización espacial, siendo todo ello compatible con un carcinoma epidermoide ortotípico. El estudio de los marcadores de diferenciación y maduración de la piel humana demostró que el modelo es capaz de reproducir los principales componentes de la matriz extracelular de la piel normal, especialmente en el modelo de cáncer de piel no melanoma con estroma celular, así como los principales biomarcadores del epitelio neoplásico, con queratinocitos poco diferenciados y con alta capacidad de proliferación. En consecuencia, los modelos de cáncer de piel no melanoma generados en la presente Tesis Doctoral podrían ser útiles para el estudio de la fisiopatología de este tipo de cáncer, así como para la evaluación *ex vivo* de agentes antitumorales y de nuevos protocolos terapéuticos.
3. La combinación de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa y células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo permitió elaborar sustitutos bio-artificiales del nervio periférico cuyas características eran óptimas para la reparación tisular. El análisis de estos sustitutos demostró su naturaleza

altamente biomimética respecto al nervio periférico nativo, con una estructura cilíndrica y multicapa capaz de adoptar diferentes configuraciones tridimensionales que permitirán la generación de sustitutos personalizados para cada individuo, así como una población celular de alta viabilidad y metabólicamente activa

4. La evaluación del nervio artificial en modelos animales sometidos a una lesión nerviosa crítica demostró la utilidad del nervio artificial para la reparación microquirúrgica de los defectos del nervio ciático. Los resultados muestran, en primer lugar, la biocompatibilidad del nervio artificial, no observándose ningún efecto secundario al implante en ninguno de los animales y, en segundo lugar, la efectividad del sustituto para inducir la recuperación funcional de la lesión previamente inducida en los animales. A este respecto, el estudio del perfil de recuperación funcional demostró que el sustituto de nervio bioartificial basado en fibrina-agarosa nanoestructurado presentó mejores resultados clínicos en valores de denervación y reinervación a las 4 y 12 semanas, y en los valores de pérdida muscular, que el uso del biomaterial como relleno intraluminal de conductos de colágeno. Lo que refleja que el este sustituto promueve un perfil de recuperación clínica y funcional aceptable, y en algún aspecto equivalente, al del uso de la técnica de autoinjerto en la reparación de lesiones nerviosas. Cuando se estudió el proceso de regeneración nerviosa a nivel histológico, se comprobó que el injerto de nervio artificial es capaz de inducir la expresión de los marcadores de regeneración nerviosa S-100 y GAP-43 a niveles similares al autoinjerto, pero con una mayor abundancia de fibras de colágeno. La utilización de células mesenquimales en el modelo de nervio artificial demostró capacidad para inducir la regeneración y la recuperación funcional en los animales del estudio.

5. En consecuencia, los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral avalan la utilización del hidrogel de fibrina-agarosa para la generación tanto de modelos patológicos de enfermedad, como para la generación de alternativas terapéuticas para la reparación de lesiones tisulares, cumpliendo así las dos aplicaciones fundamentales de los productos generados por estrategias de ingeniería tisular.

2 CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the research carried out in this Doctoral Thesis, the following conclusions can be obtained:

1. The application of the tissue engineering protocols developed in this Doctoral Thesis allowed the successful generation of two human skin squamous cell carcinoma models based on fibrin-agarose hydrogels: a non-melanoma skin cancer model with acellular stroma, and a non-melanoma skin cancer model with cellular stroma. Both models were shown to be highly biomimetic with respect to native human skin controls.
2. The histological analysis performed on the non-melanoma skin cancer models showed their suitability to reproduce the structure and pathophysiology of native human skin *ex vivo*. In particular, it was satisfactorily generated a new model for the study of the development and progression of non-melanoma skin cancer that showed the typical tumor characteristics such as tumour dissemination, stromal invasion and spatial disorganisation, which are all compatible with orthotypic epidermoid carcinoma. The study of human skin differentiation and maturation markers showed that the model is able to reproduce the main components of the extracellular matrix of normal skin, especially in the non-melanoma skin cancer model with stromal cells, as well as the main biomarkers of the neoplastic epithelium, with poorly differentiated and highly proliferative keratinocytes. Consequently, the non-melanoma skin cancer models generated in this Doctoral Thesis could be useful for the study of the physiopathology of this type of cancer, as well as for the *ex vivo* evaluation of anti-tumour agents and new therapeutic protocols.
3. The combination of nanostructured fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells allowed the development of bioartificial peripheral nerve substitutes with optimal characteristics for nerve tissue repair. Analysis of these substitutes demonstrated their highly biomimetic nature with respect to the native peripheral nerve, with a cylindrical and multilayered structure capable of mimic different three-dimensional configurations that will allow the generation of

personalised substitutes for each individual, as well as a highly viable and metabolically active cell population.

4. The *in vivo* evaluation of the artificial nerve substitutes in an animal model subjected to a critical nerve injury demonstrated the usefulness of the artificial nerve substitute for microsurgical repair of sciatic nerve defects. The results showed, firstly, the biocompatibility of the substitute, with no side effects to the implant observed in any of the animals; and, secondly, the effectiveness of the substitute in inducing functional recovery of the previously induced nerve lesions. In this regard, the study of the functional recovery profile showed that the nanostructured fibrin-agarose based bioartificial nerve substitute got better clinical results in denervation and reinnervation values at 4 and 12 weeks, and in muscle loss values, than the use of the biomaterial as an intraluminal collagen conduit filler. These results highlight that this substitute promotes an acceptable clinical and functional recovery profile, and in some respects equivalent to the use of the autograft technique in nerve repair. When nerve regeneration process was studied at the histological level, it was found that the artificial nerve graft was able to induce the expression of the nerve regeneration markers S-100 and GAP-43 at similar levels to the autograft, but with a slightly higher abundance of collagen fibers. The use of mesenchymal cells in the artificial nerve model demonstrated the ability to induce nerve regeneration and functional recovery in the studied animals.
5. Consequently, the experimental results obtained in this Doctoral Thesis support the use of fibrin-agarose hydrogel for the generation of both, pathological models of disease, and therapeutic alternatives for the repair of tissue lesions, thus fulfilling the two fundamental applications of the products generated by tissue engineering strategies.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atala A. Organ preservation, organ and cell transplantation, tissue engineering, and regenerative medicine: the terms may change, but the goals remain the same. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(3-4):445-6.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
3. Campos A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de Ingreso Real Academia Nacional de Medicina*. 2004.
4. Martin-Piedra MA, Santisteban-Espejo A, Moral-Munoz JA, Campos F, Chato-Astrain J, Garcia-Garcia OD, et al. An Evolutive and Scientometric Research on Tissue Engineering Reviews. *Tissue Eng Part A*. 2020;26(9-10):569-77.
5. Santisteban-Espejo A, Campos F, Martin-Piedra L, Durand-Herrera D, Moral-Munoz JA, Campos A, et al. Global Tissue Engineering Trends: A Scientometric and Evolutive Study. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(19-20):1504-17.
6. Garzon I, Miyake J, Gonzalez-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sanchez-Quevedo Mdel C, et al. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(8):625-32.
7. Carriel V, Garzon I, Jimenez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, et al. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells, tissues, organs*. 2012;196(1):1-12.
8. Garzon I, Martin-Piedra MA, Alfonso-Rodriguez C, Gonzalez-Andrades M, Carriel V, Martinez-Gomez C, et al. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(7):4073-83.
9. Garcia-Martinez L, Campos F, Godoy-Guzman C, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Garzon I, Alaminos M, et al. Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem Cell Biol*. 2017;147(1):83-95.
10. Fernandez-Valades-Gamez R, Garzon I, Liceras-Liceras E, Espana-Lopez A, Carriel V, Martin-Piedra MA, et al. Usefulness of a bioengineered oral

mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. *Biomedical materials*. 2016;11(1):015015.

11. Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, et al. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;11(5):1412-26.

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

13. Vacanti J. Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *J Pediatr Surg*. 2010;45(2):291-4.

14. Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation*. 2002;70(8):397-409.

15. Collas P, Hakelien AM. Teaching cells new tricks. *Trends Biotechnol*. 2003;21(8):354-61.

16. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001;414(6859):118-21.

17. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:297-303.

18. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414(6859):98-104.

19. Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*. 2001;414(6859):122-8.

20. Atala A. Regenerative medicine strategies. *J Pediatr Surg*. 2012;47(1):17-28.

21. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2012;18(6):408-19.

22. Alaminos M, Perez-Kohler B, Garzon I, Garcia-Honduvilla N, Romero B, Campos A, et al. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2010;223(3):640-7.

23. Elshamy WM, Duhe RJ. Overview: cellular plasticity, cancer stem cells and metastasis. *Cancer Lett*. 2013;341(1):2-8.

24. Liu T, Chen L, Zhao Z, Zhang S. Toward a Reconceptualization of Stem Cells from Cellular Plasticity. *Int J Stem Cells*. 2019;12(1):1-7.
25. Carriel V. Preclinical Evaluation of Bio-artificial Conduits Developed by Tissue Engineering for Peripheral Nerve Regeneration [PhD]. Ghent, Belgium ; Granada, Spain: : Ghent University. Faculty of Medicine and Health Sciences ; University of Granada. Faculty of Medicine; 2017.
26. Geneser F. *Histología*. 2ª ed. Buenos Aires ; Madrid: Médica Panamericana; 1993. 768 p. p.
27. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histología y biología celular : introducción a la anatomía patológica*. 4ª ed. Barcelona: Elsevier; 2015. XIV, 733 p. p.
28. Stocum DL. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2004;176:III-VIII, 1-101, back cover.
29. Stocum DL. *Regenerative Biology and Medicine*: Elsevier Science; 2012.
30. Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(9):551-64.
31. Bonhome-Espinosa AB, Campos F, Durand-Herrera D, Sanchez-Lopez JD, Schaub S, Duran JDG, et al. In vitro characterization of a novel magnetic fibrin-agarose hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;104:103619.
32. Bonhome-Espinosa AB, Campos F, Rodriguez IA, Carriel V, Marins JA, Zubarev A, et al. Effect of particle concentration on the microstructural and macromechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels. *Soft Matter*. 2017;13(16):2928-41.
33. Pastor M, Moreno-Sastre M, Esquisabel A, Sans E, Vinas M, Bachiller D, et al. Sodium colistimethate loaded lipid nanocarriers for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. *Int J Pharm*. 2014;477(1-2):485-94.
34. Vairo C, Collantes M, Quincoces G, Villullas S, Penuelas I, Pastor M, et al. Preclinical safety of topically administered nanostructured lipid carriers (NLC) for wound healing application: biodistribution and toxicity studies. *Int J Pharm*. 2019;569:118484.
35. Chato-Astrain J, Chato-Astrain I, Sanchez-Porrás D, Garcia-Garcia OD, Bermejo-Casares F, Vairo C, et al. Generation of a novel human dermal

substitute functionalized with antibiotic-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) with antimicrobial properties for tissue engineering. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):174.

36. Mills SE. *Histology for pathologists* / editor: Stacey E. Mills. 4th ed ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. xxi, 1331 p. p.

37. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002;295(5557):1009-14.

38. Williams DF. The biomaterials conundrum in tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(7-8):1129-31.

39. Carriel V, Alaminos M, Garzon I, Campos A, Cornelissen M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert Rev Neurother*. 2014;14(3):301-18.

40. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(24):6143-56.

41. Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Duran JD, Alaminos M, et al. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(8):2573-82.

42. Ionescu AM, Alaminos M, de la Cruz Cardona J, de Dios Garcia-Lopez Duran J, Gonzalez-Andrades M, Ghinea R, et al. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(8):1963-73.

43. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Vizcaino G, Rodriguez IA, Duran-Herrera D, Lopez-Lopez MT, et al. Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomedical materials*. 2018;13(2):025021.

44. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Garcia-Martinez L, Duran JD, Lopez-Lopez MT, Alaminos M, et al. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomedical materials*. 2016;11(5):055004.

45. Ionescu AM, Chato-Astrain J, Cardona Perez JC, Campos F, Perez Gomez M, Alaminos M, et al. Evaluation of the optical and biomechanical properties of bioengineered human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *J Biomed Opt*. 2020;25(5):1-16.

46. Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes P, Garzon I, Garcia-Garcia S, Saez-Moreno JA, et al. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of neural engineering*. 2013;10(2):026022.
47. Binyamin G, Shafi BM, Mery CM. *Biomaterials: a primer for surgeons*. *Semin Pediatr Surg*. 2006;15(4):276-83.
48. Lanza RP, Langer RS, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier / Academic Press; 2007. xxvii, 1307 p. p.
49. Philips C, Campos F, Roosens A, Sanchez-Quevedo MDC, Declercq H, Carriel V. Qualitative and Quantitative Evaluation of a Novel Detergent-Based Method for Decellularization of Peripheral Nerves. *Ann Biomed Eng*. 2018;46(11):1921-37.
50. Philips C, Cornelissen M, Carriel V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *Journal of neural engineering*. 2018;15(2):021003.
51. Oliveira AC, Garzon I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One*. 2013;8(6):e66538.
52. Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, Del Mar Perez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):215-22.
53. Liao J, Xu B, Zhang R, Fan Y, Xie H, Li X. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives. *J Mater Chem B*. 2020.
54. Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface*. 2012;9(67):202-21.
55. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(8):3311-7.

56. Vinuela-Prieto JM, Sanchez-Quevedo MC, Alfonso-Rodriguez CA, Oliveira AC, Scionti G, Martin-Piedra MA, et al. Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. *J Periodontal Res.* 2015;50(5):658-65.
57. Martin-Piedra MA, Garzon I, Gomez-Sotelo A, Garcia-Abril E, Jaimes-Parra BD, Lopez-Cantarero M, et al. Generation and Evaluation of Novel Stromal Cell-Containing Tissue Engineered Artificial Stromas for the Surgical Repair of Abdominal Defects. *Biotechnology journal.* 2017;12(12).
58. Jaimes-Parra BD, Valle-Diaz de la Guardia F, Arrabal-Polo MA, Herrera-Imbroda B, Lara MF, Machuca-Santa-Cruz FJ, et al. Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *Int J Urol.* 2016;23(1):85-92.
59. Martin-Piedra MA, Alaminos M, Fernandez-Valades-Gamez R, Espana-Lopez A, Licerias-Licerias E, Sanchez-Montesinos I, et al. Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(3):377-88.
60. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):199-215.
61. Shpichka A, Osipova D, Efremov Y, Bikmulina P, Kosheleva N, Lipina M, et al. Fibrin-based Bioinks: New Tricks from an Old Dog. *Int J Bioprint.* 2020;6(3):269.
62. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1894-904.
63. Zarrintaj P, Manouchehri S, Ahmadi Z, Saeb MR, Urbanska AM, Kaplan DL, et al. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2018;187:66-84.
64. Durand-Herrera D, Campos F, Jaimes-Parra BD, Sanchez-Lopez JD, Fernandez-Valades R, Alaminos M, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. *Histochem Cell Biol.* 2018;150(4):379-93.
65. Garzon I, Chato-Astrain J, Gonzalez-Gallardo C, Ionescu A, Cardona JC, Mateu M, et al. Long-Term in vivo Evaluation of Orthotypical and Heterotypical Bioengineered Human Corneas. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:681.

66. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17(12):1063-72.
67. Fawcett DW, Jensch RP. Bloom & Fawcett : concise histology. New York: Chapman and Hall : International Thomson Pub.; 1997. vii, 312 p. p.
68. Gartner LP, Hiatt JL. Atlas en color y texto de histología: Médica Panamericana; 2015.
69. Welsch U, Sobotta J. Histología. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. XII, 676 p. p.
70. Brettmann EA, de Guzman Strong C. Recent evolution of the human skin barrier. *Exp Dermatol*. 2018;27(8):859-66.
71. Schulz W. Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook: Springer Science & Business Media; 2005.
72. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, Fritz A, Greene F. AJCC cancer staging manual: Springer New York; 2010.
73. Buethe D, Warner C, Miedler J, Cockerell CJ. Focus Issue on Squamous Cell Carcinoma: Practical Concerns Regarding the 7th Edition AJCC Staging Guidelines. *J Skin Cancer*. 2011;2011:156391.
74. Warner CL, Cockerell CJ. The new seventh edition American Joint Committee on Cancer staging of cutaneous non-melanoma skin cancer: a critical review. *Am J Clin Dermatol*. 2011;12(3):147-54.
75. Zhang W, Ge Y, Cheng Q, Zhang Q, Fang L, Zheng J. Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget*. 2018;9(4):5480-91.
76. Cid S, Eiro N, Fernandez B, Sanchez R, Andicoechea A, Fernandez-Muniz PI, et al. Prognostic Influence of Tumor Stroma on Breast Cancer Subtypes. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(1):e123-e33.
77. Lacina L, Plzak J, Kodet O, Szabo P, Chovanec M, Dvorankova B, et al. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):24094-110.
78. Mifkova A, Kodet O, Szabo P, Kucera J, Dvorankova B, Andre S, et al. Synthetic polyamine BPA-C8 inhibits TGF-beta1-mediated conversion of human dermal fibroblast to myofibroblasts and establishment of galectin-1-rich extracellular matrix in vitro. *Chembiochem*. 2014;15(10):1465-70.

79. Nuno-Gonzalez A, Vicente-Martin FJ, Pinedo-Moraleta F, Lopez-Estebarez JL. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(7):567-78.
80. Egea-Guerrero JJ, Carmona G, Correa E, Mata R, Arias-Santiago S, Alaminos M, et al. Transplant of Tissue-Engineered Artificial Autologous Human Skin in Andalusia: An Example of Coordination and Institutional Collaboration. *Transplant Proc.* 2019;51(9):3047-50.
81. Ponec M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54 Suppl 1:S19-30.
82. Commandeur S, de Grujil FR, Willemze R, Tensen CP, El Ghalbzouri A. An in vitro three-dimensional model of primary human cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol.* 2009;18(10):849-56.
83. Brauchle E, Johannsen H, Nolan S, Thude S, Schenke-Layland K. Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system. *Biomaterials.* 2013;34(30):7401-7.
84. Brauchle E, Bauer H, Fernes P, Zuk A, Schenke-Layland K, Sengle G. Raman microspectroscopy as a diagnostic tool for the non-invasive analysis of fibrillin-1 deficiency in the skin and in the in vitro skin models. *Acta Biomater.* 2017;52:41-8.
85. Mills SE. *Histology for pathologists.* 3rd ed. Philadelphia etc.: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. XI, 1272 p. p.
86. Mescher A. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fifteenth Edition:* McGraw-Hill Education; 2018.
87. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Czaja K, et al. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *International review of neurobiology.* 2009;87:27-46.
88. Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II-morphological techniques. *International review of neurobiology.* 2009;87:81-103.
89. Kierszenbaum AL. *Histology and cell biology : an introduction to pathology.* 5th edition. ed. St. Louis, MO: Elsevier Inc; 2019. pages cm p.

90. Spiegel I, Peles E. Cellular junctions of myelinated nerves (Review). *Mol Membr Biol.* 2002;19(2):95-101.
91. Pavelka M, Roth J. *Functional ultrastructure : Atlas of tissue biology and pathology.* 2nd, rev. and enl. ed. New York: SpringerWein; 2010. xvii, 366 p. p.
92. Arroyo EJ, Scherer SS. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol.* 2000;113(1):1-18.
93. Meier C, Dermietzel R, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE. Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt-Lanterman incisures. *J Neurosci.* 2004;24(13):3186-98.
94. Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia.* 2008;56(14):1518-31.
95. Carriel V, Garzon I, Alaminos M, Cornelissen M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen Res.* 2014;9(18):1657-60.
96. Topp KS, Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys Ther.* 2006;86(1):92-109.
97. Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue barriers.* 2013;1(3):e24956.
98. Pina-Oviedo S, Del Valle L, Baquera-Heredia J, Ortiz-Hidalgo C. Immunohistochemical characterization of Renault bodies in superficial digital nerves: further evidence supporting their perineurial cell origin. *J Peripher Nerv Syst.* 2009;14(1):22-6.
99. Ubogu EE. The molecular and biophysical characterization of the human blood-nerve barrier: current concepts. *J Vasc Res.* 2013;50(4):289-303.
100. Lundborg G. *Nerve injury and repair. Regeneration, reconstruction and cortical re-modelling.* Elsevier, Philadelphia; 2004.
101. de Ruitter GC, Spinner RJ, Verhaagen J, Malessy MJ. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. *J Neurosurg.* 2014;120(2):493-501.
102. Navarro X. Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *International review of neurobiology.* 2009;87:483-505.

103. Sun Q, Tu H, Xing GG, Han JS, Wan Y. Ectopic discharges from injured nerve fibers are highly correlated with tactile allodynia only in early, but not late, stage in rats with spinal nerve ligation. *Exp Neurol*. 2005;191(1):128-36.
104. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2011;8:109.
105. Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol*. 2015;130(5):605-18.
106. Nesbitt JA, Acland RD. Histopathological changes following removal of the perineurium. *J Neurosurg*. 1980;53(2):233-8.
107. Moore AM, Wagner IJ, Fox IK. Principles of nerve repair in complex wounds of the upper extremity. *Semin Plast Surg*. 2015;29(1):40-7.
108. Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir Suppl*. 2007;100:37-8.
109. Moore AM, Kasukurthi R, Magill CK, Farhadi HF, Borschel GH, Mackinnon SE. Limitations of conduits in peripheral nerve repairs. *Hand (N Y)*. 2009;4(2):180-6.
110. Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurological research*. 2004;26(2):151-60.
111. Siemionow M, Sonmez E. Nerve allograft transplantation: a review. *J Reconstr Microsurg*. 2007;23(8):511-20.
112. Stefanescu O, Jecan R, Badoiu S, Enescu DM, Lascar I. Peripheral nerve allograft, a reconstructive solution: outcomes and benefits. *Chirurgia (Bucur)*. 2012;107(4):438-41.
113. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107(6):1419-29.
114. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
115. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury*. 2012;43(5):553-72.

116. Lovati AB, D'Arrigo D, Odella S, Tos P, Geuna S, Raimondo S. Nerve Repair Using Decellularized Nerve Grafts in Rat Models. A Review of the Literature. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:427.
117. Roosens A, Somers P, De Somer F, Carriel V, Van Nooten G, Cornelissen R. Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(9):2827-39.
118. Buckenmeyer MJ, Meder TJ, Prest TA, Brown BN. Decellularization techniques and their applications for the repair and regeneration of the nervous system. *Methods.* 2020;171:41-61.
119. Chato-Astrain J, Philips C, Campos F, Durand-Herrera D, Garcia-Garcia OD, Roosens A, et al. Detergent-based decellularized peripheral nerve allografts: An in vivo preclinical study in the rat sciatic nerve injury model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2020;14(6):789-806.
120. Fornasari BE, Carta G, Gambarotta G, Raimondo S. Natural-Based Biomaterials for Peripheral Nerve Injury Repair. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:554257.
121. Carvalho CR, Chang W, Silva-Correia J, Reis RL, Oliveira JM, Kohn J. Engineering Silk Fibroin-Based Nerve Conduit with Neurotrophic Factors for Proximal Protection after Peripheral Nerve Injury. *Adv Healthc Mater.* 2020:e2000753.
122. Jiang H, Qian Y, Fan C, Ouyang Y. Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:582646.
123. Wangensteen KJ, Kalliainen LK. Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis. *Hand (N Y).* 2010;5(3):273-7.
124. Zheng L, Cui HF. Use of chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells for promoting peripheral nerve regeneration. *Journal of materials science Materials in medicine.* 2010;21(5):1713-20.
125. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One.* 2011;6(3):e17899.

126. Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol*. 2011;228(2):242-52.
127. Georgiou M, Golding JP, Loughlin AJ, Kingham PJ, Phillips JB. Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *Biomaterials*. 2015;37:242-51.
128. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1417-23.
129. Ramirez RD, Herbert BS, Vaughan MB, Zou Y, Gandia K, Morales CP, et al. Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene*. 2003;22(3):433-44.
130. Kalabis J, Wong GS, Vega ME, Natsuizaka M, Robertson ES, Herlyn M, et al. Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc*. 2012;7(2):235-46.
131. Di Scipio F, Raimondo S, Tos P, Geuna S. A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microscopy research and technique*. 2008;71(7):497-502.
132. Sun CK, Yen CH, Lin YC, Tsai TH, Chang LT, Kao YH, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *Journal of translational medicine*. 2011;9:118.
133. Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells*. 2014;7(2):135-42.
134. Vleggeert-Lankamp CL. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. *Laboratory investigation*. *J Neurosurg*. 2007;107(6):1168-89.
135. Chato-Astrain J, Campos F, Roda O, Miralles E, Durand-Herrera D, Saez-Moreno JA, et al. In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels

With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:501.

136. Shea JE, Garlick JW, Salama ME, Mendenhall SD, Moran LA, Agarwal JP. Side-to-side nerve bridges reduce muscle atrophy after peripheral nerve injury in a rodent model. *J Surg Res.* 2014;187(1):350-8.

137. Carriel V, Garzon I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2014.

138. Carriel V, Garzon I, Alaminos M, Campos A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochem Cell Biol.* 2011;136(6):709-17.

139. Carriel V, Campos A, Alaminos M, Raimondo S, Geuna S. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods in molecular biology.* 2017;1560:207-18.

140. Sun Y, Li A, Liu X, Wang Q, Bai Y, Liu Z, et al. A panel of biomarkers for skin squamous cell carcinoma: various functional entities and differential responses to resveratrol. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(4):1363-77.

141. Compton LA, Murphy GF, Lian CG. Diagnostic Immunohistochemistry in Cutaneous Neoplasia: An Update. *Dermatopathology (Basel).* 2015;2(1):15-42.

142. Matos LL, Menderico Junior GM, Theodoro TR, Pasini FS, Ishikawa MM, Ribeiro AAB, et al. Cancer-associated fibroblast regulation by microRNAs promotes invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020;110:104909.

143. Chen SF, Nieh S, Jao SW, Wu MZ, Liu CL, Chang YC, et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2013;231(2):180-9.

144. Aprelikova O, Green JE. MicroRNA regulation in cancer-associated fibroblasts. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(2):231-7.

145. McGrath AM, Brohlin M, Kingham PJ, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN. Fibrin conduit supplemented with human mesenchymal stem cells and

immunosuppressive treatment enhances regeneration after peripheral nerve injury. *Neuroscience letters*. 2012;516(2):171-6.

146. Siemionow M, Duggan W, Brzezicki G, Klimczak A, Grykien C, Gatherwright J, et al. Peripheral nerve defect repair with epineural tubes supported with bone marrow stromal cells: a preliminary report. *Annals of plastic surgery*. 2011;67(1):73-84.

147. Georgiou M, Bunting SC, Davies HA, Loughlin AJ, Golding JP, Phillips JB. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 2013;34(30):7335-43.

148. den Dunnen WF, Meek MF. Sensory nerve function and auto-mutilation after reconstruction of various gap lengths with nerve guides and autologous nerve grafts. *Biomaterials*. 2001;22(10):1171-6.

149. Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 2012;98(1):16-37.

150. Meek MF, Den Dunnen WF, Schakenraad JM, Robinson PH. Long-term evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide, using walking track analysis and electrostimulation tests. *Microsurgery*. 1999;19(5):247-53.

151. Kappos EA, Engels PE, Tremp M, Meyer zu Schwabedissen M, di Summa P, Fischmann A, et al. Peripheral Nerve Repair: Multimodal Comparison of the Long-Term Regenerative Potential of Adipose Tissue-Derived Cells in a Biodegradable Conduit. *Stem cells and development*. 2015;24(18):2127-41.

152. Gonzalez-Perez F, Hernandez J, Heimann C, Phillips JB, Udina E, Navarro X. Schwann cells and mesenchymal stem cells in laminin- or fibronectin-aligned matrices and regeneration across a critical size defect of 15 mm in the rat sciatic nerve. *Journal of neurosurgery Spine*. 2018;28(1):109-18.

153. Navarro X. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *The European journal of neuroscience*. 2016;43(3):271-86.

154. Schuh C, Day AGE, Redl H, Phillips J. An Optimized Collagen-Fibrin Blend Engineered Neural Tissue Promotes Peripheral Nerve Repair. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(17-18):1332-40.

155. Wang ZZ, Sakiyama-Elbert SE. Matrices, scaffolds & carriers for cell delivery in nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2018.
156. Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML. A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers. *Microsurgery*. 2001;21(3):96-101.
157. Ronchi G, Fornasari BE, Crosio A, Budau CA, Tos P, Perroteau I, et al. Chitosan Tubes Enriched with Fresh Skeletal Muscle Fibers for Primary Nerve Repair. *BioMed research international*. 2018;2018:9175248.
158. Lee JY, Giusti G, Friedrich PF, Archibald SJ, Kemnitzer JE, Patel J, et al. The effect of collagen nerve conduits filled with collagen-glycosaminoglycan matrix on peripheral motor nerve regeneration in a rat model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(22):2084-91.
159. Wieringa PA, Goncalves de Pinho AR, Micera S, van Wezel RJA, Moroni L. Biomimetic Architectures for Peripheral Nerve Repair: A Review of Biofabrication Strategies. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(8):e1701164.
160. Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol*. 1998;149(1):243-52.
161. Yao L, de Ruiter GC, Wang H, Knight AM, Spinner RJ, Yaszemski MJ, et al. Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit. *Biomaterials*. 2010;31(22):5789-97.
162. Faroni A, Smith RJ, Lu L, Reid AJ. Human Schwann-like cells derived from adipose-derived mesenchymal stem cells rapidly de-differentiate in the absence of stimulating medium. *The European journal of neuroscience*. 2016;43(3):417-30.
163. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*. 2010;5(2):103-10.
164. Tomita K, Madura T, Mantovani C, Terenghi G. Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation. *Journal of neuroscience research*. 2012;90(7):1392-402.

165. Zhang R, Rosen JM. The role of undifferentiated adipose-derived stem cells in peripheral nerve repair. *Neural regeneration research*. 2018;13(5):757-63.

