

*Universidad de Granada*  
Facultad de Medicina  
Departamento de Histología

**EFFECTO DEL USO DE SECRETOMA DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES EN LA GENERACIÓN DE PIEL HUMANA  
MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

Tesis Doctoral  
(Programa de Doctorado en Biomedicina)



Doctorando:

**Oriol Cases Perera**

Dirección de Tesis Doctoral:

**Dra. Dña. Ingrid J. Garzón Bello**

**Dr. D. Miguel Ángel Martín Piedra**

**EFFECTO DEL USO DE SECRETOMA DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES EN LA GENERACIÓN DE PIEL HUMANA  
MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

Memoria que presenta el Graduado en Medicina y  
Máster en Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas  
para aspirar al título de Doctor.

**Fdo: Oriol Cases Perera**

**Director**

Fdo: Dña. Ingrid J. Garzón Bello  
*Doctora en Ingeniería Tisular en  
Medicina y Odontología  
Universidad de Granada, España*

**Director**

Fdo: D. Miguel Ángel Martín Piedra  
*Doctor en Biomedicina  
Universidad de Granada, España*

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Oriol Cases Perera  
ISBN: 978-84-1117-676-7  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/80000>

El doctorando / *The doctoral candidate* **Oriol Cases Perera** y los directores de tesis / *and the thesis supervisor/s*: **Dra. Ingrid J. Garzón Bello y Dr. Miguel Ángel Martín Piedra.**

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

I

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

Lugar y fecha / *Place and date*: Granada, 1 de Septiembre de 2022

Director/es/ Supervisor/s;

Doctorando/*Doctor candidate*:

Fdo: Dra. Ingrid J. Garzón Bello  
y Dr. Miguel Ángel Martín Piedra

Fdo: Oriol Cases Perera



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en las instalaciones del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (Instituto de Salud Carlos III), por las becas FIS PI18/0331, FIS PI21/0980, FIS PI18/0332, FIS PI20/0317, ICI19/00024 e ICI21/00010, y por las becas PE-0395- 2019 y PI-0442-2019 de la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía (España). Se ha prestado apoyo adicional mediante la subvención B-CTS-450-UGR20 (proyectos de I+D+I en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, Universidad de Granada y Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades), y se ha contado con la cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional a través del programa "Una manera de hacer Europa".

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

Cases-Perera O, Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, Miranda-Fernández C, Campos F, Crespo P V, Sánchez-Montesinos I, Alaminos M, Martín-Piedra MA, Garzón I. Development of secretome-based strategies to improve cell culture protocols in tissue engineering. *Scientific Reports*. 2022;12(1):10003

DOI: [10.1038/s41598-022-14115-y](https://doi.org/10.1038/s41598-022-14115-y)

PMID: 35705659



A mi familia



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ingrid J. Garzón y al Dr. Miguel Ángel Martín Piedra por su constante dirección y supervisión. También quiero mostrar mi gratitud al Dr. Miguel Alaminos por su brillantez en los momentos más complicados. Asimismo, estoy en deuda con el Dr. Antonio Campos y el Dr. José Miguel Labrador por sembrar la semilla de este proyecto y despertar en mí el interés que me ha permitido llegar al final de este camino.

Del mismo modo, gracias a todos los integrantes del Departamento de Histología que trabajan en el laboratorio. Ellos me han abierto las puertas de su día a día estando siempre dispuestos a echar una mano. Especialmente a Cristina quien, de manera incansable, ha estado a mi lado durante este proyecto.

Finalmente, a mi familia, por acompañarme y hacerme llegar su satisfacción, indispensable durante toda esta etapa.



*“We choose to go to the moon in this decade and do the other things, not because they are easy, but because they are hard; because that goal will serve to organize and measure the best of our energies and skills, because that challenge is one that we are willing to accept, one we are unwilling to postpone, and one we intend to win”*

**John F. Kennedy**



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. La Piel.....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Generalidades y Funciones.....	7
1.1.2. Histología.....	8
1.1.2.1. Epidermis .....	8
1.1.2.2. Dermis.....	12
1.1.2.3. Hipodermis .....	14
1.1.2.4. Anejos cutáneos.....	15
1.1.2.5. Vascularización .....	17
1.1.2.6. Inervación.....	17
1.1.3. Patologías.....	18
1.1.4. Tratamientos.....	21
1.1.4.1. Tratamientos médicos.....	22
1.1.4.2. Tratamientos quirúrgicos.....	24
<b>1.2. La Cirugía Plástica Reparadora .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3. La Ingeniería Tisular .....</b>	<b>32</b>
1.3.1. La Célula.....	33
1.3.1.1. Células madre .....	33
1.3.2. Los biomateriales.....	37
1.3.3. Las moléculas de señalización .....	38
1.3.3.1. Secretoma.....	41

1.3.3.1.1. Secretoma de células madre mesenquimales de tejido adiposo .....	44
1.3.3.1.2. Secretoma de células madre mesenquimales de gelatina de Wharton.....	45
1.3.3.1.3. Secretoma de células madre mesenquimales de pulpa dental .....	47
<b>1.4. Papel de la Ingeniería Tisular en la Cirugía Reparadora .....</b>	<b>49</b>
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>57</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
4.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de las células madre mesenquimales (CMM) .....	67
4.2. Cultivo de células epiteliales de piel humana. ....	70
4.3. Obtención y caracterización proteica del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). ....	71
4.4. Análisis <i>in vitro</i> del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) sobre células epiteliales humanas. ....	73
4.4.1. Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana. ....	74
4.4.2. Análisis de la proliferación de las células epiteliales de piel humana..	76
4.4.3. Prueba de reparación de heridas .....	78
4.5. Análisis <i>in vivo</i> del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). ....	79
4.6. Análisis Estadístico .....	82

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de las células madre mesenquimales (CMM). .....</b>	<b>87</b>
<b>5.2. Caracterización proteica del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). .....</b>	<b>88</b>
<b>5.3. Análisis <i>in vitro</i> del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) sobre células epiteliales humanas .....</b>	<b>94</b>
5.3.1. <i>Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana .....</i>	94
5.3.2. <i>Análisis de la proliferación de las células epiteliales de piel humana.....</i>	99
5.3.3. <i>Prueba de reparación de heridas .....</i>	105
<b>5.4. Análisis <i>in vivo</i> del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). .....</b>	<b>109</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>113</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>135</b>



# RESUMEN



Los recientes avances en el campo de la Ingeniería Tisular han permitido el desarrollo de diferentes estrategias para la generación de piel artificial, dando respuesta terapéutica a déficits cutáneos de gran tamaño. Estos progresos son de vital importancia en el algoritmo terapéutico de las quemaduras de gran extensión y constituyen el marco idóneo para el perfeccionamiento de numerosas herramientas de reparación y reemplazo tisular.

Uno de los principales inconvenientes de la piel artificial es el requerimiento de una gran cantidad de células epiteliales viables en un periodo corto de tiempo. Consecuentemente, el proceso de biofabricación de piel artificial es especialmente complejo. En este sentido, las estrategias que permitan el perfeccionamiento de los cultivos de células epiteliales y reduzcan el tiempo de fabricación de la piel artificial podrían tener un gran impacto en los pacientes. El secretoma de las células madre mesenquimales puede contribuir a este propósito, tratándose de un producto de fácil obtención con un importante potencial terapéutico.

En la presente Tesis Doctoral se han estudiado tres fuentes de secretoma cuya obtención es sencilla y no genera morbilidades en la zona donante. Se trata del secretoma derivado de células madre mesenquimales del tejido adiposo, del secretoma derivado de células madre mesenquimales presentes en la pulpa dental y del secretoma derivado de células madre mesenquimales procedentes de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Así pues, se analizaron los efectos de estas tres fuentes de secretoma al aplicarse sobre cultivos de células epiteliales durante 24, 48, 72 y 120h. El diseño experimental *in vitro* determinó la capacidad del secretoma de mantener la viabilidad celular, potenciar la proliferación celular y favorecer la reparación de heridas. Posteriormente, se analizó el efecto del secretoma *in vivo* aplicándolo sobre lesiones infligidas en el dorso de ratas Wistar.

Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* demostraron que el uso de secretoma derivado de células madre mesenquimales podría mejorar los protocolos de cultivo de células epiteliales actualmente disponibles. Además, los resultados demostraron que el secretoma procedente de células madre mesenquimales de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton del cordón umbilical posee mayores efectos inductores que el secretoma obtenido de las células madre mesenquimales del tejido adiposo.

En lo que se refiere a los estudios *in vivo*, los resultados confirmaron los hallazgos encontrados a nivel *in vitro*. Así pues, se aprecia que las heridas de los animales tratados con secretoma de células madre mesenquimales de gelatina de Wharton del cordón umbilical y, sobre todo, las heridas de los animales tratados con secretoma de células madre mesenquimales de la pulpa dental tienden a mejorar los tiempos de reparación de heridas sin presentarse efectos secundarios.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral ponen de relieve que el uso de secretoma derivado de las células madre mesenquimales podría considerarse una herramienta terapéutica prometedora capaz de optimizar los procesos de reparación de heridas cutáneas así como de mejorar los tiempos de generación de piel artificial.

# 1. INTRODUCCIÓN



## **1.1. La Piel**

### **1.1.1. Generalidades y Funciones**

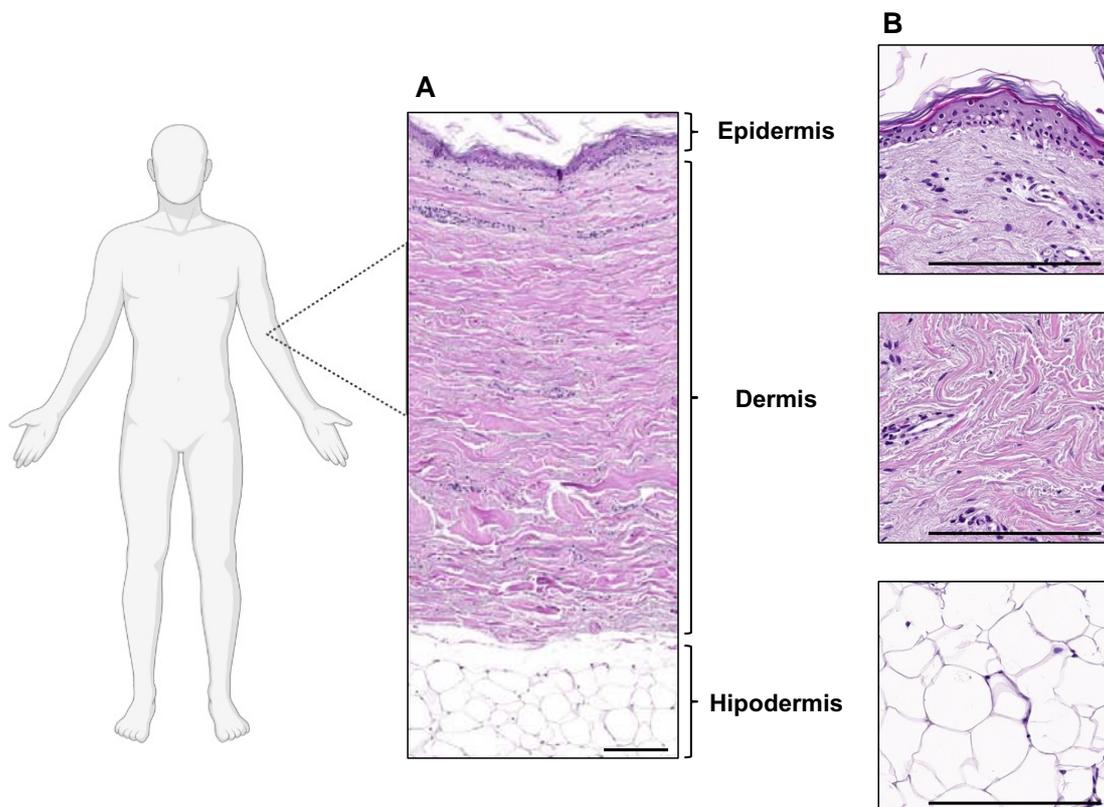
La piel es el órgano más grande del cuerpo y representa alrededor del 20% del peso del individuo. Su superficie aproximada es de 2 m<sup>2</sup> y posee un alto contenido en agua cuyo propósito es aportar turgencia y elasticidad a la piel, propiedades indispensables para el correcto desarrollo de las funciones que se le otorgan (1–3).

A este órgano se le atribuyen numerosas y variadas competencias, que van desde las funciones de protección y aislamiento a las funciones sensitivas, pasando por importantes funciones metabólicas. Así pues, una de las principales atribuciones de la piel es la protección y el aislamiento frente a agentes externos como el frío, el calor, la radiación ultravioleta, los agentes tóxicos, y los microorganismos. Asimismo, a la piel se le confiere una importante función sensitiva a través de la percepción de estímulos que permiten conocer el entorno y responder ante el mismo. Además, esta función sensitiva contribuye a la protección del organismo ya que permite la respuesta frente a estímulos nocivos como las quemaduras o las alteraciones de la solución de continuidad cutánea (4). Desde el punto de vista metabólico, otra de las funciones de la piel es la conservación del medio interno, es decir, el mantenimiento del equilibrio electrolítico e hidrostático, así como la termorregulación. Todo ello con el objetivo de conservar las características físicas y químicas corporales y el correcto desarrollo de las funciones vitales (5). Por último, la piel cumple un papel importante en el metabolismo de la vitamina D, concretamente participando en la activación enzimática de dicha vitamina mediante la acción de la radiación ultravioleta (6).

Una vez estudiadas las funciones de la piel se torna prioritario analizar su estructura histológica como eje fundamental para el entendimiento de la fisiología cutánea y su patología.

### 1.1.2. Histología

Desde el punto de vista histológico, la piel se compone de tres capas, que desde el exterior hacia el interior son la epidermis, la dermis y la hipodermis (7). A continuación, se describirán las principales características histológicas de cada una de ellas. Además, se detallarán las particularidades histológicas de los anejos cutáneos, la vascularización y la inervación de la piel (Figura 1).

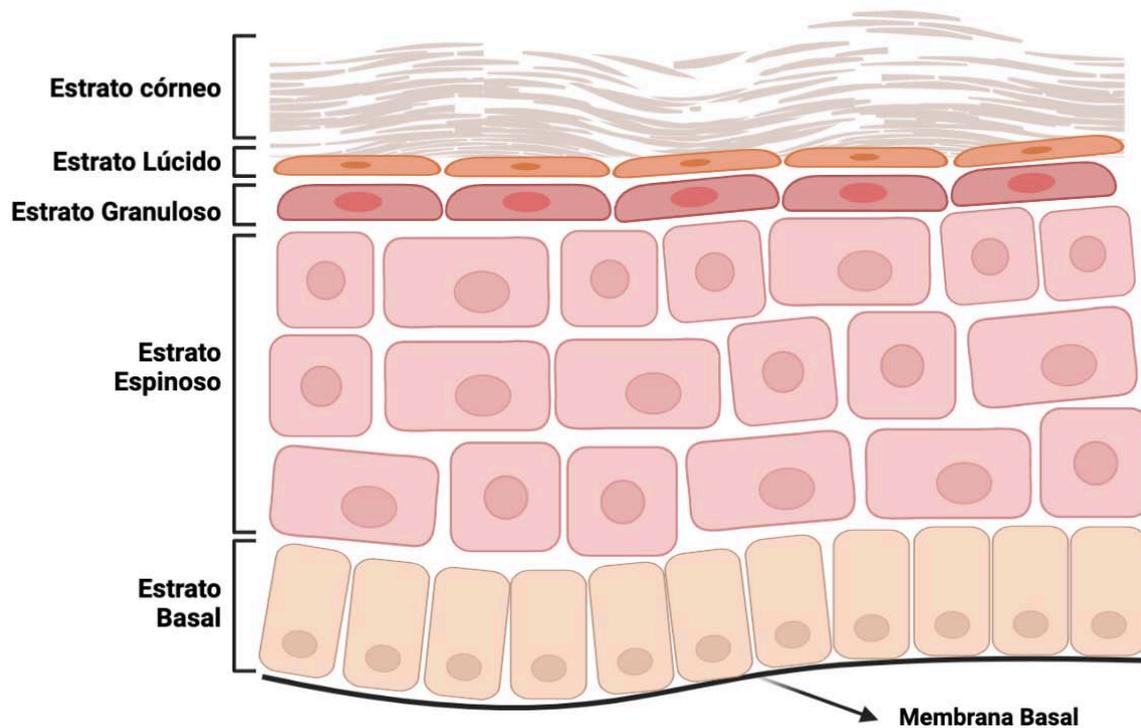


**Figura 1.** Imagen histológica de piel humana teñida mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina. A: Imagen general de las tres capas de la piel. B: Imágenes de cada una de las tres capas, desde la zona más externa a la más interna (epidermis, dermis e hipodermis). Barra de magnificación 200  $\mu$ m.

#### 1.1.2.1. Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel y su origen embriológico es el ectodermo. Esta capa está constituida principalmente por células epiteliales, denominadas queratinocitos, que se organizan formando un epitelio estratificado plano queratinizado. Este epitelio, a su vez, se orga-

niza en cuatro capas o estratos. En el caso de las palmas de las manos y las plantas de los pies, se distinguen cinco estratos, al añadirse el estrato lúcido a los cuatro estratos que conforman la estructura el resto de la piel del cuerpo. De interno a externo se distingue el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y, por último, el estrato córneo (8) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema del epitelio estratificado plano queratinizado de la epidermis humana. Los estratos que lo forman, desde la zona más interna a la externa, son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com)

El estrato más interno de la epidermis es el estrato basal, suprayacente a la membrana basal y constituido principalmente por queratinocitos de morfología cilíndrica. Los queratinocitos del estrato basal presentan una alta actividad mitótica debido a su alta capacidad de autorenovación. Además de queratinocitos, la epidermis de la piel en su estrato basal contiene células de Merkel y melanocitos (9). Las células de Merkel son receptores sensitivos cuya función principal es recibir estímulos de pre-

sión estando asociadas a fibras nerviosas amielínicas. Por otra parte, los melanocitos son células dendríticas originadas embriológicamente en la cresta neural, cuya función es la síntesis de melanina. La melanina, tiene como función principal la pigmentación de la piel y por ende, cumple una función fotoprotectora frente a los rayos ultravioleta (10).

Suprayacente al estrato basal, se encuentra el estrato espinoso o capa de Malpighi, el cual es el estrato más grueso de la epidermis. Sus células son poliédricas y presentan gran actividad mitótica, aunque menor en comparación con los queratinocitos del estrato basal. Uno de los hallazgos citológicos más relevantes de estos queratinocitos es la presencia abundante de uniones intercelulares de tipo desmosoma que mediante su observación empleando microscopía electrónica, muestran el patrón espinoso que da nombre a este estrato. Además de queratinocitos, en el estrato espinoso se encuentran las células de Langerhans, células dendríticas con prolongaciones citoplasmáticas que discurren entre los queratinocitos (11,12). Estas células dendríticas forman parte del sistema mononuclear fagocítico.

Continuando del estrato más interno a más externo se encuentra el estrato granuloso, formado por células que contienen gránulos de queratohialina, necesaria para la producción de queratina. Es en este estrato donde comienza el proceso de degeneración de los queratinocitos, manteniendo intactos aún todos sus componentes celulares (13). Como se ha mencionado anteriormente, en la piel gruesa, concretamente en la zona palmar de las manos y plantar de los pies, por encima del estrato granuloso, se puede identificar la presencia del estrato lúcido (14). Este estrato lúcido está compuesto por queratinocitos aplanados que carecen de núcleo y cuyo citoplasma es rico en filamentos de eleidina y queratina. La eleidina es una forma intermedia entre la queratohialina y la queratina que otorga una apariencia de

transparencia al estrato lúcido característico de la zona palmar y plantar, contribuyendo a bloquear la penetración o pérdida de agua (15).

Finalmente, el estrato más superficial de la piel es el estrato córneo, formado esencialmente por células epiteliales denominadas corneocitos, carentes de núcleo y con alto contenido en queratina, una proteína hidrófoba que contribuye a la impermeabilidad de la piel al agua y cornifica la superficie cutánea (16).

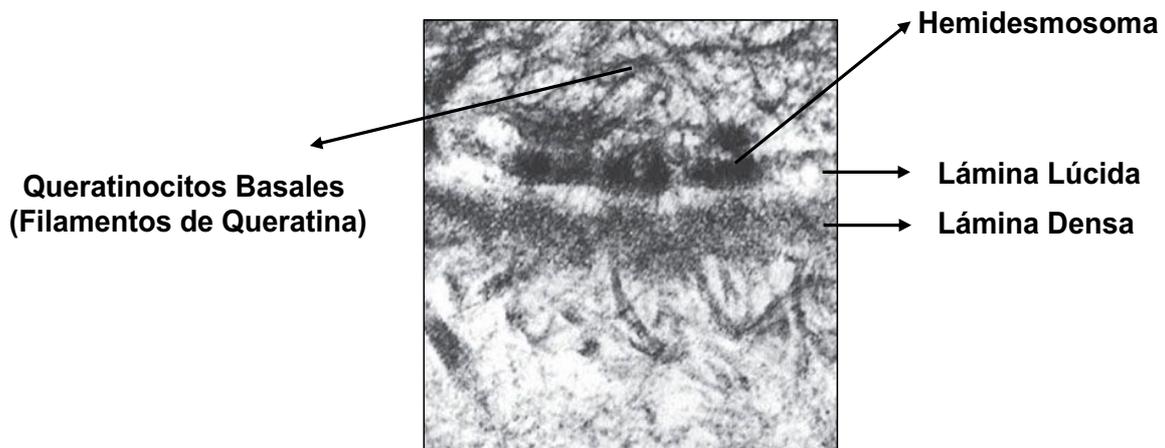
Los queratinocitos de la epidermis proliferan y maduran desde el estrato basal hasta el estrato córneo mediante un proceso de diferenciación celular que tarda aproximadamente 28 días, pasado el cual los corneocitos acaban descamándose de manera natural, siendo sustituidos por nuevas células de estratos subyacentes en un proceso de autorenovación continua (17).

Inferior a la epidermis se localiza la membrana basal. Este sitio de anclaje entre la epidermis y la dermis constituye la unión dermoepidérmica de la piel (Figura 3). En este sentido, la función de la membrana basal es principalmente mecánica, ya que permite la adhesión de la epidermis a la dermis y por tanto, aporta estabilidad funcional a la unión dermoepidérmica. Para llevar a cabo la función de anclaje entre las células epiteliales y la membrana basal es necesario contar con la presencia de estructuras de unión denominadas hemidesmosomas. Concretamente, los hemidesmosomas se sitúan en la superficie inferior de los queratinocitos basales, en la que se identifica una placa de fijación intracitoplasmática a la que se unen estructuras filamentosas con un dominio intracelular, un segmento transmembranoso y un dominio extracelular que se proyecta hacia la membrana basal (18).

La membrana basal cuenta con dos estructuras principales, la lámina lúcida y la lámina densa, cuya identificación requiere del uso de un microscopio electrónico de alta capacidad de resolución de ultraestructuras. En

la lámina lúcida, situada suprayacente a la lámina densa (Figura 3), se encuentran varias estructuras filamentosas finas con función de anclaje que se extienden desde los hemidesmosomas de los queratinocitos basales hasta la lámina densa. El componente principal de estas estructuras filamentosas es la laminina, una glucoproteína que, conjuntamente con otras moléculas como el colágeno, la entactina o la fibronectina hace posible esta función estructural (19).

Subyacente a la lámina lúcida se observa la lámina densa, una estructura de 35-45 nm cuya función es el anclaje de las estructuras filamentosas que atraviesan la lámina lúcida, dando así sostén a los queratinocitos basales (Figura 3). El principal componente de la lámina densa es el colágeno tipo IV, sin embargo, también se encuentran proteoglicanos y laminina (20).



**Figura 3.** Imagen de la membrana basal de la piel humana obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Se identifica la lámina lúcida, la lámina densa y los hemidesmosomas. Imagen obtenida y modificada de [plasticsurgerykey.com](http://plasticsurgerykey.com)

#### 1.1.2.2. Dermis

Inferior y en contacto con la membrana basal se encuentra la dermis, una capa que deriva embriológicamente del mesodermo. Las funciones principales de la dermis son servir de soporte estructural de la piel así como

contribuir a la nutrición de la epidermis (21). Se distinguen dos elementos principales: células y matriz extracelular.

A nivel celular, en la dermis se hallan fibroblastos cuya función es sintetizar fibras de colágeno y elásticas (22). Otro tipo celular presente en la dermis de la piel son los macrófagos, que forman parte del sistema mononuclear fagocítico y desarrollan funciones de defensa mediante la eliminación de microorganismos infecciosos (23). También es reseñable la presencia de mastocitos, células que contienen principalmente histamina y desempeñan un papel esencial en las reacciones alérgicas (24).

A nivel de matriz extracelular, la dermis está constituida por un componente fibrilar formado por fibras de colágeno y elásticas en su mayoría, y un componente no fibrilar constituido por proteoglicanos, glucosaminoglicanos y glucoproteínas multiadhesivas (25). El componente fibrilar contiene fundamentalmente colágeno, el elemento más importante de la dermis y el responsable de la resistencia tensional. La elastina, por su parte, es el principal componente de las fibras elásticas, que se encargan de aportar elasticidad a la piel (26). En relación al componente no fibrilar, también llamado sustancia fundamental, está constituido por proteoglicanos, glucosaminoglicanos, y glucoproteínas multiadhesivas cuya función es mantener el equilibrio ácido-básico y permitir la adhesión e interacción de la células de la dermis con los componentes fibrilares de la matriz extracelular (27).

En la dermis de la piel humana se pueden distinguir dos zonas histológicamente bien definidas, la dermis papilar y la dermis reticular. La dermis papilar es la parte de la dermis más superficial y contiene abundantes fibras elásticas filiformes que se organizan formando una red irregular con un alto contenido en moléculas de colágeno de tipo I y III. Además, la dermis papilar cuenta con numerosos vasos sanguíneos que irrigan la epidermis, así como prolongaciones nerviosas relacionadas con la función sensorial de la piel.

En segundo lugar, y situándose por debajo de la dermis papilar, se localiza la dermis reticular. La dermis reticular es una estructura con un espesor mayor que la dermis papilar y se caracteriza por tener haces gruesos e irregulares de fibras elásticas y de colágeno, sobre todo de tipo I (28). La orientación de estas fibras genera las líneas regulares de la piel conocidas como líneas de Langer. Estas líneas serán importantes a nivel clínico, ya que la disposición de las incisiones y la cicatrización paralela a estas líneas disminuye la probabilidad de cicatrices patológicas y a su vez contribuye a la obtención de mejores resultados estéticos (29).

#### *1.1.2.3. Hipodermis*

De superficial a profundo, después de la dermis se encuentra la hipodermis. Esta capa de la piel está formada principalmente por lóbulos adiposos separados por septos fibrosos de tejido conectivo por los que discurren nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (30). Del mismo modo que la dermis, el origen embriológico de la hipodermis es el mesodermo.

En referencia a las principales funciones de la hipodermis debe mencionarse el aislamiento térmico y su contribución como reserva energética mediante los depósitos lipídicos que la configuran. Además, la hipodermis tiene un rol estructural importante permitiendo que la piel se deforme sin verse alterada su integridad. De esta manera, la hipodermis funciona también como protección contra traumatismos u otro tipo de agresiones mecánicas. La hipodermis es una zona en continua evolución, pues la síntesis y almacenamiento de grasa se prolonga durante toda la vida (31).

#### *1.1.2.4. Anejos cutáneos*

Tras describir las capas de la piel, a continuación se explicarán las características histológicas principales de los anejos cutáneos, estructuras que derivan de células epidérmicas de la capa basal que se invaginan hacia la dermis durante el desarrollo embrionario. Entre los anejos cutáneos se distinguen los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas ecrinas, las glándulas sudoríparas apocrinas y las uñas. Seguidamente se detallan sus principales características.

En primer lugar, el folículo piloso, que se dispone en la dermis y es sostenido en su base por el músculo piloerector. El folículo piloso se halla en relación con glándulas sebáceas y en algunas zonas está asociado también a glándulas sudoríparas apocrinas. Las únicas zonas del cuerpo en las que no se hallan folículos pilosos son las palmas de las manos, plantas de los pies y cara lateral de dedos tanto de manos como de pies. Los pelos están sometidos a un periodo cíclico de crecimiento cuya duración depende de la región corporal (32,33). En relación a su función, los pelos se relacionan con la recepción de estímulos táctiles, forman parte de los caracteres sexuales secundarios y se comportan como atributo estético en el cuero cabelludo (34). El epitelio folicular ejerce un papel fundamental ya que contiene una importante reserva de células basales a partir de las cuales tendrá lugar el proceso de reepitelización, una función muy importante en situaciones patológicas tales como las quemaduras (35). Las quemaduras que no responden al manejo conservador, es decir, las que no epitelizan espontáneamente y requieren abordajes quirúrgicos, son las quemaduras de segundo grado profundo y tercer grado. Una de las características para identificar la profundidad de las quemaduras es la ausencia de folículos pilosos y por lo tanto la incapacidad de epitelización espontánea (36).

Otro anejo cutáneo importante son las glándulas sebáceas. Se trata de estructuras dispuestas lateralmente a la vaina externa de la raíz del fo-

lículo piloso. Su distribución corporal es desigual siendo más numerosas en la cara, cuero cabelludo y periné (37). En algunos casos drenan directamente a la superficie cutánea y poseen nombres propios como el caso de la glándulas de Meibomio en los párpados o los tubérculos de Montgomery en la areola mamaria (38,39). Sin embargo, habitualmente drenan en el interior del folículo piloso. El contenido de las glándulas sebáceas se denomina sebo y consiste en una mezcla de lípidos. Debido a la naturaleza de su contenido, esta secreción es de carácter hidrofóbico y contribuye a mantener la flexibilidad y la hidratación de la piel además de colaborar en la defensa frente a microorganismos (40).

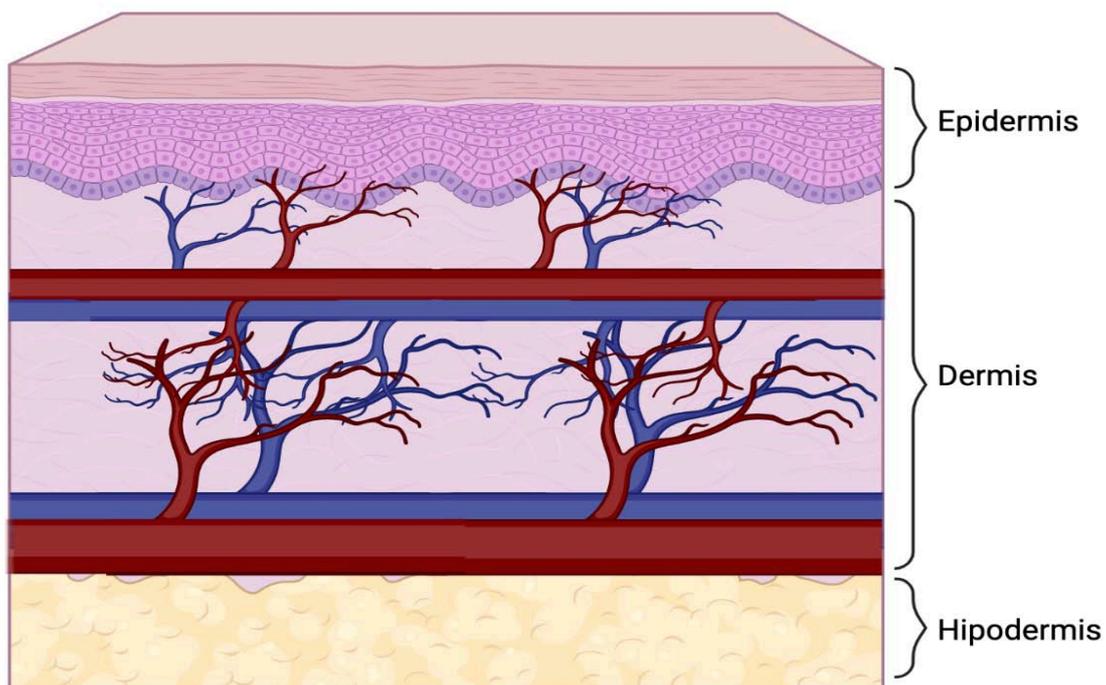
Además de los folículos y las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas también se consideran anejos cutáneos. Es importante distinguir dos subgrupos con características diferenciadas: las glándulas sudoríparas apocrinas y las eccrinas. Las primeras, cuya localización mayoritaria son las regiones axilar, mamaria y anogenital, producen una secreción más densa (41) y su componente secretor se ubica habitualmente en la parte más profunda de la dermis o en la hipodermis abriéndose a los folículos pilosos (42). Por otra parte, las glándulas sudoríparas eccrinas se distribuyen por todo el cuerpo y se abren directamente a la superficie de la piel. Su secreción es más líquida y se consideran elementos fundamentales en el proceso de termorregulación (43).

Finalmente, las uñas son láminas queratinizadas dispuestas sobre el lecho ungueal. La zona proximal de la uña posee una zona germinativa o matriz encargada de la producción de queratina y, por lo tanto, del crecimiento ungueal (44). La queratina hallada en las uñas se denomina queratina dura y no se descama, a diferencia de la queratina blanda, característica de los estratos más superficiales de la epidermis (45).

#### 1.1.2.5. Vascularización

El riego sanguíneo de la piel proviene de vasos perforantes septocutáneos o musculocutáneos, es decir, vasos que aportan irrigación proveniente de planos profundos a través de músculos o septos intermusculares (46,47). A continuación, el aporte sanguíneo se distribuye formando un plexo superficial y un plexo profundo comunicados a través de vasos intercomunicantes.

El plexo superficial se localiza en la porción alta de la dermis reticular desde el cual se generan asas capilares que se distribuyen por la dermis papilar. A su vez, el plexo vascular profundo se halla en la unión dermo-hipodérmica (Figura 4) (48).



**Figura 4.** Esquema del plexo vascular superficial, plexo vascular profundo y vasos intercomunicantes. (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

#### 1.1.2.6. Inervación

Una de las funciones más reseñables de la piel es la contribución a la percepción sensorial y a la relación con el entorno. Por una parte, el sis-

tema nervioso autónomo inerva las estructuras vasculares y los anejos cutáneos, mientras que la inervación responsable de la sensibilidad cutánea está formada por varios tipos de terminaciones nerviosas.

En primer lugar, existen terminaciones nerviosas libres, responsables de la percepción de la temperatura y el dolor. En segundo lugar, se distinguen terminaciones nerviosas asociadas al folículo piloso y, finalmente, destacan terminaciones encapsuladas donde se hallan los corpúsculos de Krause encargados de la percepción del frío, los corpúsculos de Ruffini relacionados con la percepción del calor, los corpúsculos de Meissner indispensables para el tacto fino o los corpúsculos de Pacini relacionados con la presión mecánica profunda y la vibración (49–51).

### **1.1.3. Patologías**

Existen numerosas enfermedades propias de la piel de características muy dispares. Además de estas alteraciones primarias, hay que considerar que la piel puede presentar alteraciones que pongan de manifiesto una enfermedad sistémica, es decir, una enfermedad que afecta al organismo por completo, además de la piel. Por este motivo, un diagnóstico temprano de las alteraciones cutáneas puede ser beneficioso para prevenir o tratar el avance de enfermedades sistémicas potencialmente dañinas. Algunos ejemplos de estas manifestaciones son las metástasis cutáneas o bien las alteraciones cutáneas apreciadas en el paciente diabético (52,53).

Es difícil resumir todas las patologías de la piel, sin embargo, es posible agruparlas. A continuación, se describen de forma resumida las distintas patologías cutáneas.

En primer lugar, las enfermedades infecciosas de la piel, dentro de las cuales se engloban las dermatosis bacterianas, las parasitosis, las infecciones causadas por micobacterias, las ocasionadas por virus así como las micosis, cuya causa son los hongos (54).

En segundo lugar, las dermatosis eritematoescamosas, donde tienen cabida la dermatitis por contacto, la dermatitis atópica, la dermatitis seborreica, la psoriasis o el liquen plano (55). Este grupo de enfermedades presentan como característica clínica común las lesiones descamativas sobre un fondo eritematoso o enrojecido. Aunque el diagnóstico de estas entidades suele ser clínico, en casos de dudas puede ser necesaria una biopsia, donde pueden hallarse alteraciones como la hiperqueratosis o aumento del espesor de la capa córnea de la epidermis y la paraqueratosis o presencia de núcleos en los corneocitos. Todo ello conduce a una hiperplasia epidérmica que se traduce en un engrosamiento del espesor de esta capa (56).

Siguiendo la descripción de los principales grupos de enfermedades dermatológicas se encuentran las patologías de base autoinmune. Se engloban en este grupo las enfermedades ampollosas o las conectivopatías. En general, las enfermedades autoinmunes presentan reacciones inmunitarias cuya diana son estructuras del propio organismo como la membrana basal o los desmosomas (57,58).

Además de las anteriores, deben considerarse las dermatosis metabólicas, que incluyen las porfirias, las manifestaciones cutáneas de la diabetes mellitus o las avitaminosis (59). Estas alteraciones metabólicas pueden ser sospechadas en base a alteraciones cutáneas precoces y su identificación en el examen clínico es esencial para iniciar el tratamiento de las mismas en estadios iniciales, mejorando así el pronóstico (60).

Otro gran grupo de patologías cutáneas lo configuran las vasculitis y las paniculitis. Se trata de un grupo heterogéneo de entidades caracterizado por la inflamación y la necrosis de los vasos sanguíneos en el caso de las vasculitis, y por la inflamación del tejido celular subcutáneo en el caso de las paniculitis (61, 62).

Existe también una larga lista de enfermedades que afectan a los anejos cutáneos. Las más reseñables y frecuentes son la hidrosadenitis supurativa o la alopecia. Dentro de los tipos de alopecia existen las debidas a procesos autoinmunes y las alopecias secundarias a tratamientos quimioterápicos. La alopecia también puede relacionarse con secuelas cicatriciales de etiología variada, así como formar parte del desarrollo fisiológico esperado en el varón y, por lo tanto, no relacionarse con un proceso patológico (63).

Un campo muy importante, sino el más importante, en lo que se refiere a alteraciones de la piel son los tumores. En este apartado es necesario distinguir entre lesiones benignas y malignas. En lo que atañe a las lesiones benignas, tienen cabida los quistes sebáceos, la queratosis seborreica, algunas malformaciones vasculares, los lipomas y los léntigos solares, entre otros (64).

Sin embargo, cuando nos referimos a lesiones malignas cabe destacar el carcinoma basocelular, siendo este el tumor cutáneo maligno más frecuente en raza blanca (65), el carcinoma espinocelular y el melanoma maligno. Existen también linfomas cutáneos y lesiones consideradas premalignas, es decir, zonas de la piel en las que ha habido cambios histológicos que, en caso de no tratarse, evolucionarán en un alto porcentaje a lesiones malignas (66). Puede que el caso más típico, en lo referido a lesiones premalignas, sea la queratosis actínica vinculada al daño por exposición solar y su evolución a carcinoma espinocelular (67).

Finalmente, cabe mencionar las lesiones cutáneas secundarias a agresiones externas agudas o subagudas (Figura 5) como pueden ser las quemaduras, las úlceras por presión, las heridas punzantes, o bien los déficits tisulares debidos a la escisión quirúrgica de procesos tumorales (68,69). Es en este grupo de patologías donde la Cirugía Plástica Reparadora tiene un papel más reseñable y probablemente se trate también

del grupo de patologías donde la Ingeniería Tisular tenga un rol más destacado.



**Figura 5.** A: Quemadura de segundo grado superficial en tórax. B: Amputación traumática de primer, segundo, tercer y cuarto dedo a diferentes niveles. Ambos pacientes fueron atendidos en el servicio de Urgencias del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada) por parte del servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética.

#### **1.1.4. Tratamientos**

El tratamiento de las lesiones dermatológicas se basa, en gran medida, en un diagnóstico adecuado. Así pues, es esencial distinguir las lesiones primarias, cuyo origen y manifestación principal es la piel, de las lesiones debidas a una enfermedad sistémica, es decir, que afecta al organismo por completo u a otros órganos distintos a la piel (70–72). De este modo, las enfermedades sistémicas deberán ser tratadas de manera general, centrandó la terapéutica en la enfermedad y no exclusivamente en la piel. Algunos ejemplos concretos son la dermatopatía diabética o las metástasis cutáneas de un carcinoma ductal mamario. En estos casos, el control estricto de los niveles de glucemia o el abordaje del proceso neoplásico mediante tratamiento quimioterápico serán los manejos terapéuticos que deberán contemplarse (73,74).

Por contra, en las lesiones dermatológicas primarias se abordará el tratamiento centrando la atención en la lesión cutánea y en el cese de la misma bien sea con herramientas médicas o quirúrgicas.

#### *1.1.4.1. Tratamientos médicos*

Se abordará el manejo terapéutico haciendo alusión a los grupos etiológicos mencionados en el apartado anterior. En primer lugar, las enfermedades infecciosas de la piel pueden tratarse de manera tópica o sistémica mediante el uso de antimicrobianos (54,75). Según las manifestaciones clínicas características y la posibilidad de complementar el proceso diagnóstico con un cultivo microbiológico y un antibiograma, se escogerá el mejor agente para erradicar el microorganismo que causa la clínica. En general, las herramientas de las que se dispone son los antibióticos, los antifúngicos y los antivirales, que pueden administrarse en diferentes formas y presentaciones (76–78).

En segundo lugar, las dermatosis eritematoescamosas, cuyo tratamiento deberá individualizarse según el proceso en cuestión. Casos especiales son las dermatitis por contacto, cuyo principal tratamiento será la supresión del agente causal de la dermatitis. En el caso de la dermatitis atópica, la dermatitis seborreica o la psoriasis, los principales agentes terapéuticos serán los corticoides y otros inmunomoduladores administrados de manera tópica y/o sistémica. Además, estos medicamentos irán acompañados de una correcta hidratación de la piel en el caso de la dermatitis atópica, de un antifúngico tópico en el caso de la dermatitis seborreica o, en el caso de la psoriasis, pueden ir acompañados de fototerapia o fotoquimioterapia para aprovechar el efecto de los rayos ultravioletas (79).

Otro gran grupo de enfermedades dermatológicas son las patologías de base autoinmune en las que se encuentran las enfermedades ampollasas y las conectivopatías. La mayoría de estas enfermedades deben ser

tratadas con corticoides orales y otros inmunomoduladores como la azatioprina, el micofenolato de mofetilo o el metotrexate (57).

En referencia a las vasculitis y las paniculitis, el tratamiento es variado y depende principalmente del tipo y grado de afectación sistémica. Se considera el tratamiento con fármacos que van desde antihistamínicos y antiinflamatorios no esteroideos hasta inmunomoduladores como la azatioprina o la ciclofosfamida, pasando por las sulfonas o los glucocorticoides orales (80).

Finalmente, dentro de las principales enfermedades que afectan a los anejos cutáneos se encuentra la hidrosadenitis supurativa y la alopecia. El tratamiento de la hidrosadenitis supurativa dependerá del grado y del estado de la lesión, distinguiéndose entre procesos inflamatorio o cicatricial. Se han descrito casos de respuesta terapéutica utilizando inmunomoduladores como el adalimumab y casos incoercibles que han requerido de desbridamiento quirúrgico y cobertura del defecto tisular mediante colgajos o injertos (81). El manejo de la alopecia es todavía más complejo y dependerá principalmente de la etiología de la misma. Cabe diferenciar la alopecia androgénica que puede contemplarse dentro del proceso de envejecimiento normal del varón y, por tanto, tratarse su abordaje de una mejoría estrictamente cosmética. En este caso se utilizan fármacos como el minoxidil o el finasteride que pueden combinarse con plasma rico en plaquetas administrado de manera intradérmica o tópica (82). En casos avanzados de alopecia androgénica o en caso de alopecias cicatriciales, se optará por el microinjerto capilar (83,84).

Como se ha mencionado en apartados anteriores, las etiologías traumáticas y tumorales son dos importantes causas de lesiones cutáneas que, de no tratarse, evolucionarán progresivamente pudiendo comprometer la vida del paciente. La mayoría de estas requerirán un tratamiento quirúrgico y serán abordadas en el siguiente apartado.

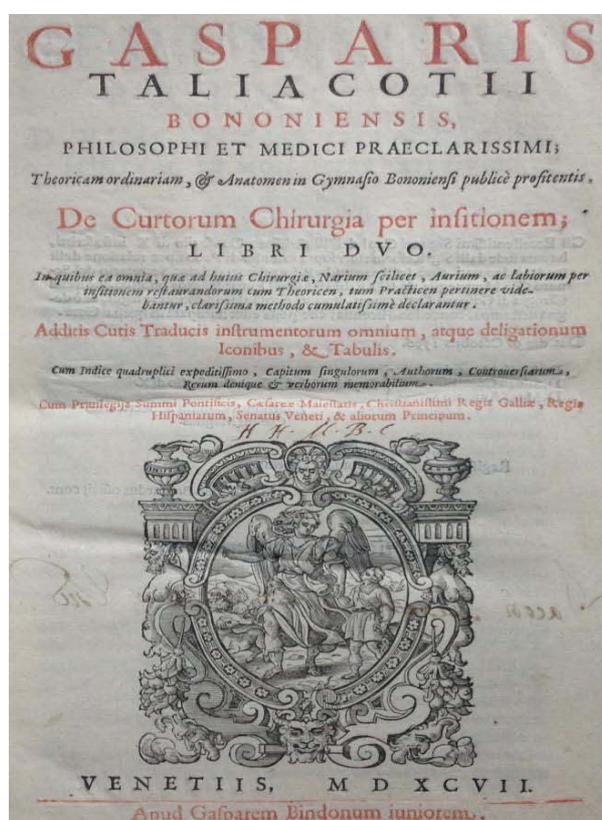
#### *1.1.4.2. Tratamientos quirúrgicos*

Una de las alteraciones patológicas más comunes de la piel son los tumores. Según su progresión y pronóstico se distingue entre tumores benignos y malignos. Los primeros serán tratados únicamente si producen molestias de tipo compresivo sobre estructuras circundantes o bien si tienen una importante repercusión estética (85). En lo que se refiere a los tumores malignos, un abordaje quirúrgico será necesario en la mayoría de casos, salvo en procesos muy avanzados cuyo manejo se centre en el tratamiento quimioterápico o radioterápico, o bien en procesos muy iniciales que puedan ser tratados mediante dermoabrasión química o criodermoabrasión con nitrógeno líquido (86,87). Secundariamente a la escisión del tumor deberá reconstruirse el déficit tisular consecuente. Para ello se dispone de numerosas herramientas de complejidad variada que deberán ser individualizadas según el paciente y la zona a reconstruir. Otros procesos que derivan en un déficit tisular que requiere de reconstrucción son los eventos traumáticos como las heridas, las úlceras, las quemaduras o las amputaciones de miembros, entre otras.

Clásicamente, la Cirugía Plástica en su vertiente reparadora ha sido la encargada de dar respuesta a estos déficits tisulares. El siguiente apartado se centrará en la Cirugía Plástica Reparadora desde sus inicios, y en cómo la sofisticación técnica y científica ha mejorado el tratamiento de estas patologías.

## 1.2. La Cirugía Plástica Reparadora

Los inicios de la Cirugía Reparadora en Europa se emplazan en el siglo XV. Sin embargo, existen alusiones a intervenciones quirúrgicas con fines reparadores y comentarios sobre el manejo de fracturas de mandíbula en papiros egipcios y en tratados hindúes (88). El primer libro dedicado a la Cirugía Reparadora data de 1597, “*De Curtorum Chirurgia per Insitionem*” (Figura 6) (89). Sin embargo, después de eso y durante casi dos siglos, apenas existieron publicaciones.



**Figura 6.** Publicación de “*Curtorum Chirurgia per insitionem*” por Gasparis Taliacotii en el año 1597. Considerado el primer libro dedicado a la Cirugía Reparadora. Imagen procedente de [europeana.eu](http://europeana.eu)

Posteriormente, en el siglo XVIII, durante la Ilustración, se popularizó el uso de injertos cutáneos y, en 1791, Chopart realizó la primera reconstrucción labial (90). El siglo XIX sería clave en lo que se refiere a avances y desarrollos en este ámbito (91). Tanto es así que en 1818 se publicó el

libro "*Rhinoplastic*", siendo la primera vez que se acuña el término "plástico" en cirugía (92). Posteriormente, se publicaron los primeros compendios y atlas en Cirugía Plástica escritos por Reich en 1845 ("*Plastische Chirurgie*") y Jobert en 1849 ("*Traité de Chirurgie plastique*") (88).

Durante la Primera Guerra Mundial se empezó a hablar de Cirugía Plástica como especialidad y poco después, en 1920, se publicó el libro "Cirugía Plástica de la cara" de la mano de Gillies (93). Fue durante la Segunda Guerra Mundial cuando se produjo la eclosión de esta especialidad, coincidiendo con varios avances en el campo de la medicina y la cirugía y con la previa formación de varios especialistas en Cirugía Plástica. La primera sociedad científica de Cirugía Plástica en Europa data de 1930 y fue creada en Francia por Charles Clauoué. Posteriormente, en 1931, Jacques Maliniak fundó la primera sociedad de Cirugía Plástica en América (94).

A partir de la década de los sesenta, la Cirugía Plástica experimentó una nueva revolución vinculada a la descripción de los territorios cutáneos vasculares, los colgajos, la introducción de nuevas tecnologías en planificación quirúrgica, la utilización del injerto graso o la sistematización del tratamiento del cáncer de mama. También fue a partir de la década de los sesenta cuando la microcirugía empezó a formar parte de la especialidad, en concreto, con las anastomosis vasculares para reimplantes de dedos o con las transferencias tisulares mediante colgajos libres (95). Dichos hitos concurren y evolucionaron hasta la actualidad, habiéndose realizado trasplantes de cara, colgajos basados en arterias perforantes cutáneas, colgajos musculares funcionales o anastomosis linfático-venosas para el tratamiento del linfedema.

Tras este breve recorrido historiográfico por la especialidad, se centrará la atención en el campo de acción de la misma, sobre todo en el ámbito hospitalario.

Según la definición de la Sociedad Española de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora (SECPRE), se define la especialidad dentro de un marco quirúrgico que trata “la corrección de todo proceso congénito, adquirido, tumoral o simplemente involutivo que requiera reparación o reposición o que afecte a la forma y/o función corporal. Sus técnicas están basadas en el trasplante y la movilización de tejidos mediante injertos y colgajos o incluso implantes de material inerte” (96). En la definición del BOE SAS/1257/2010 se le añade su vertiente estética y es que, además, la especialidad “trata alteraciones que sin constituir en sí mismas un proceso patológico provocan un deterioro de la salud en la medida que interfieren en el bienestar psíquico de las personas” (97).

Se abarca pues dentro de las alteraciones potencialmente tratables por parte de especialistas en Cirugía Plástica Reparadora, el tratamiento quirúrgico de las malformaciones de la región cráneo-cérvico-facial así como de otras regiones que exijan reconstrucción o remodelación de tejidos óseos o de partes blandas. Además, el tratamiento de las quemaduras y secuelas de las mismas también constituye una parte importante del día a día de la especialidad. De una manera general, todas las patologías que requieran de técnicas de reconstrucción quirúrgica anatómica o funcional, bien sea debido a la escisión tumoral o bien a eventos traumáticos, pueden ser potencialmente tratados por especialistas en el campo de la Cirugía Plástica Reparadora.

Concretamente, y fijando la atención en el tipo de déficit tisular, deben tenerse en cuenta una serie de consideraciones. A continuación, se valorarán las opciones quirúrgicas para la cobertura de un déficit tisular secundario a las causas mencionadas en el apartado anterior.

Según la localización, el tamaño del déficit tisular y los componentes del mismo, la cirugía será más o menos compleja. Es reseñable comentar que no todos los procedimientos podrán ser realizados en todos los pacientes. Así pues, hay intervenciones que por su complejidad y tiempos

quirúrgicos requieren unas determinadas condiciones por parte del paciente. Siempre debe ponerse en la balanza el beneficio potencial y el riesgo atribuible a una intervención. En casos de pacientes pluripatológicos y/o edades avanzadas a menudo debe optarse por opciones subóptimas para no comprometer la vida del paciente (98,99).

Habitualmente, para dar respuesta a un déficit tisular se obtiene tejido de otra parte del cuerpo, lo que en general ocasiona una secuela en esta zona donante. El inevitable requerimiento de generar una lesión nueva en otra área anatómica es uno de los principales problemas de la Cirugía Reparadora en la actualidad. Sin embargo, esta secuela en la zona donante generalmente se restituirá de manera espontánea. Este es el caso de los injertos de piel en los que provocamos una lesión de espesor controlado permitiendo que la dermis expuesta epitelice dejando como única secuela una zona hiper o hipopigmentada (100). Se tratará de un escenario completamente distinto cuando necesitemos músculo para llenar grandes cavidades o bien para restituir procesos funcionales como una parálisis facial. En estos casos las secuelas pueden presentarse en forma de debilidad muscular u otras alteraciones motrices que, en ocasiones, pueden ser muy limitantes para los pacientes (101–103).

Centrando la atención en las herramientas clásicas de cobertura es necesario distinguir los injertos de los colgajos. La principal diferencia yace en la vascularización. Los injertos requieren de un lecho adecuado en la zona receptora para recibir irrigación del mismo mientras que los colgajos poseen su propia vascularización (104,105). A continuación, se detallan las principales características de los injertos de piel y los colgajos.

Los injertos de piel pueden ser de espesor parcial (Figura 7) o de espesor completo. La zona donante de los injertos de espesor parcial cura de manera espontánea mientras que los de espesor completo requerirán del cierre directo de la zona donante debido a que, en este caso, no se dispone de dermis para esperar una reepitelización espontánea.

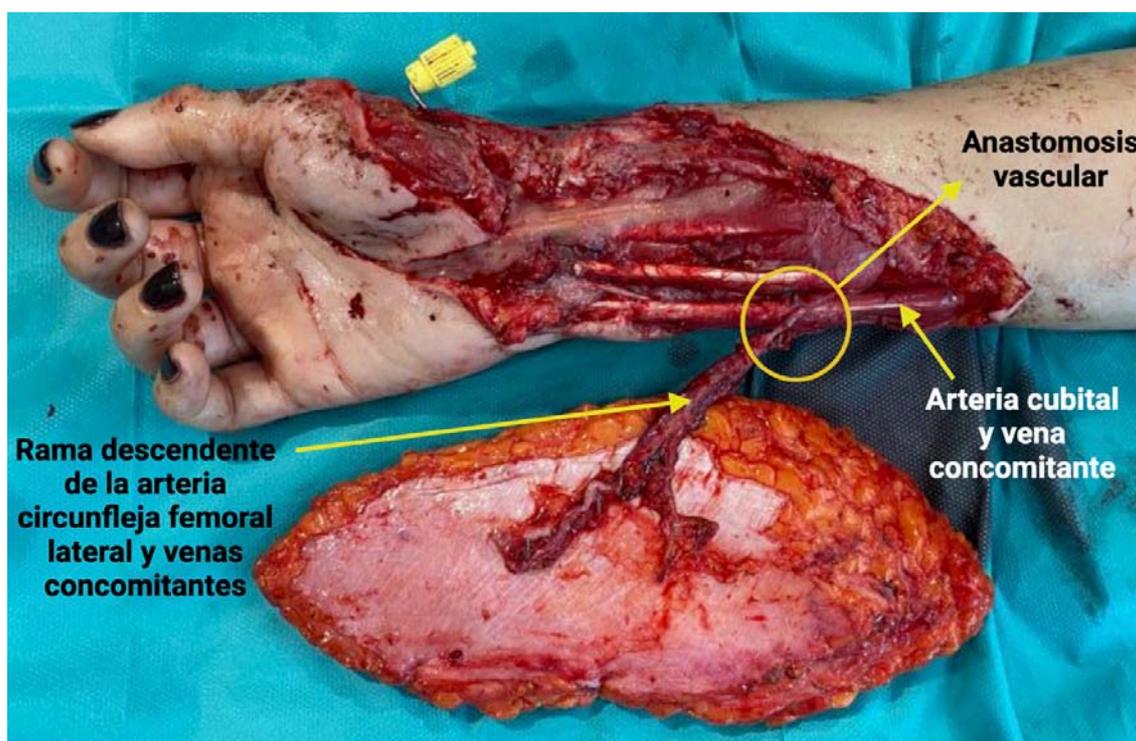
Los injertos de piel de espesor parcial permiten disponer de zonas donantes más grandes y son, por tanto, muy útiles en el tratamiento de las quemaduras. Por el contrario, los injertos de piel de espesor completo son óptimos para tratar zonas como la cara o los genitales debido a que la dermis aporta elasticidad. Sin embargo, la obligatoriedad de cerrar la herida de la zona donante limita mucho la cantidad de piel disponible (106–108).



**Figura 7.** *Injerto de piel en el quinto día de post-operatorio. En la intervención quirúrgica se desbridó una quemadura y se cubrió el defecto tisular con un injerto de piel. Las pequeñas zonas desprovistas de piel, secundarias al mallado, epitelizarán de manera espontánea. Imagen obtenida de paciente tratada por el servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada).*

En segundo lugar, los colgajos se clasifican en “pediculados”, cuando se mantienen intactos los vasos que lo irrigan, y “libres”, cuando los vasos se seccionan de la zona donante y se unen a los vasos de la zona receptora mediante suturas muy finas que requieren de técnicas microquirúrgicas (109). Este procedimiento de unión de vasos se denomina anastomosis vascular. Los colgajos permiten pues, a diferencia de los injertos, movilizar angiosomas completos, es decir, todas las estructuras irrigadas por un mismo vaso (110). Es importante mencionar que en general las técnicas microquirúrgicas requerirán de más tiempo quirúrgico y habitualmente serán técnicas más complejas (111). En la Figura 8 se presen-

ta un caso clínico en el que se trató un déficit tisular de origen traumático con un colgajo anterolateral de muslo uniendo la arteria que lo irriga, la rama descendente de la arteria circunfleja femoral lateral (112), con la arteria cubital en el antebrazo. A su vez, el drenaje venoso se consiguió con la anastomosis de las venas concomitantes de la rama descendente de la arteria circunfleja femoral lateral con la vena concomitante de la arteria cubital.



**Figura 8.** Colgajo anterolateral de muslo anastomosado a vasos cubitales de antebrazo derecho. La preparación de este colgajo requiere la disección microquirúrgica de los vasos perforantes de la rama descendente de la arteria circunfleja femoral lateral. Posteriormente se transfiere el tejido a la zona receptora y se anastomosan los vasos para mantener el aporte y drenaje sanguíneo. Imagen obtenida de paciente tratada por el servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada).

En las últimas décadas el impacto tecnológico en el campo de la Cirugía Plástica ha revolucionado el campo de la microcirugía. Este refinamiento permite a día de hoy hablar de supermicrocirugía cuando los vasos a anastomosar son inferiores a 0,8 mm (113,114). Además, existen nume-

rosos programas de formación específica en el campo microquirúrgico que aceleran la curva de aprendizaje de los profesionales dedicados al campo de la Cirugía Plástica, convirtiéndose la microcirugía en una herramienta indispensable en prácticamente todos los servicios de Cirugía Plástica de España (115).

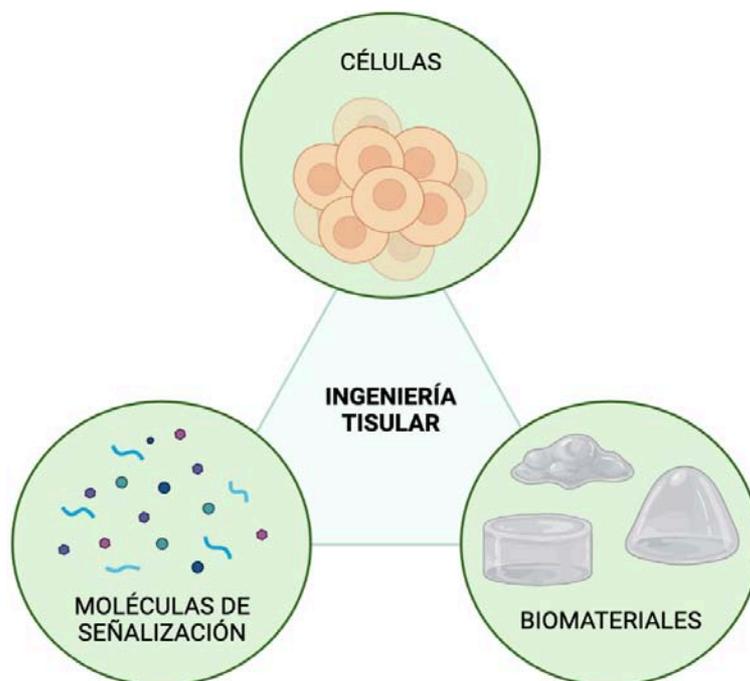
Además del abordaje reparador, en las últimas décadas se ha experimentado un interés creciente por la posibilidad de dar respuesta a estos defectos tisulares mediante la generación de tejido y órganos artificiales. En este sentido, el nacimiento y crecimiento de especialidades como la Ingeniería Tisular está siendo revolucionario.

A continuación, se detallarán los antecedentes de esta disciplina, sus componentes y su integración en el tratamiento de los defectos tisulares mencionados en el apartado anterior.

### 1.3. La Ingeniería Tisular

El término “Ingeniería Tisular” se acuñó en 1987 en la conferencia de la *National Science Foundation* en Granlibakken (Estados Unidos) por parte de Yuan-Cheng Fung (116). En 1992, Heineken y Skalak definían la Ingeniería Tisular como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería a las ciencias de la vida para el entendimiento de los fundamentos de la relación estructura-función en tejidos de mamíferos, tanto sanos como patológicos, así como el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones tisulares (117).

Las publicaciones científicas sobre Ingeniería Tisular en revistas de alto impacto han crecido de manera exponencial convirtiéndose en un campo consolidado y con mucha proyección de futuro (118). Así pues, el objetivo principal de la Ingeniería Tisular es regenerar una lesión o reemplazar un órgano dañado, malformado o ausente. Como consecuencia, sus principales dianas serán tejidos u órganos expuestos a lesiones, enfermedades, malformaciones o procesos degenerativos (119).



**Figura 9.** Herramientas fundamentales de la Ingeniería Tisular para la generación de sustitutos biológicos (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

Para el desarrollo de sustitutos biológicos mediante técnicas de Ingeniería Tisular es necesaria la conjunción de tres herramientas fundamentales: las células, los biomateriales y las moléculas de señalización, cuyo objetivo es inducir la proliferación o la diferenciación celular (120) (Figura 9).

### **1.3.1. La Célula**

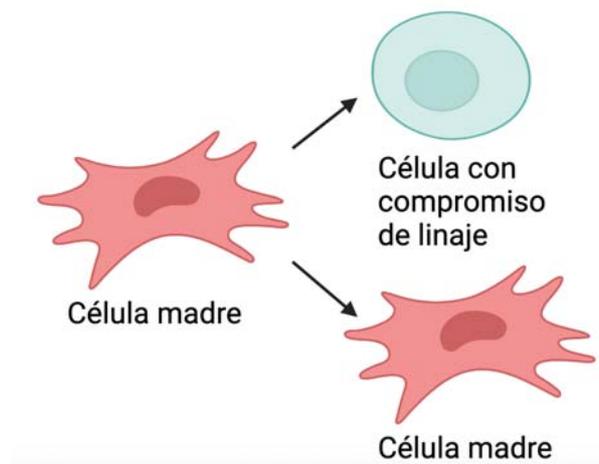
La célula es la unidad estructural y funcional básica de todos los organismos pluricelulares. Es, por tanto, la unidad viva básica del cuerpo y cada órgano es un agregado de muchas células diferentes que se mantienen unidas mediante estructuras de soporte intercelular (121).

Según el criterio utilizado, existen múltiples clasificaciones para las células. Sin embargo, focalizando en el campo de Medicina Regenerativa y la Ingeniería Tisular lo más importante es determinar la capacidad de regeneración que presenta cada tipo celular. En este sentido, las células madre constituyen una herramienta de gran importancia en la Ingeniería Tisular ya que cuentan con una alta capacidad de renovación.

#### *1.3.1.1. Células madre*

Se trata de células inmaduras progenitoras con capacidad de diferenciación y auto-renovación. Poseen la habilidad de dividirse de forma asimétrica, es decir, generando una célula idéntica a la progenitora y otra con compromiso de linaje para desarrollar un tipo celular concreto (122) (Figura 10).

Clásicamente y atendiendo a su fuente de obtención, las células madre pueden dividirse en células madre embrionarias o células madre adultas. Las células madre embrionarias, al pertenecer a estadios precoces del desarrollo, están más indiferenciadas y, por tanto, poseen propiedades regenerativas más potentes.



**Figura 10.** Esquema de la división asimétrica de las células madre dando origen a una célula idéntica a la progenitora y una célula con compromiso de linaje (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

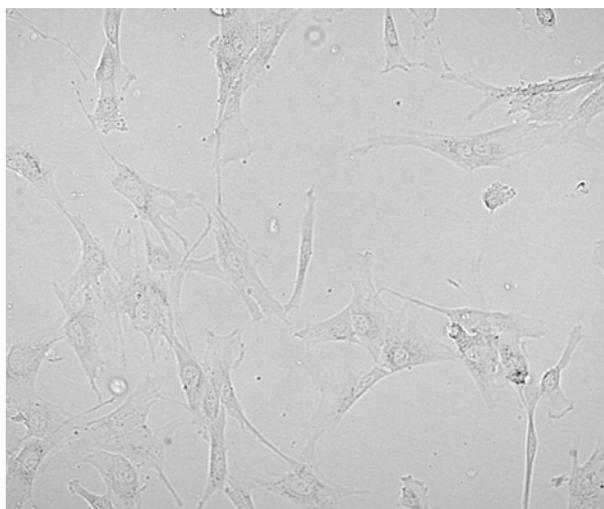
Sin embargo, en 2006, se añadió un grupo más a esta clasificación: Takahashi K. y Yamanaka S. introdujeron genes que codifican factores de transcripción expresados en células embrionarias a células maduras y consiguieron células en estadio indiferenciado (123). Este avance se considera un descubrimiento esencial y abre una puerta a soluciones para los grandes problemas éticos que, hasta la fecha, generaba la utilización de células madre embrionarias, al tener que disponer de estructuras embrionarias para obtenerlas (124). Estas células se denominaron células madre pluripotentes inducidas (*iPS cells*).

Además de la fuente de obtención, otra clasificación importante es la que se basa en su capacidad de diferenciación. En este sentido, diferenciamos células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. En primer lugar, las células totipotentes se definen como aquellas que presentan la capacidad de producir todos los tipos celulares incluyendo estructuras embrionarias y extraembrionarias. Así pues, tienen la capacidad de generar un embrión completo. A su vez, las células madre pluripotentes permiten el desarrollo de cualquier linaje celular, pero no un embrión completo. En tercer lugar, las células madre multipotentes, objeto de es-

tudio de la presente Tesis Doctoral, pueden desarrollar estructuras que pertenecen a la misma capa embrionaria. Finalmente, las células unipotentes presentan una potencia limitada a un único tipo celular (125,126).

Así pues, existen dos grandes propiedades que hacen que las células madre sean idóneas para su uso en Ingeniería Tisular: su alta capacidad de proliferación y su habilidad para diferenciarse a células de diferentes linajes (127).

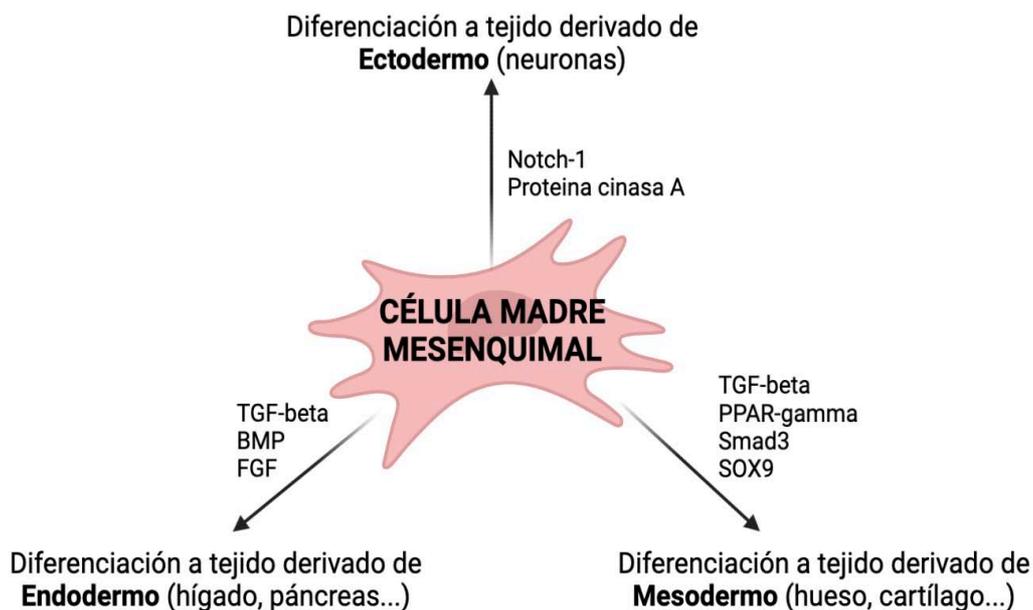
Un tipo importante de células madre y el eje principal de esta Tesis Doctoral son las células madre mesenquimales, consideradas células madre multipotentes (128). Las células madre mesenquimales derivan del mesénquima embrionario y pueden obtenerse de muchos tejidos diferentes en el individuo adulto como el tejido adiposo, la gelatina de Wharton del cordón umbilical (Figura 11) o la pulpa dental.



**Figura 11.** Células Madre Mesenquimales procedentes de gelatina de Wharton de cordón umbilical. Barra de magnificación 100  $\mu\text{m}$ .

El término célula madre mesenquimal fue utilizado por primera vez por Arnold Caplan en 1991 y, desde entonces, sus prometedoras propiedades y su escasa morbilidad para la zona donante las han convertido en un prometedor agente terapéutico en el campo de la Medicina Regenerativa (129).

El proceso de caracterización celular de las células madre mesenquimales fue propuesto por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) determinando tres condicionantes. En primer lugar, debe tratarse de células que se adhieren al plástico en cultivos. En segundo lugar, en citometría de flujo deben expresar CD73, CD90 y CD105 como marcadores de superficie y no expresar CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  ni HLA-DR. En tercer lugar, las células madre mesenquimales deben tener la habilidad de diferenciarse a múltiples tejidos de origen mesodérmico como el tejido adiposo, el tejido óseo o el tejido cartilaginoso (130). Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que las células madre mesenquimales poseen además una alta capacidad de renovación y regeneración de tejidos cuyo origen embriológico es ectodérmico o endodérmico, definiéndose así como células con capacidad de transdiferenciación (131). A su vez, se han descrito un conjunto de moléculas que inducen este proceso de transdiferenciación (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema del proceso de transdiferenciación de células madre mesenquimales mediante biomoléculas inductoras. Imagen obtenida y modificada de Ding DC y col. *Cell Transplantation* (2011) (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

Además de las propiedades regenerativas mencionadas, las células madre mesenquimales tienen capacidad de modulación de la respuesta inmune (132,133). Esta función inmunomoduladora es debida a su capacidad para modular la proliferación y función de linfocitos T, linfocitos B y células *natural killers*, siendo por tanto herramientas para el tratamiento de enfermedades de tipo autoinmune o neoplásicas (134,135). En esta misma línea, entre las competencias de las células madre mesenquimales destaca también la capacidad para migrar a zonas lesionadas, concepto que se ha definido con el término anglosajón *homing* (136,137). Una vez halladas en dicho foco, las células madre pueden diferenciarse y restaurar componentes de la zona afectada y, además, secretar moléculas de señalización que favorecen la regeneración tisular (138,139).

Centrando la atención en los beneficios terapéuticos de las células madre mesenquimales, cabe mencionar que clásicamente se consideraba que estos eran debidos a las células en sí. Sin embargo, ese concepto se ha puesto en entredicho en estudios posteriores. Tanto es así, que la hipótesis actual es que la regeneración podría no ser debida al reemplazo de las células dañadas por células recientemente diferenciadas sino que el potencial reparador sería debido a la secreción paracrina de factores solubles secretados por las mismas (140–142).

### **1.3.2. Los biomateriales**

El segundo pilar que forma parte de la Ingeniería Tisular son los biomateriales. Se trata de estructuras de sostén que emulan la matriz extracelular de los tejidos y órganos. Entre los requisitos principales que debe cumplir un biomaterial se incluye que sea bien tolerado por el receptor y biocompatible para las células que contiene (143,144).

La Ingeniería Tisular en sus inicios se centró en el uso de materiales sintéticos aceptados para su utilización en humanos como los que forman parte de las suturas quirúrgicas o de dispositivos sintéticos implantables,

por ejemplo, los polímeros de ácido poliláctico, poliglicólico o la policaprolactona (145,146). La ventaja principal de los biomateriales sintéticos es el control de los parámetros químicos y estructurales.

Por otro lado, existen biomateriales naturales basados en proteínas (colágeno o fibrina) y polisacáridos (alginato, glicosaminoglicanos o ácido hialurónico) siendo estos más biocompatibles, pero a la vez más inestables y variables (147).

Además, existen biomateriales mixtos como es el caso de la mezcla de fibrina humana y agarosa habiéndose desarrollado modelos para córnea (148), piel (149) y mucosa oral (150,151).

### **1.3.3. Las moléculas de señalización**

Finalmente, el tercer elemento básico de la Ingeniería Tisular son las moléculas de señalización, es decir, las señales que promueven la proliferación y la diferenciación celular generando un microambiente extracelular propicio (152,153).

Algunas de estas moléculas de señalización forman parte del conjunto de factores solubles secretados por las células al espacio extracelular. Este conjunto de moléculas recibe el nombre de secretoma. Como se ha mencionado anteriormente, se ha atribuido al secretoma un posible potencial regenerador, debido a que contiene una gran cantidad de factores solubles secretados por las células con propiedades antiapoptóticas, prometóticas, antiinflamatorias, proangiogénicas, provasculogénicas y antifibróticas que tendrían una importante función citoprotectora y regeneradora (154,155). A continuación, se detallan las características y funciones de estos factores solubles secretados principalmente por las células madre mesenquimales.

En referencia a los efectos citoprotectores y regeneradores de las células mesenquimales y los factores solubles secretados por las mismas, se ha

puesto de manifiesto que en condiciones de hipoxia las células madre mesenquimales son capaces de sobreexpresar la proteína cinasa B-1 (Akt-1), una proteína importante en la señalización y migración celular que podría contribuir a la reducción de zonas de necrosis por isquemia cardíaca previamente demostrada en modelos animales. Este efecto se ha estudiado administrando Akt-1 en roedores con obstrucciones coronarias que mostraron diferencias significativas en la reducción de la zona necrosada respecto los controles (156), así como una mejoría del remodelado y una mayor preservación de la función cardíaca (157). Además de los efectos citoprotectores en el tejido cardíaco, se han observado también estos efectos en otros órganos como los riñones y el cerebro. En referencia al sistema renal, la administración de células madre mesenquimales a roedores a los que se infligió un daño en los túbulos puso de manifiesto una reducción del daño renal (158). Además, los riñones de los animales tratados con células madre revelaron una reducción en la expresión de factores proinflamatorios y un aumento de los factores antiapoptóticos (159). A su vez, en el sistema nervioso se han observado efectos similares sobre las neuronas, es decir, una reducción en la apoptosis neuronal (160). Por otra parte, las moléculas sobreexpresadas en los modelos animales tratados con células madre mesenquimales respecto a los controles fueron el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-1), el factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento básico de fibroblastos ( $\beta$ FGF) (161). Todos estos factores han demostrado ser de gran importancia para la regeneración tisular (162).

Además de los efectos mencionados, se ha detectado también un efecto antiinflamatorio sobre varios tejidos con la administración de células madre mesenquimales y su secretoma (163,164). En este sentido, la reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  o de IL-1 $\beta$ , ambas moléculas proinflamatorias, así como el aumento en la secreción de citocinas antiinflamatorias

como IL-10,  $\beta$ FGF o bcl-2 han demostrado propiciar este efecto antiinflamatorio sobre órganos como los pulmones, los riñones, el corazón, el hígado o la piel (165,166).

Además de los dos efectos mencionados anteriormente, las células madre mesenquimales y su secretoma podrían tener un efecto sobre la vascularización. En este sentido, su administración promueve el crecimiento de vasos existentes, fenómeno que recibe el nombre de angiogénesis, así como la generación de vasos nuevos, es decir, la vasculogénesis (167–169). Los procedimientos que incrementan la vascularización son de vital importancia para el objetivo regenerativo perseguido con las terapias con células madre, ya que aumenta el aporte de nutrientes a las zonas lesionadas. En concreto en el caso de la piel, el aporte sanguíneo es crucial para la correcta cicatrización (170). El incremento de dicho aporte sanguíneo en las zonas con heridas es esencial tanto si ésta es tratada mediante un cierre quirúrgico, evitando las cicatrices patológicas y las dehiscencias en la herida, como si se pretende que la herida cure por cicatrización dirigida, es decir, que progresivamente se genere tejido y finalmente este sea cubierto por piel (171,172). Este segundo tipo de manejo de las heridas suele tener una evolución subóptima ya que el proceso puede ser largo, el riesgo de infección elevado y el resultado funcional inadecuado. Sin embargo, en determinados pacientes con riesgo quirúrgico elevado puede ser la mejor opción (173,174).

Centrándonos pues en la piel, las células madre mesenquimales, esencialmente debido a los factores que secretan (secretoma), contribuyen a la regeneración cutánea tanto en modelos animales sanos como en diabéticos (175). En esta línea existen estudios que analizan los niveles de colágeno y fibroblastos en las heridas tras el uso de células madre mesenquimales. Curiosamente, estos trabajos sugieren un aumento en los niveles de colágeno así como un incremento en la proliferación y migra-

ción de fibroblastos, ambos mecanismos relacionados con una cicatrización de las heridas más rápida (170).

Además de un aumento en el ritmo de regeneración y cicatrización cutánea, es interesante valorar la calidad de esta cicatriz. Dentro de las complicaciones habituales que pueden generarse en el proceso de cicatrización se hallan las cicatrices hipertróficas y los queloides. Las cicatrices hipertróficas son crecimientos anormales del tejido cicatricial dentro de los límites de la cicatriz inicial. Por contra, cuando estos límites se sobrepasan hablamos de queloides (176). Estos crecimientos abigarrados pueden producir síntomas como el prurito, aunque la limitación más importante que pueden generar en el paciente aparece en zonas de cuerpo con mucha movilidad como las flexuras de los codos y las rodillas. El tejido cicatricial en estos casos pierde su elasticidad y puede provocar alteraciones motrices en los pacientes (177). Así pues, el poder mejorar la calidad de estas cicatrices y reducir las complicaciones derivadas mediante el uso de secretoma de células madre mesenquimales con un posible efecto antifibrótico podría llegar a ser una herramienta clínica importante para el paciente (178).

La presente Tesis Doctoral versa en torno a los efectos terapéuticos potenciales del secretoma procedente de células madre mesenquimales del tejido adiposo, la pulpa dental y la gelatina de Wharton del cordón umbilical. En el siguiente apartado se hablará ampliamente del secretoma y de las fuentes celulares utilizadas para el desarrollo experimental de la Tesis Doctoral.

#### *1.3.3.1. Secretoma*

Como se ha mencionado anteriormente, dado que el potencial regenerador de los factores de crecimiento secretados por las células madre se asemeja al potencial que presentan las terapias celulares (179) se especula que este efecto regenerador sea debido eminentemente al conjunto

de elementos secretados por las mismas, es decir, al secretoma. Así pues, definimos secretoma de células madre mesenquimales como el conjunto de moléculas liberadas por las mismas al espacio extracelular. Se incluyen en él esencialmente factores de crecimiento, citoquinas, proteasas, factores de transcripción y otras moléculas involucradas en el proceso de adhesión y viabilidad celular, migración, proliferación y diferenciación (180).

Los estudios actualmente publicados con el uso de secretoma procedente de células madre mesenquimales manifiestan, tanto *in vitro* como *in vivo*, un efecto proliferativo en los fibroblastos de la dermis que se traduce en un aumento del grosor de la misma, una mejoría de los procedimientos de angiogénesis, así como un mayor reclutamiento celular en la zona lesionada (179).

Como se ha mencionado, vincular el potencial regenerador con las biomoléculas secretadas por las células madre significa un cambio de paradigma con una importancia sustancial a nivel logístico, científico y clínico. El poder desarrollar terapias acelulares no solo facilita mucho los avances científicos sino que permite plantear productos con potencial terapéutico para un gran número de pacientes reduciendo o eliminando problemas de rechazo inmunitario (181,182). En lo que se refiere a terapias celulares, se requiere obtener células mesenquimales del propio paciente para utilizarlas como tratamiento, por lo que se exige un tiempo, un espacio y unos medios costosos que dificultan inevitablemente los avances y las posibilidades de hacer estos tratamientos extensibles a un gran número de pacientes. Si el mismo tratamiento pudiera ser administrado a diferentes individuos se produciría una reducción importante de los costes y del tiempo de fabricación.

Por estos motivos, los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral pretenden estudiar el secretoma de células madre mesenquimales y evaluar sus efectos sobre células de la piel. Así pues, conocer las fuentes de

obtención del secretoma y estudiar cuál de estas fuentes presenta más ventajas es de vital importancia. Esencialmente los procedimientos de obtención de secretoma se basan en el aislamiento de células madre mesenquimales, en conseguir una confluencia celular elevada, en torno al 70-80%, y en recoger el medio para luego obtener, mediante filtrado y varios procesos de centrifugación, un precipitado que contiene el secretoma (183–185).

En líneas generales, las moléculas presentes en el secretoma de células madre mesenquimales son factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento similar a la insulina de tipo I y II (IGF-I y IGF-II), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento queratinocítico (KGF), el factor de crecimiento neural (NGF) o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Además, también se encuentran en el secretoma de células madre mesenquimales, otras moléculas con actividad antiinflamatoria como las interleucinas IL-6, IL-10, IL-27, IL-17, IL-13 (162).

A pesar de haberse hallado una serie de componentes comunes en varias fuentes de secretoma, la presencia y la proporción de los mismos es cambiante y está vinculada a muchas variables, como la edad, el índice de masa corporal, la situación hormonal o los tratamientos recibidos, entre otros. Estos cambios no sólo se deben a la fuente de obtención, sino también a elementos como el tiempo de acondicionamiento antes del centrifugado para obtener el secretoma (186). Debido a estos motivos, sus efectos también serán dispares y difíciles de predecir.

Así pues, existen todavía varios interrogantes, como cuál es la fuente de secretoma con mayor potencial regenerador, cuál es la concentración de secretoma más adecuada o cuáles son las proteínas que más influyen en este proceso de regeneración. Aunque se mencionará posteriormente en

los objetivos, en este documento se intentará dar respuesta a algunos de estos interrogantes.

A continuación se detallan algunas singularidades del secretoma de cada una de las fuentes celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral: el secretoma procedente de células madre mesenquimales del tejido adiposo, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental.

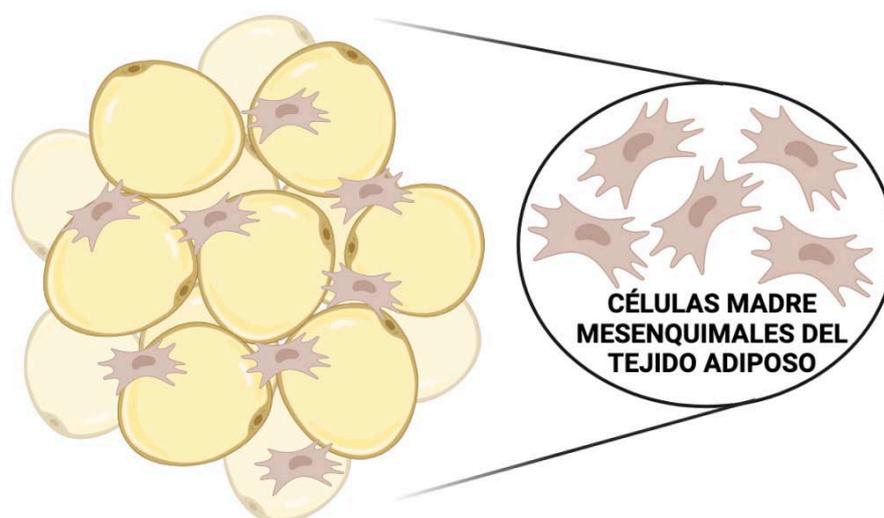
#### 1.3.3.1.1. Secretoma de células madre mesenquimales de tejido adiposo.

El tejido adiposo está conformado por adipocitos y septos fibrosos, distribuido por todo el cuerpo y con funciones esencialmente de protección, metabólicas, hormonales y de almacenaje de energía (187,188).

La obtención de células madre del tejido adiposo para el aislamiento del secretoma (Figura 13) posee como principal ventaja la escasa morbilidad para la zona donante (189). Además, los procedimientos de liposucción son ampliamente conocidos y manejados por parte de especialistas en Cirugía Plástica. De todos modos, hay que tener en cuenta que los procesos de liposucción pueden dañar mecánicamente las células o bien generar un microambiente proinflamatorio de estrés no propicio (190). Por este motivo, para su uso en protocolos de Ingeniería Tisular es preferible obtener biopsias de tejido adiposo no fragmentado en lugar de muestras procedentes de liposucción.

En referencia a los factores identificados que forman parte del secretoma de células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo destaca la presencia de moléculas relacionadas con mecanismos antiinflamatorios, proangiogénicos, antiapoptóticos y antioxidantes. Algunos ejemplos son el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-1). Además, también se ha encontrado expresión de interleucinas como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, factores estimulados-

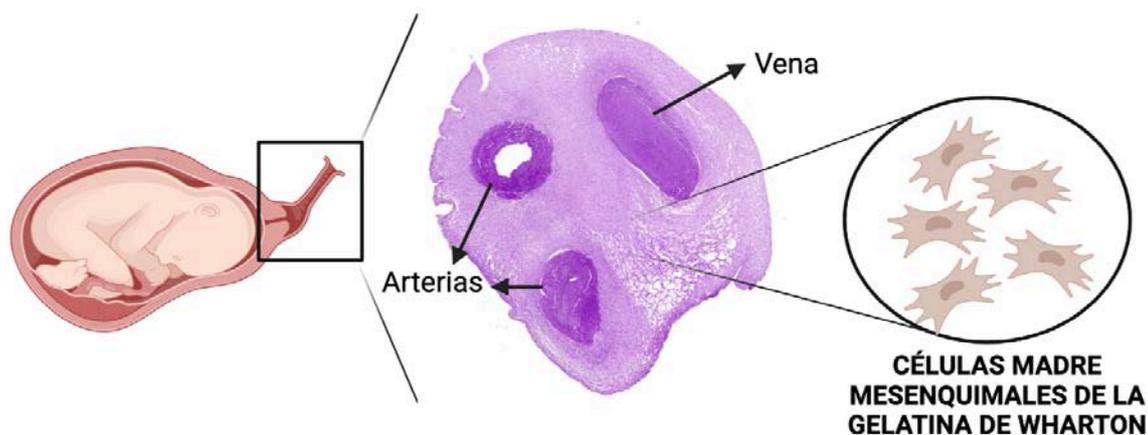
res de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), así como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (191). Estas últimas han sido estrechamente vinculadas a la regulación del sistema inmunitario. Entre las muchas moléculas halladas, también se han descrito expresiones elevadas de factor de crecimiento nervioso (NGF), de esfingosina-1-fosfato y de factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), cuyas funciones se han relacionado con la preservación y la reparación neuronal (192).



**Figura 13.** Esquema representativo de las células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

#### 1.3.3.1.2. Secretoma de células madre mesenquimales de gelatina de Wharton.

La gelatina de Wharton es un tejido mucoso hallado en el interior del cordón umbilical. La función principal de este tejido gelatinoso es aportar rigidez y flexibilidad al cordón umbilical para reducir el riesgo de acodamiento o las alteraciones en la disposición del mismo que puedan comprometer la vida del embrión (193). En un corte transversal de cordón umbilical se identifica una vena, dos arterias y la gelatina de Wharton en forma de tejido conectivo de sostén entre estos vasos (194) (Figura 14). Se ha visto que en este tejido conectivo existe un número considerable de células madre mesenquimales (195).



**Figura 14.** Esquema representativo de las células madre mesenquimales procedentes de gelatina de Wharton del cordón umbilical. En el espacio comprendido entre las estructuras vasculares se encuentra la gelatina de Wharton, rica en células madre mesenquimales (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

Algunos científicos consideran que las células madre mesenquimales procedentes de la gelatina de Wharton son las que presentan un mayor potencial terapéutico, ya que se trata de células madre adultas obtenidas en una fase perinatal (196,197).

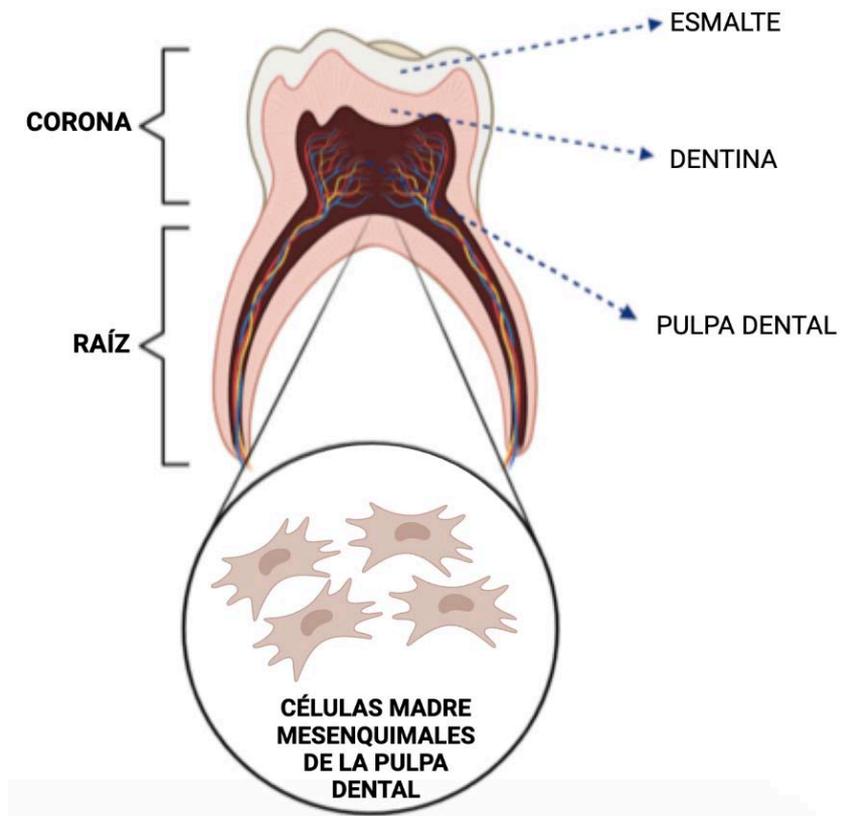
En el secretoma de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton se ha apreciado una elevada expresión de citocinas neuroprotectoras como es el caso de la Neurotrofina 3 (NTF3) o la Midquina (MDK). Además, el secretoma procedente de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton presenta elevadas cifras de factores proangiogénicos como inhibidores de metalopeptidasas (TIMP), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). A este tipo de secretoma se le atribuyen también funciones antiapoptóticas e inmunomoduladoras vehiculizadas por moléculas como la peptidil propil isomerasa A, B y C (PPIA, PPIB y PPIC), citocinas como IL-6, IL-11, moléculas de adhesión intercelular (ICAM) o proteínas ligando de citocinas (CXCL) (198).

#### 1.3.3.1.3. Secretoma de células madre mesenquimales de pulpa dental

La pulpa dental es una estructura esencialmente constituida por tejido conectivo rico en fibroblastos, además de células madre mesenquimales, entre otras, responsables de la viabilidad del diente. Se trata de un tejido conectivo con alto contenido en vasos sanguíneos y ramificaciones nerviosas que se extiende desde la corona hasta las raíces del diente (Figura 15). La pulpa dental está recubierta por tejidos duros mineralizados como el esmalte y la dentina (199).

Formando parte de la pulpa dental se encuentran células madre mesenquimales cuyo secretoma presenta niveles elevados de múltiples factores vinculados con la regeneración celular, proangiogénicos e inmunomoduladores. Un ejemplo de estas atribuciones es el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (TGF $\beta 1$ , TGF $\beta 2$ ). Estas moléculas se han relacionado especialmente con el desarrollo y mantenimiento del cartílago articular (200,201). El secretoma procedente de células madre mesenquimales de la pulpa dental presenta además cifras elevadas de inhibidores de metaloproteasas como el TIMP1 y TIMP2, cuya función se vincula con el mantenimiento, la formación y el equilibrio de la matriz extracelular (202). Por estos motivos, se ha sugerido la utilidad de las células mesenquimales procedentes de pulpa dental y su secretoma como tratamiento de enfermedades degenerativas condrales (203).

Como se ha mencionado, el secretoma de las células madre mesenquimales de la pulpa dental presenta un número amplio de proteínas con funciones proangiogénicas como la angiopoyetina 1, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o el receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA) (203). Además, en relación a su función inmunomoduladora se ha apreciado una expresión aumentada de la citocina IL-10, cuya función es eminentemente antiinflamatoria (204).



**Figura 15.** Esquema representativo de las células madre mesenquimales procedentes de la pulpa dental (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

#### **1.4. Papel de la Ingeniería Tisular en la Cirugía Reparadora**

La Ingeniería Tisular y la Cirugía Plástica tienen como objetivo principal restaurar estructural y funcionalmente un tejido u órgano. La Ingeniería Tisular se postula, desde sus inicios, como un campo con potencial para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que eviten el requerimiento de una zona donante, reduciendo la morbilidad asociada, la estancia hospitalaria, los costes y los riesgos (205,206). Se trata de un campo consolidado que en los últimos años ha evolucionado significativamente a nivel preclínico y clínico (207,208).

En el momento actual, cabe destacar varios campos en los que convergen la Cirugía Plástica y la Ingeniería Tisular, donde los avances en las últimas décadas han sido sustanciosos. Destacan la cobertura de defectos cutáneos, la obtención y aplicación de injertos grasos o la reconstrucción ósea y cartilaginosa, entre otros.

En primer lugar, se distinguen los defectos de cobertura cutánea, es decir, el déficit tisular cutáneo secundario a un evento traumático como una herida o a la escisión quirúrgica de un tejido tumoral o necrótico, consecuencia de una quemadura o una infección. En la actualidad existen tratamientos para resolver estos déficits tisulares basados en la utilización de piel obtenida de una localización sana del cuerpo del paciente, los injertos de piel autólogos. Sin embargo, no siempre se trata de un tratamiento óptimo debido, generalmente, a la falta de elasticidad de la piel injertada. Cuando esta falta de elasticidad se ubica en zonas de flexuras, como el codo, la rodilla o tobillo, esta opción terapéutica puede conllevar un problema funcional importante (209).

Actualmente, para mejorar la elasticidad de la cicatriz en zonas comprometidas, existen matrices dérmicas acelulares (Figura 16). Se trata de un sustituto dérmico biosintético que se implanta en el defecto cutáneo entre el lecho y el autoinjerto cutáneo (210,211). Existen también otros meca-

nismos para mejorar la calidad de la cicatrización, como la administración local de Plasma Rico en Plaquetas (PRP). El PRP es el producto de la centrifugación de una toma de sangre del paciente, cuya separación de componentes nos permite obtener una muestra de plasma con un número elevado de plaquetas. Se ha visto que el PRP es rico en factores de crecimiento con importantes propiedades regenerativas. Actualmente, existen numerosas herramientas terapéuticas aceptadas basadas en el uso de PRP. Estas terapias van desde la punción intraarticular para el tratamiento de la artrosis (212) hasta la aplicación conjunta con injertos grasos para aumentar la viabilidad y mantener un mayor volumen de los mismos (213). Además, se ha visto que la aplicación de PRP en zonas pericicatriciales o intracicatriciales mejora la calidad de la cicatrización (214).



**Figura 16.** Matriz dérmica artificial tipo Integra® bicapa. El producto se implanta durante dos semanas en el lecho de la herida. Una vez cumplido este periodo se retira la parte plástica y permanece la dermis artificial integrada en el lecho de la herida. Imagen procedente de [www.ilstraining.com](http://www.ilstraining.com)

Otro inconveniente que presentan los injertos de piel es el requerimiento de una zona donante. Los injertos de piel más utilizados son los injertos de espesor parcial, es decir, aquellos constituidos por la epidermis y la dermis superficial. La dermis profunda permanece en el lecho donante y posibilita la reepitelización espontánea. Sin embargo, las curas de esta zona donante pueden ser dolorosas y en algunos casos puede verse prolongado el tiempo hasta lograr la restauración de la piel (215,216). Asimismo, algunas enfermedades que afectan a la piel o a su aporte sanguíneo pueden dificultar esa epitelización espontánea (217).

No obstante, el principal reto terapéutico que debe afrontarse en casos de déficits de cobertura cutánea se plantea cuando no se dispone de piel donante suficiente. Afortunadamente esta situación es infrecuente y se limita a pacientes con quemaduras de gran extensión, es decir, por encima del 70-80% de superficie corporal total (SCT) o bien cuando se tratan nevus congénitos de gran tamaño (218,219). En la actualidad, el manejo de estas situaciones se lleva a cabo mediante aloinjertos de piel de cadáver que se aplican de manera provisional sobre la zona desbridada. Posteriormente, estos injertos serán rechazados por el paciente y sustituidos por autoinjertos a medida que la zona donante disponible reepitelice (220). Los aloinjertos permiten tener la zona desprovista de piel cubierta y evitar la pérdida de electrolitos, la infección y el desajuste homeostático consecuente, es decir, aportan tiempo hasta disponer del tratamiento definitivo, los injertos del propio paciente. Desafortunadamente este procedimiento alarga mucho los tiempos de hospitalización y aumenta el riesgo de complicaciones (221).

Las quemaduras de gran extensión están asociadas a una alta mortalidad y, en caso de que el paciente sobreviva, las secuelas tanto funcionales como estéticas son reseñables. Para dar respuesta a este reto terapéutico se han desarrollado modelos de piel artificial. Estos modelos todavía se encuentran en fases iniciales, debido a la complejidad para sus-

tituir la piel con todas sus capas, tipos celulares y anejos previamente descritos (222). En la actualidad, se dispone de diferentes estrategias para la generación de piel artificial. Por un lado, el modelo en el que se cultivan células sobre biomateriales biomiméticos y se incuban para promover la proliferación. Por otro lado, estrategias basadas en el uso de láminas celulares en las que células y biomateriales se ensamblan para formar construcciones más grandes. En ambos casos, el desarrollo de los biomateriales se puede optimizar mediante el uso de técnicas novedosas de bioimpresión tridimensional (223,224).

A pesar de haber evolucionado mucho en las últimas décadas, los resultados funcionales y estéticos del uso de piel artificial son inferiores a los injertos cutáneos autólogos, además de tratarse de procedimientos de fabricación con un coste elevado y tiempos prolongados (225). Por estos motivos, su indicación clínica está prácticamente circunscrita a pacientes que no disponen de zona cutánea sana suficiente (226). Sin embargo, hasta la fecha no se ha desarrollado un tipo de piel artificial que cumpla todos los requisitos funcionales, anatómicos e histológicos.

Más allá de los defectos tisulares cutáneos, la Ingeniería Tisular y la Cirugía Plástica también convergen en el estudio y utilización del tejido adiposo. La obtención de este tejido se puede llevar a cabo con escasa morbilidad mediante lipoaspiración (227).

Para disponer del injerto graso tras la lipoaspiración debe procederse a la centrifugación de la muestra. Este procedimiento sirve para retirar el suero que, conjuntamente con la adrenalina y un anestésico local, constituyen la solución de Klein. La composición de esta solución fue descrita por Klein en 1987 y se utiliza en la mayoría de protocolos de liposucción, permitiendo obtener un injerto graso con escaso contenido hemático gracias a la vasoconstricción que aporta la adrenalina, así como lograr un proceso de liposucción menos doloroso debido al aporte de anestésico local (228).

El resultado de la obtención del injerto graso nos permite, tras un proceso de disociación enzimática mediante colagenasa, aislar las células madre mesenquimales para utilizarlas en protocolos de Ingeniería Tisular o aislar su secretoma. También puede utilizarse el injerto graso para aportar volumen y mejorar el trofismo de la piel debido al efecto de las células mesenquimales y sus factores de crecimiento (229). Este procedimiento se realiza en el mismo acto quirúrgico de liposucción, con cánulas de infiltración de grasa. Se han descrito procedimientos de enriquecimiento de los injertos grasos con más células mesenquimales con el fin de aumentar la calidad de la piel, y teniendo unos porcentajes de reabsorción del injerto graso inferiores a los descritos con el injerto sin enriquecer (213). Sin embargo, en lechos oncológicos hay que asegurar histológicamente la ausencia de tumor tras la resección e incluso diferir la reconstrucción con injerto graso ya que las células mesenquimales y los factores de crecimiento que secretan podrían relacionarse con un incremento del riesgo de recaída o de metástasis a distancia (230).

Además de los efectos ampliamente descritos sobre piel y tejido subcutáneo, también se han descrito efectos beneficiosos en enfermedades autoinmunes como el lupus y la artritis autoinmune, así como efectos en la regeneración neural, hepática o en el tratamiento de la degeneración macular (231–233).

Finalmente, la Ingeniería Tisular y la Cirugía Plástica Reparadora también convergen en el objetivo de la reconstrucción ósea. Este procedimiento está especialmente indicado en defectos congénitos u oncológicos y existen prometedores estudios tanto en animales como en humanos que utilizan células madre mesenquimales en combinación con biomateriales de propiedades físicas similares al hueso (234). Dichos procedimientos podrían sustituir en el futuro a los tratamientos actuales que se basan principalmente en injertos de hueso autólogo, colgajos libres o pediculados o implantes de titanio. Estas técnicas de reconstrucción pre-

sentan en ocasiones problemas a largo plazo a nivel de reabsorción ósea o desplazamiento de los implantes que conllevan dolor, molestias o incluso el fracaso terapéutico tardío (235,236).

De manera similar, la reconstrucción cartilaginosa nasal que habitualmente se realiza con cartílago autólogo de tabique septal, pabellón auricular o, en su defecto, con cartílago costal (237), puede ser sustituida mediante Ingeniería Tisular por constructos con propiedades similares al cartílago, sembrados con condrocitos y enriquecidos con células mesenquimales o factores de crecimiento (238). En la reconstrucción auricular por microtia o anotia los avances son sustanciales y existen modelos de constructos cultivados con condrocitos y posteriormente implantados en un bolsillo subdérmico en la zona auricular (239).

Además de las aplicaciones en piel, tejido adiposo, hueso o cartílago, también se están observando avances en otros tejidos. Hay estudios que utilizan células madre mesenquimales de médula ósea y de tejido adiposo para reforzar la reparación tendinosa (240,241). También existen avances para la regeneración de defectos nerviosos gracias a la Ingeniería Tisular disminuyendo la aparición de neuromas (242,243). Incluso se ha visto en modelos *in vitro* e *in vivo* que los factores neurotróficos derivados de células mesenquimales mejoran y aceleran la regeneración nerviosa (244).

Una vez descritas las principales convergencias entre la Ingeniería Tisular y la Cirugía Plástica Reparadora resulta evidente que la Ingeniería Tisular puede revolucionar la práctica diaria de la Cirugía Plástica (245,246). Sin embargo, a pesar de los avances comentados existe todavía un largo camino por recorrer especialmente en lo que se refiere a la generación de modelos de piel artificial que permitan lograr de manera segura y rápida modelos de piel artificial aplicables clínicamente (247-248).

En este sentido, para conseguir modelos de piel artificial de manera segura y rápida, el uso de estrategias de elaboración de tejidos artificiales mediante la utilización de secretoma derivado de células madre mesenquimales se postula como una herramienta terapéutica prometedora para optimizar el desarrollo de piel humana artificial potencialmente trasladable a la clínica.

Una vez desarrollado el problema de investigación y la identificación de la Ingeniería Tisular como alternativa terapéutica, a continuación, en la presente Tesis Doctoral, se detallará la hipótesis y los objetivos a desarrollar, así como, el material y métodos para la consecución de los mismos y los resultados obtenidos discutidos en el contexto de la literatura científica actual.



## **2. HIPÓTESIS**



La piel humana es el órgano más grande del cuerpo y desempeña un papel importante en la protección contra los factores externos, así como en la regulación de la temperatura, la hidratación y la percepción de estímulos. Diferentes patologías de tipo traumático, autoinmune u oncológico, entre otras, pueden alterar la estructura y funcionamiento normal de la piel humana. A pesar de los importantes avances en el campo de la Cirugía Plástica en las últimas décadas, el tratamiento de diversas patologías supone un reto y los resultados siguen siendo mejorables.

En este contexto, la Ingeniería Tisular ofrece una estrategia prometedora que combina células, matrices extracelulares y moléculas de señalización para la regeneración de la piel. Los avances actuales en el campo de la Ingeniería Tisular se centran en el desarrollo de sustitutos de piel artificial basados en diferentes tipos de biomateriales y fuentes celulares. Uno de los principales retos en este campo es la obtención de cultivos de células epiteliales viables en el menor tiempo posible, con alta capacidad de proliferación y que permitan acelerar el proceso de biofabricación.

Por este motivo, la utilización de secretoma de células madre mesenquimales podría constituir la base de nuevos protocolos para mejorar los métodos de cultivo de células epiteliales que existen en la actualidad, aumentando su viabilidad, su proliferación y su capacidad de reparación de heridas. Esto podría suponer un avance significativo en el proceso de biofabricación de pieles artificiales, con alto impacto social y sanitario en el área de la Cirugía Plástica Reparadora.



## **3. OBJETIVOS**



### **3.1. Objetivo general:**

Evaluar el efecto del uso de secretoma de células madre mesenquimales sobre células epiteliales para la optimización de protocolos de generación de piel artificial mediante técnicas de Ingeniería Tisular aplicables a la Cirugía Plástica Reparadora.

### **3.2. Objetivos específicos:**

- Aislar, cultivar y caracterizar células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental humana.
- Aislar y purificar el secretoma de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental humana.
- Evaluar el efecto del secretoma de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental humana sobre la viabilidad de células epiteliales de piel humana.
- Evaluar el efecto del secretoma de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y la pulpa dental humana sobre la proliferación de células epiteliales de piel humana.
- Evaluar el efecto del secretoma de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, la gelatina de Wharton del cordón umbilical y la pulpa dental humana sobre células epiteliales de piel humana en un modelo *in vitro* de reparación de heridas.
- Evaluar a nivel clínico e histológico el efecto del secretoma de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental humana sobre células epiteliales de piel humana en un modelo *in vivo* de reparación de heridas.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



#### **4.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de las células madre mesenquimales (CMM).**

El aislamiento y el cultivo de las células madre mesenquimales (CMM) en la presente Tesis Doctoral se realizó a partir del procesamiento de diferentes tejidos humanos. La obtención de todas las muestras de tejido se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki, y todos los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y reglamentos pertinentes. El estudio fue aprobado por el Comité Coordinador de Ética de Investigación Biomédica de Andalucía con el código de protocolo S1900527, fecha de aprobación 27 de diciembre de 2019. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos implicados en el estudio o de sus tutores legales.

En primer lugar los cultivos celulares primarios de CMM humanas procedentes del tejido adiposo se obtuvieron a partir de biopsias procedentes del panículo adiposo abdominal excedente de reconstrucciones mamarias con colgajo libre de las arterias perforantes de la arteria epigástrica inferior profunda cedido por el departamento de Cirugía Plástica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada) (Figura 17) (249).



**Figura 17.** Biopsia obtenida del panículo adiposo abdominal. El tejido forma parte del excedente tisular que, durante la cirugía reconstructiva, se desecha para dar forma a la mama reconstruida con la transferencia tisular microquirúrgica. Imagen cedida por el servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada).

Una de las reconstrucciones más utilizadas tras una mastectomía por cáncer de mama es la reconstrucción autóloga con colgajo abdominal irrigado por vasos perforantes de la arteria epigástrica inferior profunda, conocido por sus siglas en inglés como colgajo “DIEP” (*Deep Inferior Epigastric Perforator*). Esta técnica consiste en la transferencia de tejido abdominal y requiere de la anastomosis microquirúrgica de los vasos epigástricos inferiores profundos a los vasos mamarios internos (Figura 18) (250).



**Figura 18.** Resultado final intraquirúrgico de reconstrucción mamaria mediante colgajo “DIEP”. La mama derecha se ha simetrizado mediante una mamoplastia de reducción. Imagen procedente de paciente intervenida en el Departamento de Cirugía Plástica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada).

Por otro lado, para obtener cultivos primarios de CMM humanas de la pulpa dental se obtuvo tejido procedente de exodoncias de tercer molar en pacientes sanos extraídos por prescripción odontológica.

A su vez, para la obtención de cultivos primarios de CMM humanas de la gelatina de Wharton, se obtuvieron muestras del cordón umbilical de recién nacidos sanos.

A su llegada al laboratorio todas las muestras fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) y, tras un proceso mecánico de disección, se obtuvieron los tejidos ricos en células mesenquimales. Posteriormente, las muestras de tejido se digirieron enzimáticamente en una solución de 2 mg/mL de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) durante 6 h a 37°C. Tras este proceso se centrifugó la solución y se recogieron las células sedimentadas.

Las células procedentes del tejido adiposo y las derivadas de pulpa dental humana se cultivaron en frascos de 25 mm<sup>2</sup> en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich/Merck, Burlington, MA, EE.UU.) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de antibióticos y antimicóticos (100 U/mL de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomina y 0.25 mg/mL de anfotericina B) (Sigma-Aldrich/Merck). Por otro lado, en las células procedentes de la gelatina de Wharton del cordón umbilical se utilizó el medio de cultivo Amniomax-C100 (Gibco-Thermo Fisher Scientific). Todos los cultivos primarios fueron mantenidos en condiciones estándar de cultivo celular a 37°C en una incubadora humidificada (Esco Lifesciences Group Ltd, Singapur, Singapur) con un 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que las células alcanzaron el 70% de confluencia, fueron tripsinizadas con tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.25% (Sigma-Aldrich/Merck) para el análisis de los marcadores de indiferenciación propuestos por la International Society for Cellular Therapy (ISCT).

Como se mencionó anteriormente, para que una fuente celular sea considerada como célula madre mesenquimal debe presentar una triple condición (130). En primer lugar, mostrar adherencia a superficies plásticas

tras los lavados. En segundo lugar, mostrar un determinado fenotipo de expresión positiva y negativa de marcadores del complejo CD (*Cluster of Differentiation*) y en tercer lugar, debe presentar capacidad de diferenciación *in vitro* a condrocitos, adipocitos y osteocitos. En la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo la caracterización de las CMM a partir de estudios de adherencia celular y citometría de flujo. Para llevar a cabo la citometría de flujo, se colocaron  $5 \times 10^5$  células en tubos de citometría de flujo y se lavaron con 2 mL de tampón de tinción (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). A continuación se incubaron las células durante 5 minutos con 2 mL de PBS con 0.1% de albúmina de suero bovino y 0.1% de suero fetal bovino (FBS) para bloquear los receptores Fc. Posteriormente, las células fueron marcadas con un *cocktail* positivo (CD73, CD90 y CD105) y un *cocktail* negativo (CD11b, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR) e incubadas durante 45 minutos a 4°C en oscuridad. Una vez etiquetadas las células, se colocaron en un tampón de tinción, se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y se cuantificó el porcentaje de células positivas de cada grupo de estudio (251).

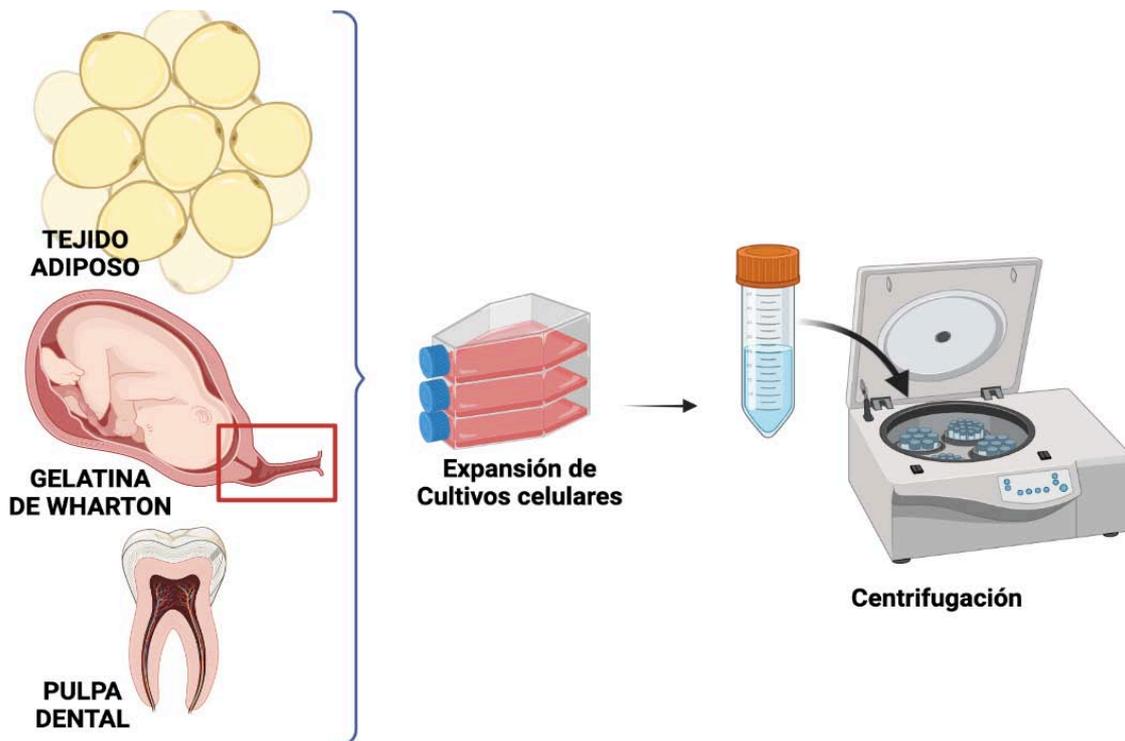
#### **4.2. Cultivo de células epiteliales de piel humana.**

Las células epiteliales de piel humana (CRL-4048) se adquirieron en la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EE.UU) y se cultivaron en un medio de cultivo de células epiteliales que consistió en una mezcla de HAM-F12 (150 mL), DMEM (300 mL) y FBS (50 mL) complementado con penicilina/estreptomicina (50 UI/mL), adenina (24 µg/mL), insulina (5 µg/mL), triyodotironina (1.3 ng/mL), hidrocortisona (0.4 µg/mL) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (10 mg/mL) (todos de Sigma-Aldrich/Merck).

Las células epiteliales de piel humana (CRL-4048) se cultivaron a 37°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>, reemplazando el medio de cultivo cada 2-3 días.

### 4.3. Obtención y caracterización proteica del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH).

Para la obtención del secretoma de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo (S-AD), de la pulpa dental (S-PD) y de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) se utilizaron tres frascos de 75 cm<sup>2</sup> con células procedentes de tres pacientes diferentes para cada tipo de secretoma. El secretoma se obtuvo de los metabolitos liberados por cada tipo de CMM. En concreto, pasadas 72 horas desde la obtención de una confluencia celular del 70%, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 3100 g durante 10 min (Heraeus Sepatech Ominifuge 2.ORS) con el fin de obtener el secretoma derivado de cada tipo de CMM y eliminar los desechos celulares y los cuerpos apoptóticos (Figura 19).



**Figura 19.** Esquema del protocolo de obtención de secretoma procedente de células madre mesenquimales humanas (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

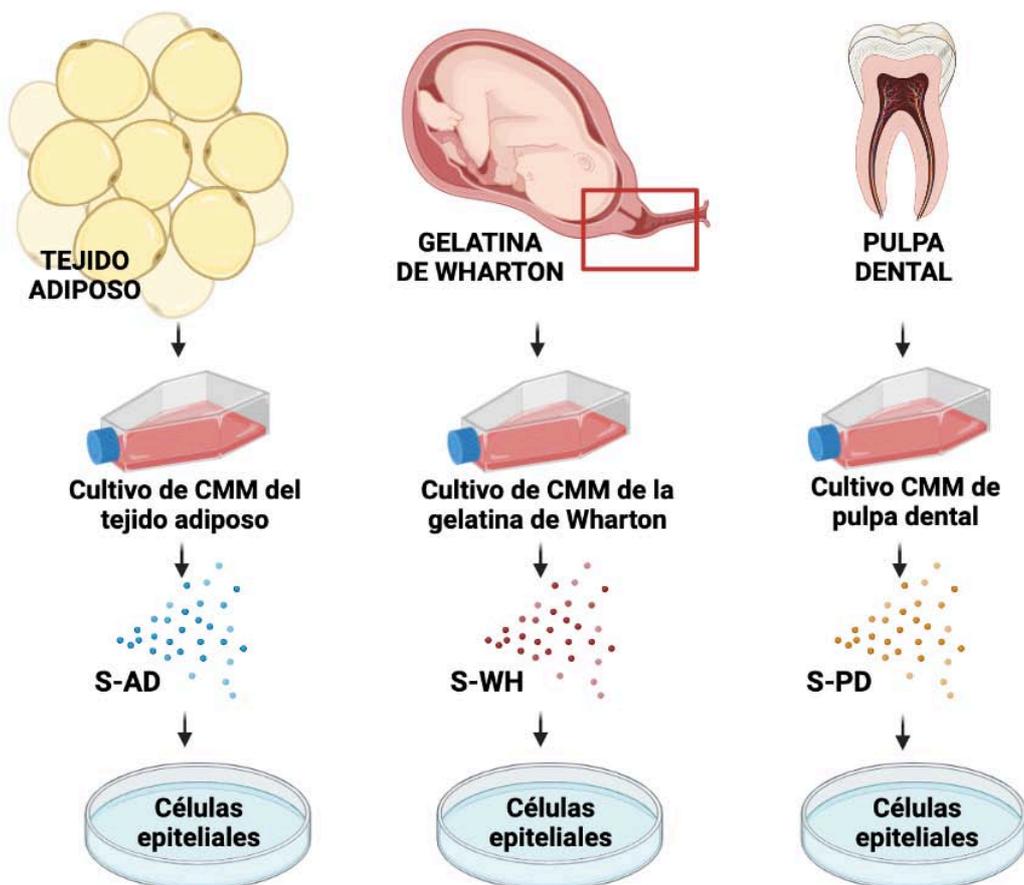
Posteriormente, se procedió a su filtración empleando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (Sartorius Minisart® NML Syringe Filter 16534). Los secretomas obtenidos de cada tipo de CMM se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso experimental. Para llevar a cabo la cuantificación de la concentración proteica contenida en cada tipo de secretoma se realizó el test de Bradford. Para ello, se utilizó el kit de cuantificación proteica de Sigma-Aldrich 51254-1KT y azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue), midiendo la absorbancia a 600 nm. Una vez establecida la curva de Bradford, se cuantificaron los secretomas.

Para la caracterización del secretoma del tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) se determinó la expresión proteica de cada tipo de secretoma en el medio básico no acondicionado (DMEM) mediante un *array* de proteínas humanas (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA; Cat: ARY007). En primer lugar, se bloquearon las membranas del *array* de proteínas con 2.0 mL del tampón comercial proporcionado por el kit, y se añadió 1.0 mL de cada secretoma de CMM cuya concentración final fue de 2 mg de proteína total por mL. Las muestras se trataron con 15  $\mu\text{L}$  de un *cocktail* de anticuerpos de detección proporcionado por el kit comercial, se lavaron y se incubaron con 2.0 mL de estreptavidina-HRP. Por último, las muestras fueron lavadas y las membranas cubiertas con el reactivo químico suministrado por el kit comercial. Se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente antes de la exposición de las membranas prehibridadas a la película radiográfica.

Una vez reveladas las películas radiográficas se cuantificó la intensidad de la señal en cada punto con el software *Image J* (Wayne Rasband, NIH, MD, EE.UU.) Se obtuvieron cuatro réplicas técnicas ( $n=4$ ). Los resultados se normalizaron con respecto a la concentración total de proteínas de los controles incluidos en el *array*.

#### 4.4. Análisis *in vitro* del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) sobre células epiteliales humanas.

Para realizar un análisis *in vitro* del efecto del S-AD, del S-PD y del S-WH sobre las células epiteliales humanas fue necesario exponer dichas células a los distintos tipos de secretoma (Figura 20). Para ello, las células epiteliales se cultivaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Sarsstedt®) a una densidad celular de  $1.7 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> con medio de cultivo de células epiteliales. Posteriormente, pasadas 48 h, se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS).



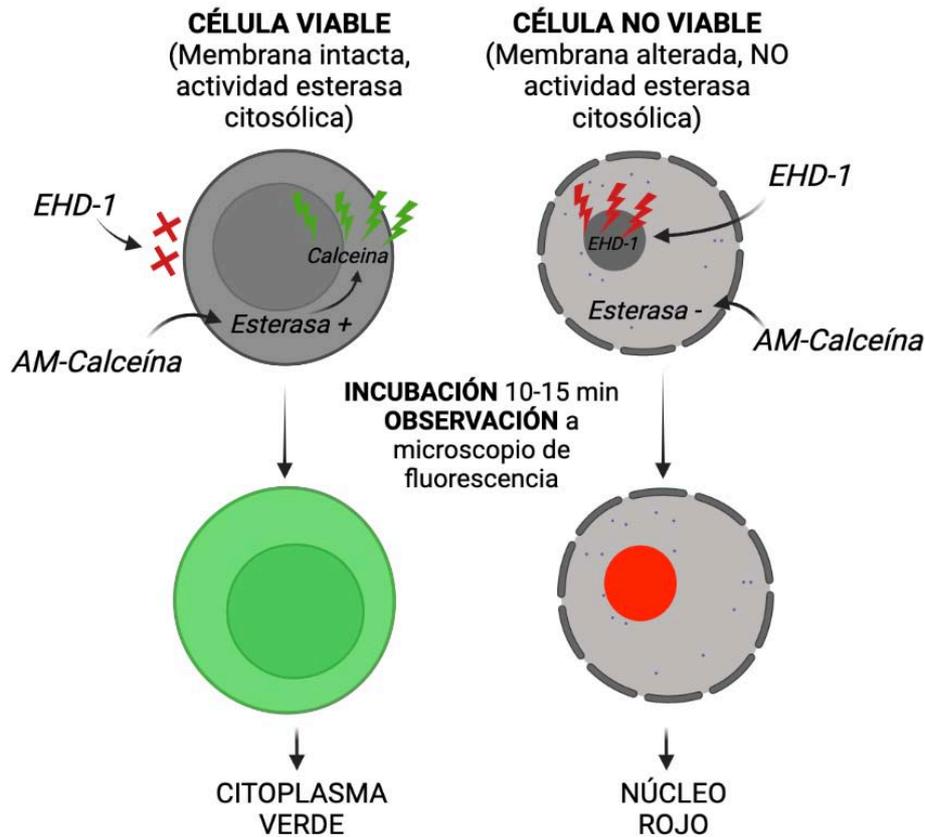
**Figura 20.** Esquema del estudio *in vitro* del efecto del secretoma de células madre mesenquimales (CMM), en concreto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), del secretoma de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) y del secretoma de pulpa dental (S-PD), sobre células epiteliales humanas (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

Para comparar el efecto de una concentración cambiante de secretoma a unos tiempos de exposición diferentes, se cultivaron las células epiteliales con medio suplementado con concentraciones crecientes de cada tipo de secretoma (25%, 50%, 75%, 100%), siendo 2000 µg/mL la concentración 100%. Asimismo, como controles positivos se utilizó medio de cultivo basal diluido con PBS a las mismas concentraciones que los grupos de estudio (25%, 50%, 75%, 100%). El efecto sobre las células para cada tipo de secretoma y concentración fue evaluado a las 24, 48, 72 y 120 h. Una vez realizada la exposición de las células epiteliales humanas a los secretomas, se realizó un análisis de la viabilidad celular, de la proliferación celular y de la reparación de heridas.

#### ***4.4.1. Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana.***

Para determinar los efectos biológicos de los secretomas de las procedencias estudiadas (S-AD, S-PD y S-WH) sobre la viabilidad de las células epiteliales, se utilizó un kit de análisis de viabilidad/citotoxicidad celular (LIVE/DEAD® Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para ello, las células epiteliales incubadas con cada tipo de secretoma, concentración y tiempo se lavaron en PBS. A continuación, se añadió una solución de acetoximetil calceína y bromuro de etidio durante 15 minutos a 37° C (Figura 21). Posteriormente, las células se lavaron nuevamente con PBS y se obtuvieron imágenes histológicas con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti-U (Nikon, Tokio, Japón).

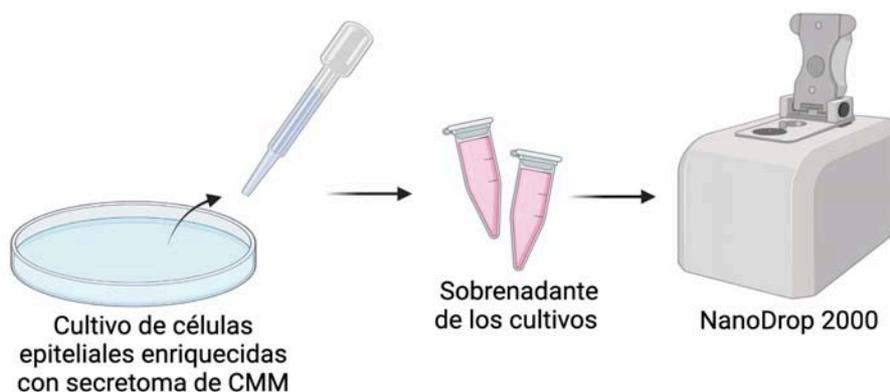
En cada muestra se cuantificó el porcentaje de células vivas (teñidas de verde) y de células muertas (teñidas de rojo). Los controles positivos consistieron en células epiteliales cultivadas en medio de cultivo basal, mientras que los controles negativos fueron células epiteliales tratadas con un 2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich/Merck) para inducir la lisis celular. Todos los análisis se realizaron por triplicado (n=3).



**Figura 21.** Fundamento del ensayo de viabilidad mixto LIVE/DEAD<sup>®</sup>. En este ensayo se evalúa, por un lado, la actividad metabólica esterasa en el citosol (ensayo funcional) mediante el reactivo acetoximetil-calceína (AM-Calceína). Por otro lado, se evalúa la integridad de la membrana plasmática mediante el reactivo EHD-1 que emite fluorescencia al unirse al ADN del núcleo (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

Además del análisis LIVE/DEAD<sup>®</sup>, la viabilidad celular también se evaluó mediante la cuantificación del ADN libre. Para ello, se recogieron 2.0 µl del sobrenadante de cada uno de los cultivos celulares a las 24, 48, 72 y 120h. A continuación, se cuantificó la cantidad de ADN libre en el medio con el equipo UV-Vis NanoDrop 2000 (Gibco-Thermo Fisher Scientific) (Figura 22).

Se utilizaron controles positivos y negativos como los descritos para el ensayo LIVE/DEAD<sup>®</sup>. Todos los análisis se realizaron por triplicado (n=3) y los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular después de normalizar cada valor con respecto a los controles negativo y positivo.



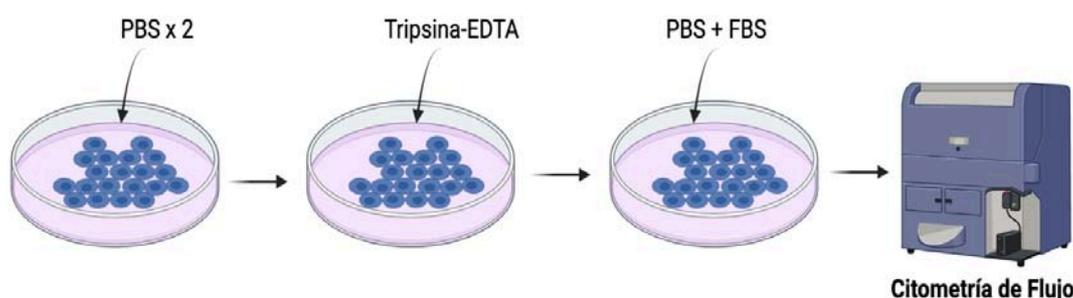
**Figura 22.** Esquema del protocolo de cuantificación del ADN libre (CMM) mediante NanoDrop<sup>®</sup> 2000 obtenido del cultivo de células epiteliales enriquecidas con secretoma de células madre mesenquimales. (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

#### **4.4.2. Análisis de la proliferación de las células epiteliales de piel humana.**

Para estudiar la capacidad del secretoma de células madre mesenquimales (CMM) de inducir proliferación celular, se cuantificó el número de células mediante citometría de flujo y se realizó una prueba de actividad mitocondrial denominada WST-1.

Para la cuantificación de células mediante citometría de flujo, los cultivos celulares fueron lavados dos veces en PBS y tripsinizados con tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma/Aldrich Merck). A continuación, las células disociadas se resuspendieron en un tampón constituido por una mezcla de PBS con un 10% de FBS y un 2% de EDTA (Sigma/Aldrich Merck). Posteriormente, se cuantificó el número de células con un citómetro de flujo NovoCyte<sup>®</sup> (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) (Figura 23). En referencia a los controles, se procedió como en los estudios de viabilidad celular, es decir, como controles positivos se utilizaron células epiteliales cultivadas a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75%, 100%) de medio de cultivo basal y como controles negativos se optó por células epiteliales tratadas con un 2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich/Merck).

Además, los resultados se normalizaron con respecto al valor de control para calcular el *fold-change* (FC) sobre la cantidad de células referencia del grupo de control (FC=1). Todos los análisis se realizaron por triplicado (n=3).

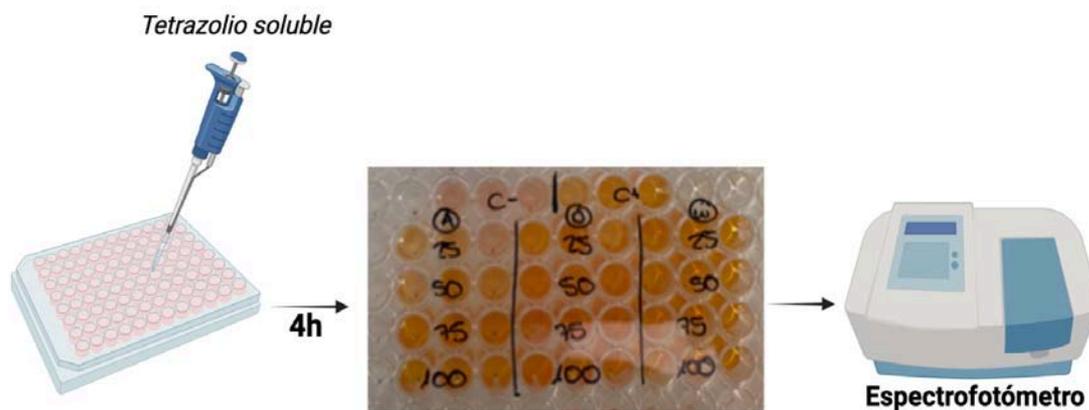


**Figura 23.** Esquema del protocolo de cuantificación celular mediante citometría de Flujo, que consistió en dos lavados con tampón fosfato salino (PBS) y la disociación celular con tripsina EDTA para su posterior análisis (Elaborado con la aplicación en línea Biorender.com).

Además de la citometría de flujo también se analizó la proliferación celular con el ensayo colorimétrico WST-1 (reactivo de proliferación celular WST-1, Sigma/Aldrich Merck). Este procedimiento consistió en añadir sal de tetrazolio soluble en agua al medio de cultivo de cada grupo de estudio que contenía células epiteliales cultivadas con los diferentes tipos y concentraciones de secretoma a las 24, 48, 72 y 120 h (252,253). Posteriormente, las células se incubaron en esta mezcla durante 4 h a 37° C.

A continuación, se realizó un análisis colorimétrico midiendo la absorbancia a 450 nm con un lector de espectrofotómetro de microplacas Asys UVM-340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) (Figura 24).

Se utilizaron controles positivos y negativos como se ha descrito para los análisis de viabilidad celular, y los resultados se normalizaron con respecto a los controles positivos (considerados 100%) y los controles negativos (considerados 0%). A su vez y como en los casos anteriores, todos los análisis se realizaron por triplicado (n=3).



**Figura 24.** Descripción del ensayo colorimétrico WST-1 para llevar a cabo el análisis de proliferación de células epiteliales de piel humana. (Imagen editada con la aplicación en línea Biorender.com).

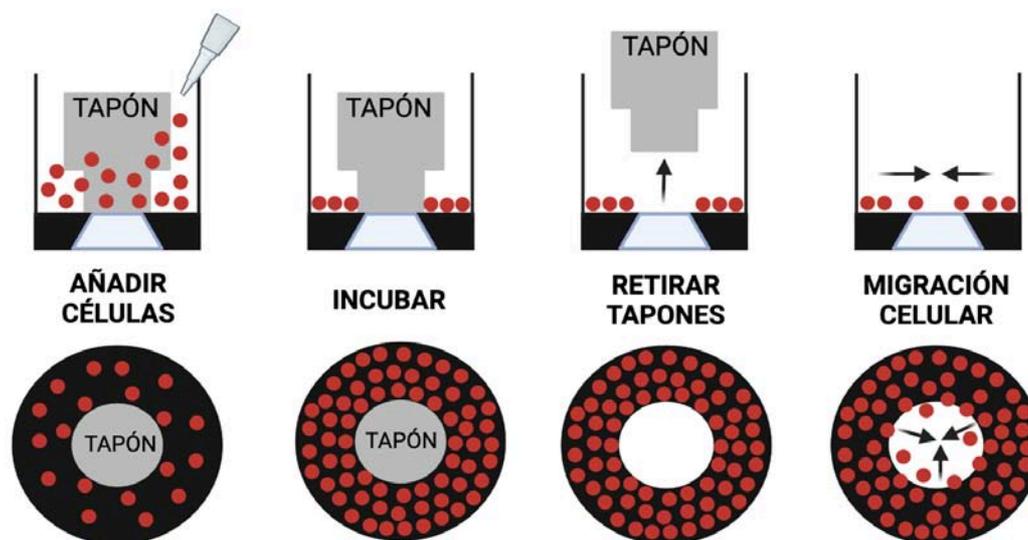
#### 4.4.3. Prueba de reparación de heridas

Para determinar la capacidad de las células epiteliales para reparar un defecto tisular tras la exposición al secretoma obtenido de células madre mesenquimales (CMM), se realizó un análisis de reparación de heridas *in vitro* con el kit Oris<sup>®</sup> Universal Cell Migration Assembly Kit (Platypus Technologies LLC, Fitchburg, WI, USA).

Para ello, las células se cultivaron a una densidad celular de  $1.7 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos que contenían los tapones proporcionados por el fabricante (Figura 25). El procedimiento se inició utilizando medio de cultivo epitelial durante 48 h para favorecer la confluencia celular. Una vez conseguida dicha confluencia, se retiraron físicamente los tapones de las placas para permitir que las células migraran a las zonas vacías como se aprecia en la figura 25. El medio de cultivo epitelial se sustituyó por medio enriquecido con secretoma de CMM de cada una de las fuentes estudiadas a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75%, 100%).

Para evaluar los resultados, se obtuvieron imágenes cada 12 h con el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-U hasta apreciarse la ocupación

completa del área previamente interferida por los tapones (Figura 25). Estos análisis se realizaron por triplicado (n=3). En cada muestra se cuantificó el área ocupada por las células epiteliales y la superficie desprovista de células con el software *Image J*. Posteriormente, los resultados se normalizaron respecto a los controles a tiempo 0, considerando 100% cuando el espacio está completamente vacío.



**Figura 25.** Esquema del ensayo de reparación de heridas *in vitro* mediante el uso del kit *Oris™ Universal Cell Migration Assembly*. (Elaborado con la aplicación en línea *Biorender.com*).

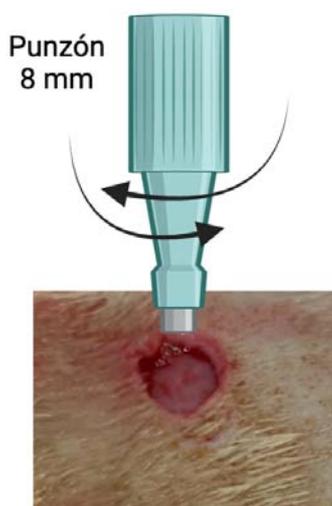
#### 4.5. Análisis *in vivo* del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH).

Para evaluar los efectos *in vivo* de los diferentes secretomas, se aplicó S-AD, S-DP o S-WH en lesiones cutáneas de espesor completo infligidas a ratas Wistar de laboratorio. Todos los animales utilizados fueron ratas macho adultas de doce semanas de edad. Se utilizaron 6 animales por cada grupo experimental (n=6).

La experimentación animal fue aprobada por el Comité de Ética y Experimentación Animal (CEEA) de Granada y por la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía,

España, con el código de protocolo 19/04/2021/053, con fecha de aprobación el 21 de abril de 2021. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones pertinentes nombradas y los autores cumplieron con las directrices ARRIVE.

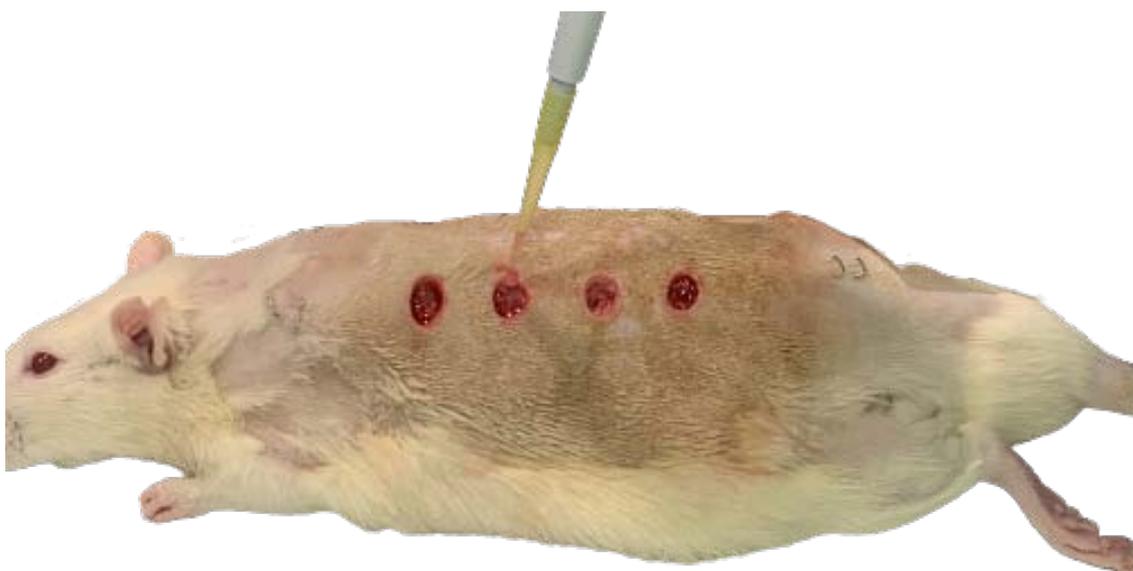
En primer lugar, los animales fueron anestesiados usando ketamina y acepromazina. A continuación, se utilizó un punzón dermatológico de 8 mm para generar 4 lesiones circulares idénticas en el dorso de cada animal, retirando la piel extirpada por el punzón dermatológico (Figura 26). En casos de hemorragia secundaria al procedimiento, se consiguió una adecuada hemostasia presionando mecánicamente la lesión durante 2-3 minutos con una gasa estéril.



**Figura 26.** Lesiones en dorso de ratas con punzón dermatológico de 8 mm para llevar a cabo el análisis *in vivo* del efecto del secretoma de células madre mesenquimales. (Imagen editada con la aplicación en línea Biorender.com).

Posteriormente, se aplicaron 50  $\mu$ L de cada tipo de secretoma (S-AD, S-DP, S-WH) en cada defecto cutáneo (Figura 27). El grupo control consistió en la aplicación de 50  $\mu$ L de DMEM con 10% de FBS y 1% de antibióticos y antimicóticos, ya que los secretomas se generaron y diluyeron en el mismo medio.

A continuación, se protegieron los defectos cutáneos con una gasa estéril y se realizó un seguimiento de los animales durante cuatro semanas, con la aplicación de cada tipo de secretoma cada 24 h. Se tomaron imágenes de cada defecto al cabo de cuatro semanas, y se cuantificó el área ocupada por cada defecto utilizando el software *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU).



**Figura 27.** Evaluación del efecto del secretoma aislado de células madre mesenquimales en heridas en el dorso de ratas Wistar de doce semanas de edad.

Tras cuatro semanas de seguimiento, se practicó la eutanasia a los animales y las áreas de regeneración se extrajeron quirúrgicamente y se fijaron en formol para su análisis histológico. Posteriormente, los tejidos fijados fueron deshidratados, aclarados e incluidos en parafina para obtener cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$ . Una vez obtenidos los cortes histológicos, estos fueron desparafinizados y teñidos utilizando métodos histológicos e histoquímicos rutinarios. Concretamente, se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson para la evaluación de la morfología global, la técnica de rojo picrosirio para la evaluación de las fibras de colágeno y la técnica de azul alcian para la evaluación de los proteoglicanos.

En lo que se refiere al procesamiento histológico, todos los cortes fueron desparafinados y rehidratados mediante una batería de alcoholes decrecientes (100%, 96%, 70%, 50%). Concretamente para la tinción hematoxilina-eosina, las muestras fueron sumergidas, en primer lugar, en el colorante hematoxilina y posteriormente, tras un lavado con agua destilada, en el colorante eosina. En referencia a la tinción tricrómico de Masson las muestras fueron teñidas con una solución de escarlata-fucsina ácida, posteriormente, se aplicó una solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico y, finalmente, una solución de azul de anilina. En cuanto a la técnica de rojo picrosirio, los cortes histológicos se tiñeron con la solución de trabajo *Sirius red F3B* y posteriormente fueron contrastados con Hematoxilina de Harris. Para la última tinción se empleó una solución de azul alcían y, a continuación, se lavaron las muestras con PBS (254–257).

#### **4.6. Análisis Estadístico**

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias globales entre todos los grupos de estudio. Posteriormente, se realizaron comparaciones específicas post-hoc por pares con la prueba U de Mann-Whitney. Este análisis estadístico se utilizó para comparar cada grupo de estudio (cada tipo de secretoma, cada concentración y cada tiempo de estudio) con el grupo control (DMEM para S-AD y S-PD, y Amniomax C-100 para S-WH). La misma prueba se utilizó para comparar los resultados obtenidos para dos tipos diferentes de secretoma en las pruebas de análisis de proteínas, viabilidad celular y análisis de proliferación celular, así como para comparar el tamaño de los defectos generados en los animales de laboratorio. Las correlaciones entre los resultados de dos pruebas se comprobaron con la prueba rho de Spearman.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el software SPSS v. 25 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y con el complemento Excel Real Sta-

tistics, disponible en [www.real-statistics.com](http://www.real-statistics.com) (Dr. Charles Zaiontz, Purdue University, West Lafayette, IN, EE.UU.). El nivel de significación se fijó en el 5%. Las gráficas se realizaron con el software Prism GraphPad de Dotmatics®.

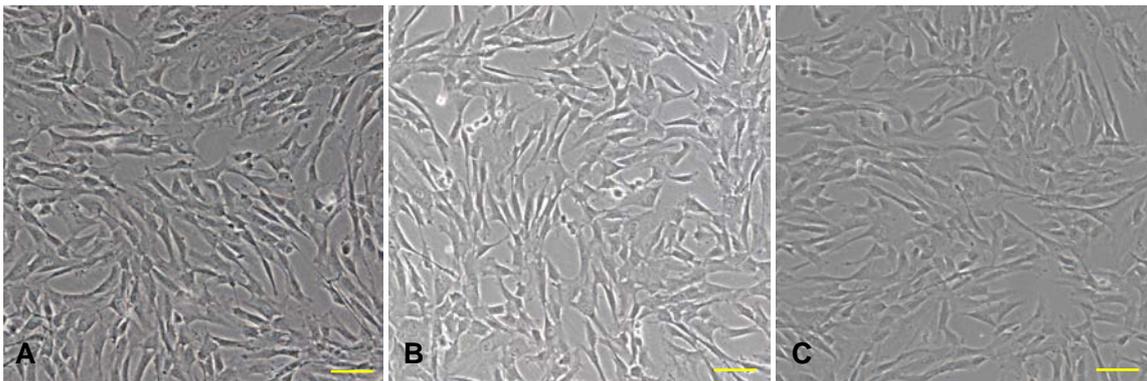


## **5. RESULTADOS**



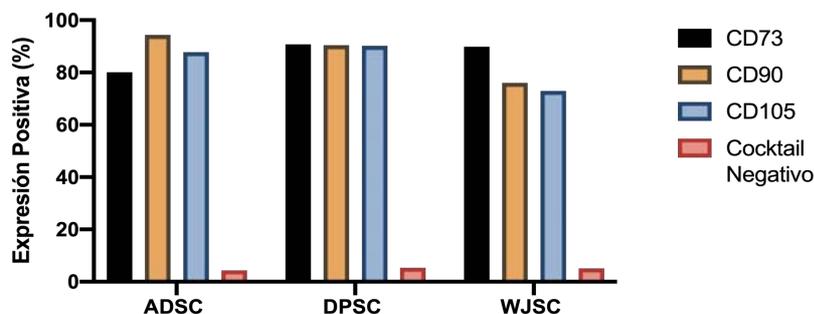
### 5.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de las células madre mesenquimales (CMM).

Los resultados del aislamiento y caracterización de las CMM revelaron la capacidad de adherencia de las tres fuentes celulares estudiadas (CMM del tejido adiposo, CMM de la pulpa dental y CMM de la gelatina de Wharton) a la superficie de cultivo (Figura 28).



**Figura 28.** Imágenes de microscopía de contraste de fases tras el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales (CMM). A: CMM de tejido adiposo; B: CMM de pulpa dental; C: CMM de gelatina de Wharton del cordón umbilical. Barra de magnificación 100µm.

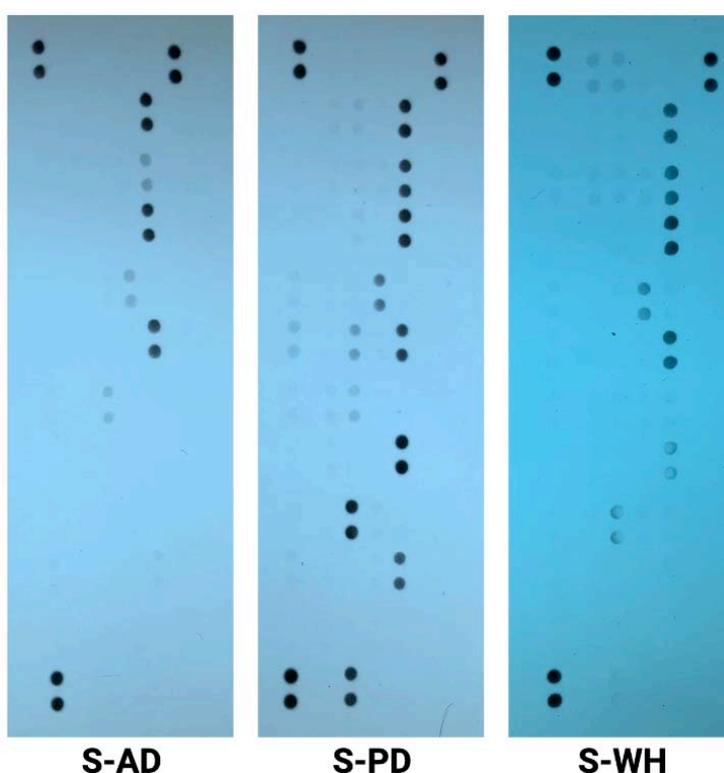
Asimismo, el análisis de la expresión de marcadores de indiferenciación (CD73, CD90 y CD105) mostró la expresión positiva de CD73, CD90 y CD105, así como la expresión negativa de CD14 (o CD11b), CD34, CD45, CD79α (o CD19) y antígeno leucocitario humano (HLA)-DR. Estos marcadores fueron analizados en conjunto mediante un *cocktail* negativo (Figura 29).



**Figura 29.** Resultados del proceso de caracterización de células madre mesenquimales (CMM) mediante citometría de marcadores mediante citometría de flujo.

## 5.2. Caracterización proteica del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH).

El análisis de la expresión proteica de los secretomas procedentes de CMM de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton (S-WH) reveló la expresión de numerosas proteínas con funciones variadas (Figura 30 y Tabla 1).

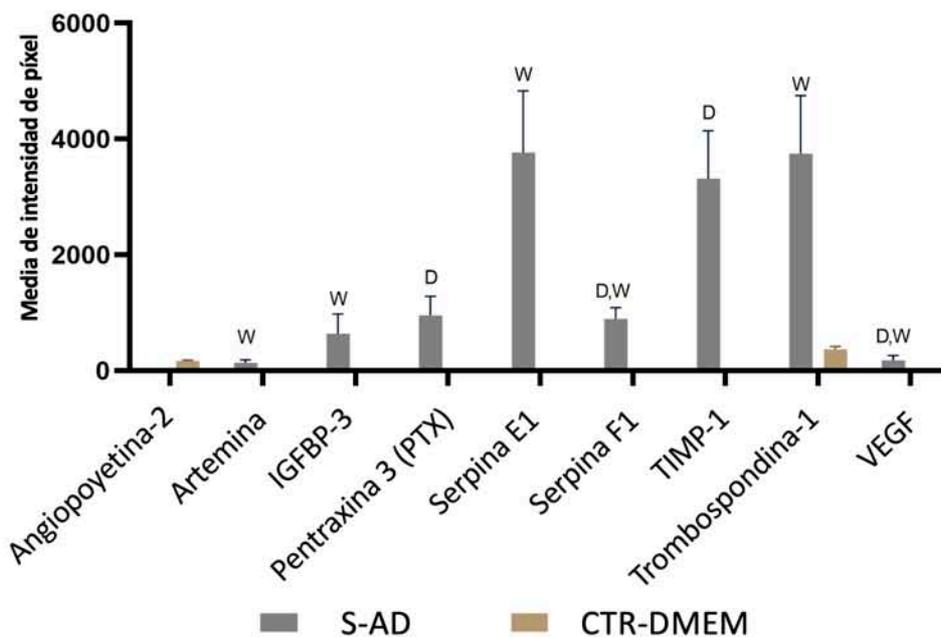


**Figura 30.** Imagen radiográfica de los array de cada uno de los tres tipos de secretoma analizados. S-AD: Secretoma de CMM de tejido adiposo; S-PS: Secretoma de CMM de pulpa dental; S-WH Secretoma de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical.

Proteínas	S-AD	S-PD	S-WH
Activina A	0.00±0.00	0.00±0.00	74.28±85.89
Angiogenina	0.00±0.00 <sup>D,W</sup>	175.98±50.25 <sup>A,W</sup>	80.53±25.70 <sup>A,D</sup>
Angiopoyetina-1	0.00±0.00 <sup>D</sup>	950.81±388.12 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
Angiopoyetina-2	0.00±0.00 <sup>D</sup>	193.18±14.76 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
Artemina	137.43±52.20 <sup>W</sup>	227.09±86.56 <sup>W</sup>	0.00±0.00 <sup>A,D</sup>
Factor de coagulación III	0.00±0.00 <sup>W</sup>	0.00±0.00 <sup>W</sup>	262.26±94.45 <sup>A,D</sup>
CXCL16	0.00±0.00 <sup>D</sup>	172.64±38.90 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
DPPIV	0.00±0.00 <sup>D</sup>	115.05±67.85 <sup>A</sup>	73.85±90.55
Endostatina/Colágeno XVIII	0.00±0.00 <sup>D</sup>	211.40±56.44 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
Endotelina-1	0.00±0.00 <sup>D</sup>	143.96±81.59 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
GDNF	0.00±0.00 <sup>W</sup>	0.00±0.00 <sup>W</sup>	237.52±82.02 <sup>A,D</sup>
GM-CSF	0.00±0.00 <sup>D</sup>	211.58±44.20 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
HB-EGF	0.00±0.00 <sup>D</sup>	131.00±45.69 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
HGF	0.00±0.00 <sup>D</sup>	235.84±46.21 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
IGFBP-1	0.00±0.00 <sup>D</sup>	103.67±70.65 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
IGFBP-2	0.00±0.00 <sup>D</sup>	1.367.16±281.70 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
IGFBP-3	635.52±341.84 <sup>W</sup>	908.30±407.36 <sup>W</sup>	0.00±0.00 <sup>A,D</sup>
IL-8	0.00±0.00 <sup>D,W</sup>	5.292.86±431.42 <sup>A,W</sup>	902.98±209.65 <sup>A,D</sup>
MCP-1	0.00±0.00 <sup>D,W</sup>	3.114.89±816.07 <sup>A,W</sup>	128.31±82.31 <sup>A,D</sup>
MMP-9	0.00±0.00 <sup>D</sup>	194.32±44.77 <sup>A,W</sup>	58.67±67.94 <sup>D</sup>
Pentraxina 3 (PTX3)	950.49±329.62 <sup>D</sup>	2.428.13±324.78 <sup>A,W</sup>	932.59±195.52 <sup>D</sup>
Persefina	0.00±0.00 <sup>D</sup>	242.11±130.05 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
Factor plaquetario 4 (PF4)	0.00±0.00 <sup>D</sup>	106.33±101.32 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>D</sup>
Serpin E1	3.766.56±1.064.20 <sup>W</sup>	3.712.11±251.93 <sup>W</sup>	2.536.60±197.68 <sup>A,D</sup>
Serpin F1	890.28±195.87 <sup>D,W</sup>	3.670.35±181.96 <sup>A,W</sup>	2.007.66±327.05 <sup>A,D</sup>
TIMP-1	3.319.92±823.43 <sup>D</sup>	4.304.53±165.44 <sup>A,W</sup>	3.291.71±268.86 <sup>D</sup>
Trombospondina-1	3.749.86±1.003.73 <sup>W</sup>	4.002.02±463.98 <sup>W</sup>	2.376.19±329.89 <sup>A,D</sup>
uPA	0.00±0.00 <sup>D,W</sup>	5,551.01±180.03 <sup>A,W</sup>	944.53±335.50 <sup>A,D</sup>
VEGF	175.00±86.53 <sup>D,W</sup>	2,800.51±92.91 <sup>A,W</sup>	0.00±0.00 <sup>A,D</sup>

**Tabla 1.** Cuantificación de las proteínas halladas en cada tipo de secretoma. Los valores corresponden a la intensidad media de los píxeles ± desviación estándar de cada proteína. S-AD: Secretoma de células mesenquimales del tejido adiposo. S-PD: Secretoma de células madre de la pulpa dental. S-WH: Secretoma de células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. A: Las diferencias comparadas con S-AD son estadísticamente significativas; D: Las diferencias comparadas con S-PD son estadísticamente significativas; W: Las diferencias con S-WH son estadísticamente significativas.

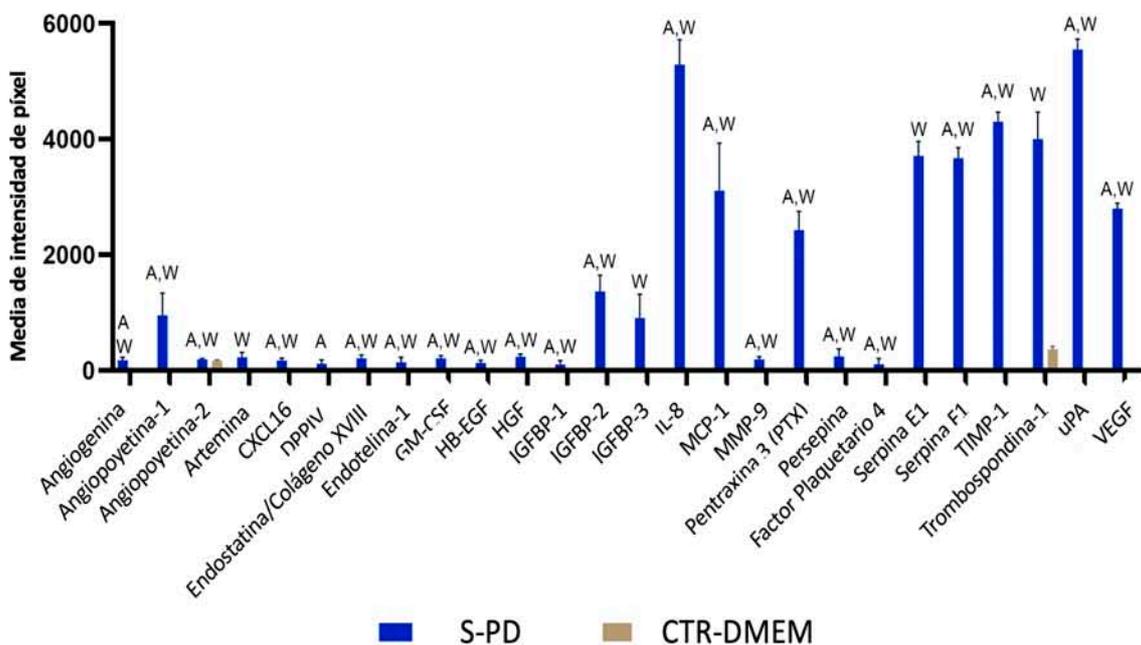
Como aparece en la Figura 31, en el S-AD se observó la expresión de 8 de las 55 proteínas analizadas (14.54%), incluyendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el inhibidor 1 de la metalopeptidasa (TIMP-1), la trombospondina-1, la serpina E1, la proteína transportadora 3 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3), la serpina F1 y la pentraxina 3 (PTX3). Por un lado, al comparar la expresión proteica del S-AD con la expresión hallada en el S-WH, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las proteínas excepto para PTX3 y TIMP-1. Por otro lado, la comparación del S-AD con S-PD evidenció diferencias estadísticamente significativas en VEGF, TIMP-1, serpin F1 y PTX3 ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1).



**Figura 31.** Análisis de expresión proteica del secretoma procedente de células madre mesenquimales del tejido adiposo (S-AD). Los valores corresponden a la media de la intensidad de los píxeles  $\pm$  desviación estándar. D: Las diferencias comparadas con el secretoma de pulpa dental (S-PD) son estadísticamente significativas; W: Las diferencias comparadas con el secretoma de gelatina de Wharton (S-WH) son estadísticamente significativas; CTR-DMEM: Control con DMEM.

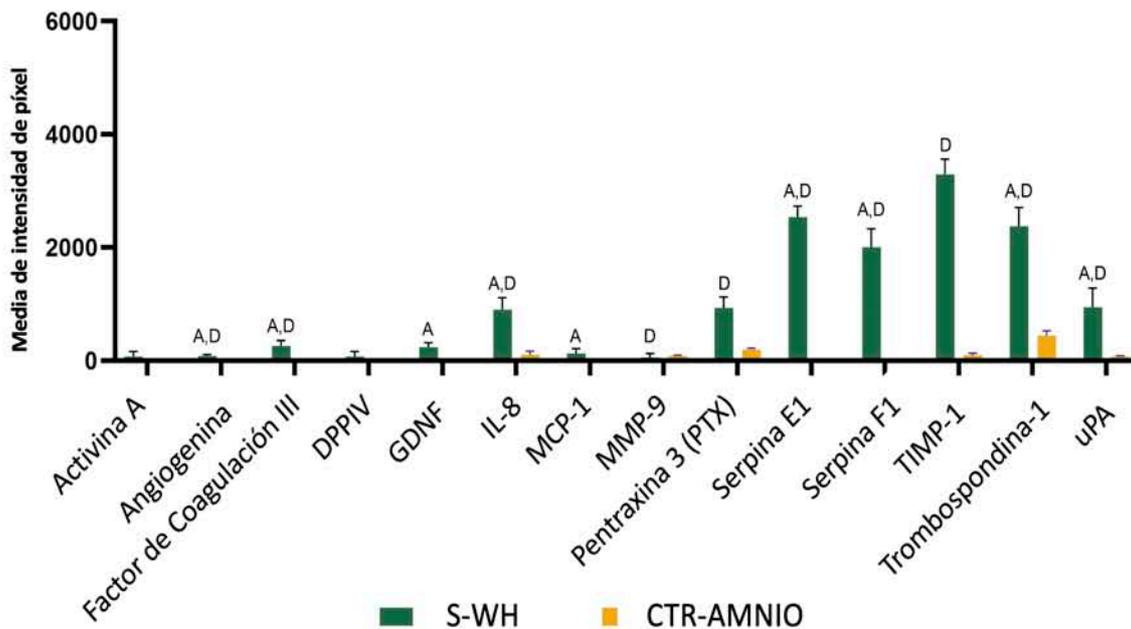
En el caso del S-PD, se observó la expresión de 27 proteínas de las 55 que configuraban el *array* (49.09%) incluyendo la angiogenina, la angio-

poyetina-1, la angiopoyetina-2, la artemina, la quimiocina ligando 16 (CXCL16), el dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), la endostatina/colágeno XVIII, la endotelina-1, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de crecimiento similar a EGF unido a heparina (HB-EGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), la proteína transportadora 1,2 y 3 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3), la citocina IL-8, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), la metalopeptidasa 9 de la matriz (MMP-9), la pentraxina 3 (PTX3), la persefina, el factor plaquetario 4 (PF4), la serpina E1 y F1, la trombospondina-1, el inhibidor 1 de la metalopeptidasa (TIMP-1), el activador del plasminógeno urocinasa (uPA) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Figura 32). De las 27 proteínas expresadas, 25 presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con las halladas en el S-WH y 22 respecto al S-AD (Tabla 1).



**Figura 32.** Análisis de expresión proteica del secretoma procedente de células madre mesenquimales de la pulpa dental (S-PD). Los valores corresponden a la media de la intensidad de los píxeles  $\pm$  desviación estándar. A: Las diferencias comparadas con secretoma de CMM de tejido adiposo (S-AD) son estadísticamente significativas; W: Las diferencias comparadas con secretoma de CMM de la gelatina de Wharton (S-WH) son estadísticamente significativas; CTR-DMEM: Control con DMEM.

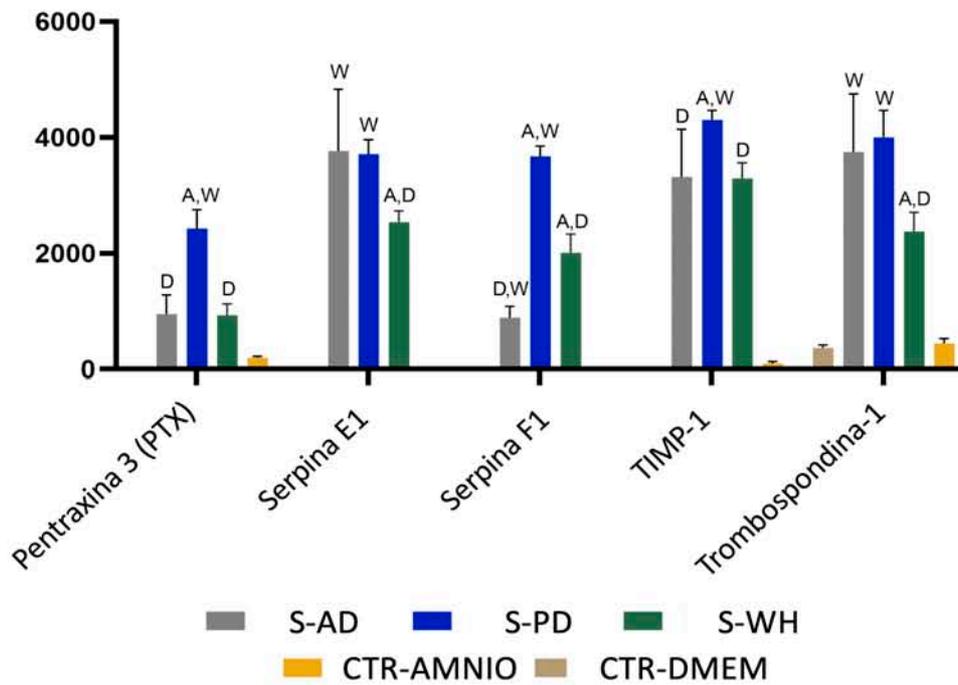
Por su parte, el S-WH reveló la expresión de 14 proteínas (25.45%), entre las cuales se encontraban la activina A, la angiogenina, el factor de coagulación III, la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), la IL-8, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), la metalopeptidasa 9 de la matriz (MMP-9), la pentraxina 3 (PTX3), la serpina E1 y F1, la trombospondina-1, el inhibidor 1 de la metalopeptidasa (TIMP-1) y el activador del plasminógeno urocinasa (uPA) (Figura 33). En este caso se evidenciaron diferencias significativas respecto a la expresión proteica de S-AD para 9 de estas proteínas, y 12 comparándolo con el S-PD (Tabla 1).



**Figura 33.** Análisis de expresión proteica del secretoma procedente de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). Los valores corresponden a la media de la intensidad de los píxeles  $\pm$  desviación estándar. A: Las diferencias comparadas con secretoma de CMM de tejido adiposo (S-AD) son estadísticamente significativas; D: Las diferencias comparadas con secretoma de CMM de la pulpa dental (S-PD) son estadísticamente significativas; CTR-AMNIO: Control con AmnioMax

Curiosamente, los tres secretoma contenían pentraxina-3, serpin-E1, serpin-F1, TIMP-1 y trombospondina-1 (Figura 34), siendo el S-PD el que tendía a mostrar una mayor expresión de estas cinco proteínas. Estas proteínas desempeñan funciones importantes en los procedimientos de proliferación celular.

Por último, comprobamos también la expresión proteica de las soluciones utilizadas como control que, como era de esperar, contenían cantidades muy bajas de estas cinco proteínas.



**Figura 34.** Proteínas comunes en los tres tipos de secretoma estudiados. S-AD: Secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo; S-PD: Secretoma procedente de CMM de la pulpa dental; S-WH: Secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton; CTR-AMNIO: Control con AmnioMax; CTR-DMEM: Control con DMEM. A: Las diferencias comparadas con S-AD; D: Las diferencias comparadas con S-PD son estadísticamente significativas; W: Las diferencias comparadas con S-PD son estadísticamente significativas.

### 5.3. Análisis *in vitro* del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) sobre células epiteliales humanas

Para realizar el análisis *in vitro* del efecto del S-AD, del S-PD y del S-WH sobre las células epiteliales humanas, las células fueron expuestas a distintas concentraciones y tiempos de cada tipo de secretoma.

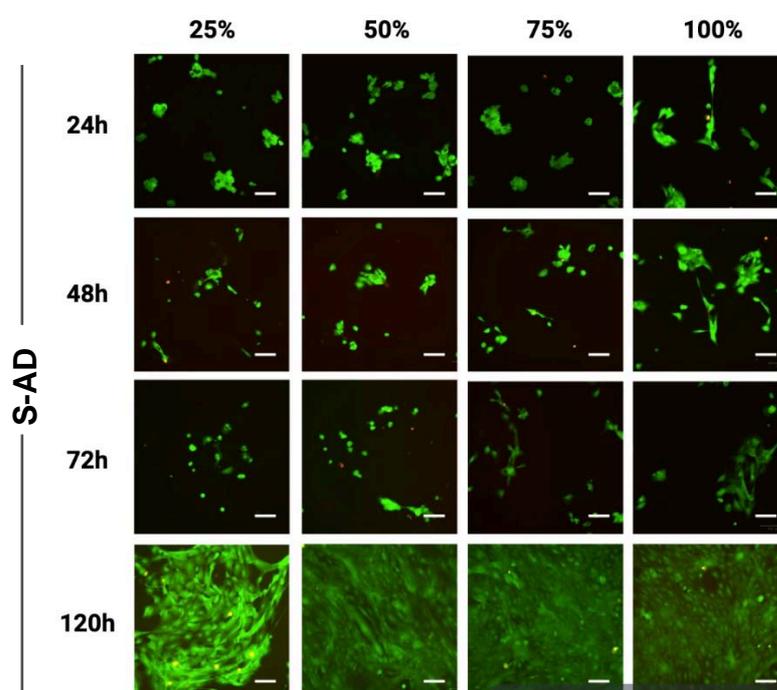
#### 5.3.1. Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana

La viabilidad celular se analizó con el test LIVE/DEAD® y con la cuantificación del ADN libre para cada secretoma (S-AD, S-PD y S-WH).

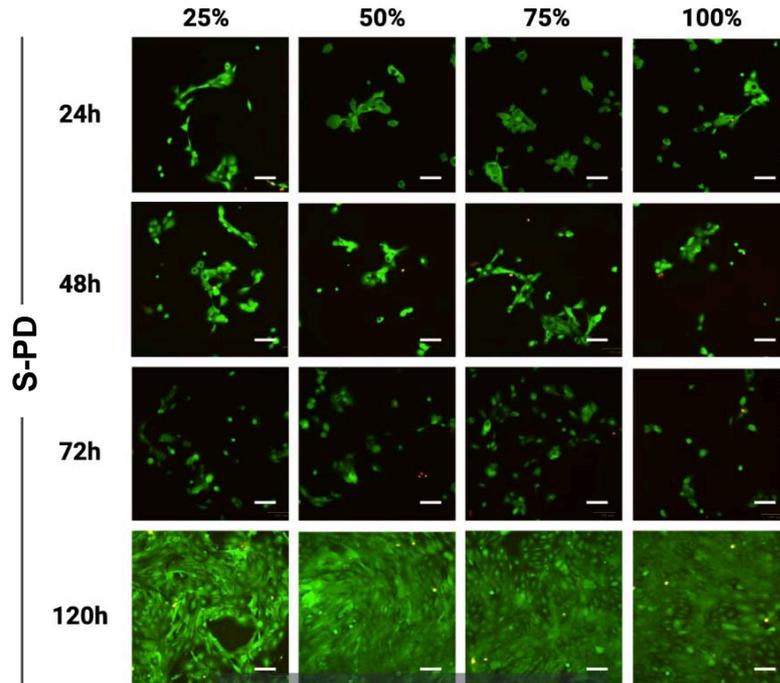
VIABILIDAD		test LIVE/DEAD®			
		24 h	48 h	72 h	120 h
S-AD	25%	92.5±0.94	92.7±0.90	91.35±2.32	97.11±0.49
	50%	87.87±3.51	90.6±2.96	86.45±2.79	99.11±0.21
	75%	85.82±4.45	94.35±1.80	87.2±5.22	99.26±0.16
	100%	87.34±4.31	93.5±0.61	92.17±1.73	99.21±0.16
S-PD	25%	90.55±1.90	95.17±0.60	93.53±0.86	97.11±1.73
	50%	91.07±0.98	95.33±1.90	90.15±6.21	99.09±0.24
	75%	94.73±0.50	93.96±1.81	93.09±3.21	98.59±0.27
	100%	91.85±2.19	96.21±0.96	93.87±0.55	97.99±0.33
S-WH	25%	86.58±1.89	95.14±1.75	94.51±2.54	99.06±0.39
	50%	89.28±0.99	93.1±0.89	89.29±7.61	98.84±0.28
	75%	90.58±3.76	90.54±3.74	92.94±3.12	99±0.22
	100%	89.1±1.19	94.45±1.64	92.23±2.06	98.6±0.48
CTR DMEM	25%	99.41±0.42	97.89±0.74	99.33±0.06	99.78±0.08
	50%	99.45±0.07	98.2±0.38	99.33±0.06	99.92±0.02
	75%	99.78±0.10	98.07±0.38	99.33±0.06	99.91±0.01
	100%	99.68±0.21	98.28±0.47	99.33±0.06	99.95±0.01
CTR AMNIO	25%	99.38±0.13	98.6±0.07	99.65±0.12	99.83±0.04
	50%	99.69±0.20	99.07±0.19	99.8±0.05	99.85±0.07
	75%	99.71±0.12	99.62±0.31	99.67±0.16	99.66±0.08
	100%	99.65±0.32	99.15±0.08	99.76±0.08	99.5±0.49

**Tabla 2.** Resultados del análisis de viabilidad de células epiteliales de piel humana determinados por el ensayo LIVE/DEAD®. Resultados mostrados como media ± desviación estándar.

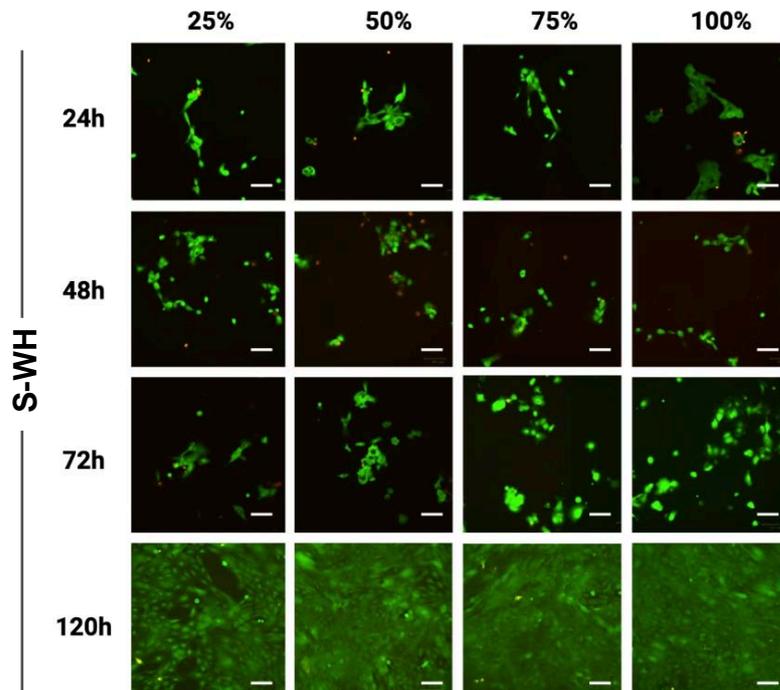
En primer lugar, se analizó la bioseguridad en la utilización de secretoma sobre cultivos de células epiteliales determinando la viabilidad celular mediante el ensayo LIVE/DEAD<sup>®</sup>. Los resultados mostraron valores elevados que apuntaban a que el secretoma era seguro para las células. Concretamente, los datos de viabilidad fueron superiores al 85% para todos los secretomas y sus distintas concentraciones tras 24, 48 y 72 horas de exposición y superiores al 97% tras 120 horas de exposición (Figuras 35, 36, 37 y Tabla 2).



**Figura 35.** Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana mediante el ensayo LIVE /DEAD<sup>®</sup> tras la exposición a secretoma procedente de células madre del tejido adiposo (S-AD) a distintas concentraciones (25%, 50%, 75%, 100%) durante 24, 48, 72 y 120 h. Barra de magnificación 100µm.



**Figura 36.** Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana mediante el ensayo LIVE /DEAD® tras la exposición a secretoma procedente de células madre de la pulpa dental (S-PD) a distintas concentraciones (25%, 50%, 75%, 100%) durante 24, 48, 72 y 120 h. Barra de magnificación 100µm.



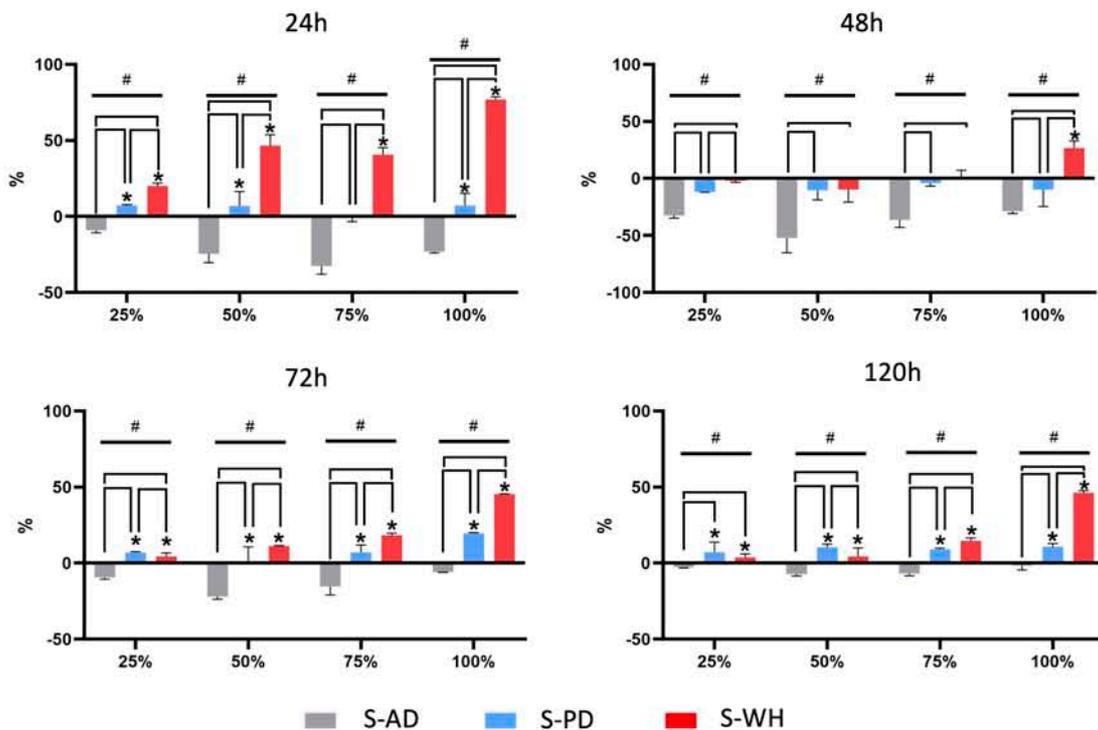
**Figura 37.** Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de piel humana mediante el ensayo LIVE /DEAD® tras la exposición a secretoma procedente de células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) a distintas concentraciones (25%, 50%, 75%, 100%) durante 24, 48, 72 y 120 h. Barra de magnificación 100µm.

A continuación, se evaluó la viabilidad de las células epiteliales cultivadas con los secretomas (S-AD, S-PD y S-WH) mediante la cuantificación del ADN libre en el medio de cultivo. Los diferentes grupos de estudio mostraron una cantidad de ADN libre significativamente menor, y por tanto una mayor viabilidad celular con respecto a los controles de células epiteliales cultivadas en medio basal.

VIABILIDAD		Cuantificación de ADN libre			
		24 h	48 h	72 h	120 h
S-AD	25%	260.94±3.51	275.6±5.23	277.67±3.73	245.12±1.87
	50%	264.69±11.82	296.89±30.47	282.75±5.32	234.42±4.97
	75%	251.33±11.22	259.59±15.39	255.76±17.66	226.72±5.73
	100%	236.19±1.96	237.19±4.7	232.03±0.8	228.19±11.1
S-PD	25%	226.97±1.06	226.97±1.06	226.6±2.14	208.69±24.88
	50%	199.29±19.77	199.29±19.77	212.42±32.26	168.71±7.45
	75%	184.45±6.22	184.45±6.22	185.66±15.36	167.12±2.64
	100%	173.34±16.44	193.19±34.08	152.03±1.6	182.04±7.78
S-WH	25%	241.64±3.92	241.2±2.91	242.24±7.05	228.12±8.56
	50%	251.72±14.57	268.57±25.8	246.4±0.57	227.73±20.54
	75%	255.85±9.7	258.3±13.58	240.46±4.32	223.91±7.29
	100%	238.96±3.79	246.79±14.59	232.38±0.53	235.11±5.21
CTR DMEM	25%	242.23±8.65	199.7±3.94	248.26±31.42	235.53±16.91
	50%	213.58±1.19	175.16±6.8	213.59±5.35	207.75±9.13
	75%	183.73±14.7	174.8±14.24	207.76±3.42	201.19±7.63
	100%	188.37±3.27	169.86±3.18	213.7±2.01	222.5±5.94
CTR AMNIO	25%	283.23±5.21	236.27±9.25	256.24±15.64	242.25±11.49
	50%	348.81±53.6	245.98±4.61	282.11±11.36	244.24±18.96
	75%	340.24±2.29	261.51±1.52	297.93±15.23	278.65±23.71
	100%	398.69±35.94	309.25±11.14	375.29±16.1	408.2±68.83
CTR-NEG		468.8±2.36	506.03±6.55	596.63±10.04	608.7±3.29

**Tabla 3.** Análisis de la viabilidad de las células epiteliales de la piel humana mediante la cuantificación de ADN libre tras la exposición a secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo (S-AD), a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental (S-PD) y a secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). CTR DMEM: Control para S-AD y S-PD. CTR AMNIO: Control Amniomax para S-WH. Resultados a distintas concentraciones de secretoma (100%, 75%, 50%, 25%) durante 24, 48, 72 y 120h. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar.

Como se muestra en la Figura 38, los niveles más altos de viabilidad celular se encontraron cuando las células epiteliales fueron cultivadas con S-WH seguido de las células epiteliales expuestas a medio enriquecido con S-PD. Los valores de viabilidad celular más altos se apreciaron en las concentraciones más altas de secretoma. Concretamente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles alcanzados tras la exposición a S-WH respecto a los controles en todas las concentraciones a las 24, 72 y 120 h, y a una concentración del 100% a las 48 h. Por otra parte, las células epiteliales expuestas a S-PD presentaron valores de viabilidad superiores y estadísticamente significativos respecto a los controles en los mismos tiempos y concentraciones que para S-WH, excepto para la concentración 75% a las 24 h y la concentración 100% a las 48 h (Figura 38).



**Figura 38.** Viabilidad celular determinada mediante la cuantificación de ADN libre. Los resultados han sido normalizados respecto a los controles (línea 0) y son expresados como incremento porcentual de viabilidad celular respecto el grupo control. Las barras de error corresponden a la desviación típica. Significancia estadística con el control (\*); significancia estadística entre grupos (corchetes); significancia estadística mediante test de Kruskal-Wallis (#).

La prueba estadística de Kruskal-Wallis reveló diferencias globales entre todos los grupos tanto a las 24, 48, 72 y 120 h (Tabla 4).

VIABILIDAD		24h	48h	72h	120h
Ensayo LIVE/DEAD®	25%	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>
	50%	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>
	75%	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>
	100%	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>
Cuantificación ADN libre	25%	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
	50%	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
	75%	<b>0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
	100%	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>

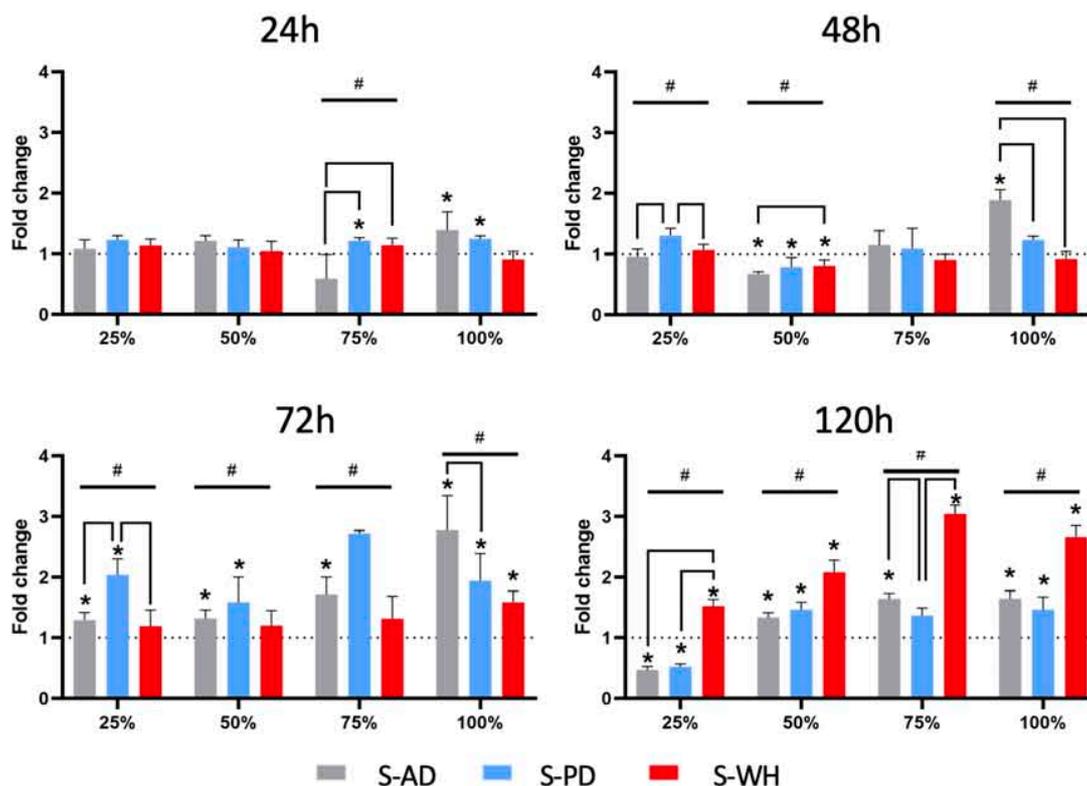
**Tabla 4.** Valor de *p* del test de Kruskal-Wallis para viabilidad medida mediante el ensayo LIVE/DEAD® y mediante la cuantificación de ADN libre. Significancia estadística resaltada en negrita.

### 5.3.2. Análisis de la proliferación de las células epiteliales de piel humana

Para el análisis de proliferación celular inducida por secretoma procedente de las distintas fuentes estudiadas (S-AD, S-PD, S-WH) se cuantificó el número de células epiteliales mediante citometría de flujo tras la exposición a las distintas concentraciones de secretoma (25%, 50%, 75% y 100%) durante 24, 48, 72 y 120 h (Tabla 5).

PROLIFERACIÓN	Número de células (Citometría de flujo)				
	24 h	48 h	72 h	120 h	
<b>S-AD</b>	<b>25%</b>	1010±138.59	829.33±109.77	744±71.02	6507.33±789.08
	<b>50%</b>	1037.33±73.33	682.67±37.22	820.67±85.66	18955.33±1135.92
	<b>75%</b>	556±385.00	1120±225.95	980±159.85	22412±1197.08
	<b>100%</b>	1310±284.02	1402.67±127.9	1231.33±253.51	20658.67±1655.21
<b>S-PD</b>	<b>25%</b>	1151.33±62.68	1130±98	1172±152.83	7250±644.88
	<b>50%</b>	946±101.82	800.67±163.64	988±256.49	20780±1743.05
	<b>75%</b>	1162.67±47.26	1064±315.26	1551±26.87	18636±1685.74
	<b>100%</b>	1178.67±49.17	918.67±44.96	862±199.19	18373.33±2650.75
<b>S-WH</b>	<b>25%</b>	1139.33±107.00	1087.33±97.35	842.67±186.36	21865.33±1578.82
	<b>50%</b>	1023.33±157.50	853.33±108.49	760.67±155.35	22395.33±2135.12
	<b>75%</b>	1194±121.70	864±94.32	838.67±236.92	22972.67±1094.74
	<b>100%</b>	1166.67±174.82	898.67±120.69	982±112.80	21572.67±1472.08
<b>Control DMEM</b>	<b>25%</b>	932.53±369.51	865.38±378.67	574.92±93.38	13745.59±1122.30
	<b>50%</b>	852.64±219.44	1020.28±30.77	621.24±29.39	14176.62±1028.57
	<b>75%</b>	952.97±24.86	972.44±31.32	569.16±26.91	13608.81±904.44
	<b>100%</b>	944.45±42.25	742.39±126.52	443.97±43.90	12541.01±1053.99
<b>Control AMNIOMAX</b>	<b>25%</b>	999.14±47.55	1017.47±48.97	705.54±29.58	14336.87±1304.03
	<b>50%</b>	976.89±101.47	1063.13±15.64	631.59±148.71	10756.24±483.42
	<b>75%</b>	1045.61±59.26	957.74±65.60	637.27±92.56	7548.44±1389.87
	<b>100%</b>	1286.42±508.72	975.11±175.27	617.49±63.47	8084.3±1250.03

**Tabla 5.** Análisis de la proliferación celular determinada por el recuento de células epiteliales expuestas a secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo (S-AD), a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental (S-PD) y a secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). CTR DMEM: Control para S-AD y S-PD. CTR AMNIO: Control Amniomax para S-WH. Resultados a distintas concentraciones de secretoma (100%, 75%, 50%, 25%) durante 24, 48, 72 y 120h. Valores obtenidos mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar.



**Figura 39.** Proliferación celular medida mediante citometría de flujo. Los resultados fueron expresados mediante “Fold-change” en relación a los controles (Considerados “Fold-change” 1). Las barras de error corresponden a la desviación típica. Significancia estadística con el control (\*); significancia estadística entre grupos (corchetes); significancia estadística mediante test de Kruskal-Wallis (#). S-AD: secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo; S-PD a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental; S-WH: secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical.

Los resultados mostraron aumentos significativos en el número de células epiteliales tras 24, 48, 72 y 120 h de cultivo (Figura 39 y Tabla 5). Los valores más altos se hallaron a las 120 h, siendo estadísticamente significativos con respecto a los controles en la mayoría de los grupos.

Concretamente, en el caso de las células cultivadas con S-AD, se halló un aumento significativo en todos los tiempos de estudio cuando se utilizaron concentraciones del 100%, con cifras que llegaron a triplicar los valores de los controles a las 72 h. En lo que respecta a concentraciones del 75%, se observó un aumento significativo a las 72 y 120 h. De forma similar, la exposición a concentraciones del 50% aumentó significativa-

mente el número de células a las 72 y 120 h, mientras que una concentración del 25% mostró un aumento estadísticamente significativo únicamente a las 72 h.

Cuando se evaluó la exposición de células epiteliales a S-PD se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tras 24, 72 y 120 h de cultivo con concentraciones del 100% de este tipo de secretoma. Tras 24 h de exposición también se halló diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles para concentraciones de secretoma del 75%. Concentraciones del 50% se asociaron con un aumento en el número de células epiteliales que fue estadísticamente significativo tras 72 y 120 h. Sin embargo, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en concentraciones del 25% tras 72 h de exposición.

Finalmente, en lo que se refiere a la exposición a S-WH, los datos obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración 100% a las 72 h. Curiosamente en este tipo de secretoma, tras 120 h de exposición, todas las concentraciones de secretoma indujeron proliferación celular, habiéndose hallado valores estadísticamente significativos superiores a los controles.

La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias generales entre los grupos y para la mayoría de las condiciones probadas aquí, excepto para las concentraciones del 25%, 50% y 100% después de 24 h y la concentración del 75% después de 48 h.

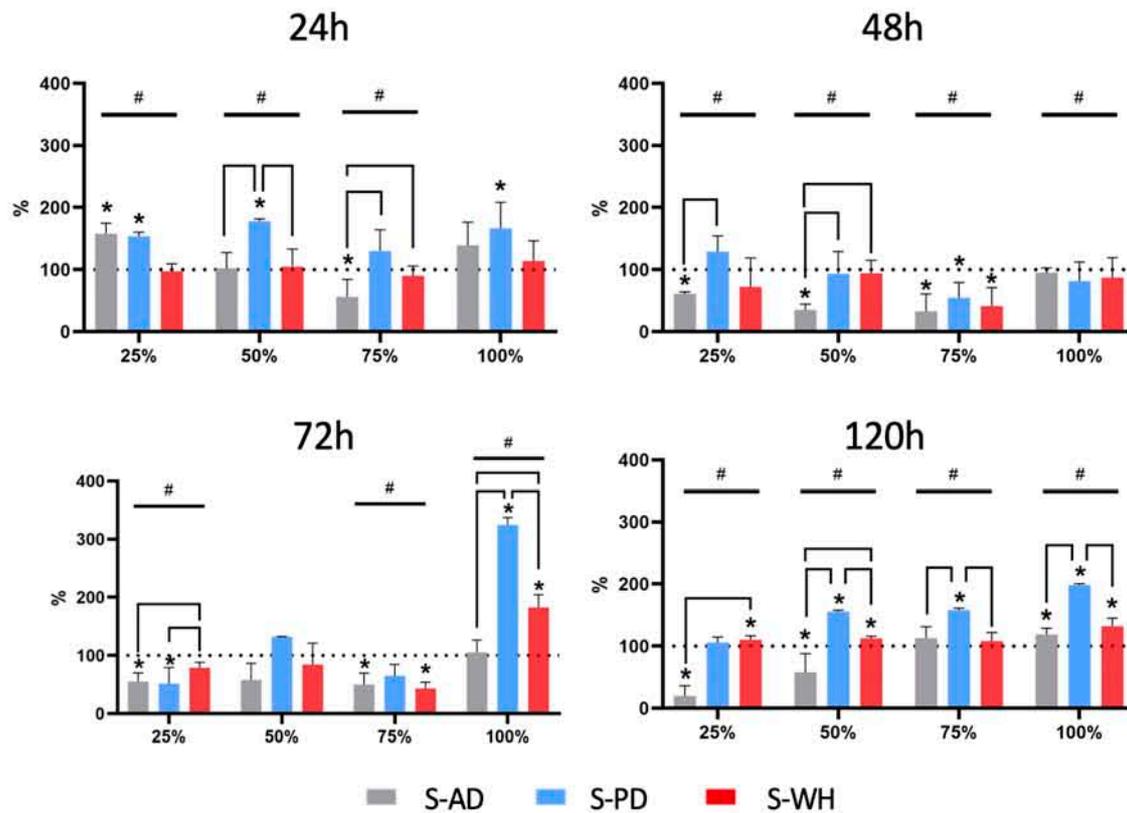
PROLIFERACIÓN		24 h	48 h	72 h	120 h
Cuantificación celular (Citometría de flujo)	25%	0.059	<b>0.034</b>	<b>0.005</b>	<b>0.002</b>
	50%	0.129	<b>0.003</b>	<b>0.016</b>	<b>0.002</b>
	75%	<b>0.002</b>	0.163	<b>0.047</b>	<b>0.004</b>
	100%	0.078	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>

**Tabla 6.** Valor de p del test de Kruskal-Wallis para proliferación medida mediante cuantificación celular (citometría de flujo). Significancia estadística resaltada en negrita.

Posteriormente, se analizó la proliferación celular con ensayos WST-1 (Figura 40 y Tabla 7). Los valores obtenidos confirmaron la tendencia hallada en las pruebas de citometría de flujo previamente descritas. Es decir, determinadas condiciones eran capaces de inducir proliferación celular en mayor medida en comparación con el propio medio de cultivo basal.

PROLIFERACIÓN		test WST-1			
		24 h	48 h	72 h	120 h
S-AD	25%	0.46±0.05	0.26±0.01	0.33±0.08	0.28±0.22
	50%	0.34±0.09	0.18±0.05	0.37±0.17	0.83±0.44
	75%	0.16±0.08	0.14±0.12	0.26±0.10	1.6±0.26
	100%	0.41±0.11	0.45±0.04	0.69±0.14	1.32±0.11
S-PD	25%	0.45±0.02	0.54±0.10	0.31±0.16	1.45±0.12
	50%	0.6±0.01	0.46±0.18	0.83±0.00	2.24±0.03
	75%	0.39±0.10	0.23±0.11	0.34±0.10	2.23±0.04
	100%	0.49±0.12	0.38±0.15	2.13±0.08	2.2±0.02
S-WH	25%	0.47±0.06	0.36±0.23	0.55±0.07	1.53±0.09
	50%	0.44±0.12	0.54±0.12	0.54±0.24	1.63±0.05
	75%	0.4±0.07	0.23±0.16	0.37±0.09	1.51±0.19
	100%	0.47±0.13	0.57±0.21	1.1±0.13	1.45±0.15
Control DMEM	25%	0.35±0.04	0.57±0.04	0.83±0.08	2.06±0.03
	50%	0.4±0.05	0.67±0.15	0.89±0.13	2.16±0.03
	75%	0.35±0.05	0.58±0.04	0.74±0.27	2.12±0.02
	100%	0.35±0.00	0.63±0.03	0.93±0.09	1.66±0.05
Control AMNIOMAX	25%	0.57±0.07	0.67±0.09	0.99±0.09	2.07±0.04
	50%	0.49±0.02	0.78±0.06	0.91±0.09	2.16±0.07
	75%	0.53±0.03	0.74±0.06	1.18±0.19	2.08±0.07
	100%	0.49±0.01	0.88±0.14	0.85±0.15	1.64±0.25

**Tabla 7.** Análisis de la proliferación celular determinada por el ensayo colorimétrico WST-1 tras la exposición a secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo (S-AD), a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental (S-PD) y a secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). CTR DMEM: Control para S-AD y S-PD. CTR AMNIO: Control Amniomax para S-WH. Resultados a distintas concentraciones de secretoma (100%, 75%, 50%, 25%) durante 24, 48, 72 y 120h. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar.



**Figura 40.** Proliferación celular mediante medición de la actividad WST-1. Los resultados se presentan mediante porcentajes de actividad metabólica tras la normalización respecto los controles (considerados 100%). Las barras de error corresponden a la desviación típica. Significancia estadística con el control (\*); significancia estadística entre grupos (corchetes); significancia estadística mediante test de Kruskal-Wallis (#). S-AD: secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo; S-PD a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental; S-WH: secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical.

En primer lugar, cuando las células epiteliales fueron expuestas a S-AD, se observó un aumento significativo de la actividad de WST-1 a concentraciones del 25% a las 24 h, y a concentraciones del 100% a las 120 h. Sin embargo, también se observó una disminución significativa en determinadas condiciones.

En segundo lugar, el cultivo celular en presencia de S-PD mostró diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular a con-

centraciones del 25%, 50% y 100% a las 24 h, a concentración del 100% a las 72 h y con concentraciones del 50%, 75% y 100% a las 120 h.

Finalmente, las células epiteliales cultivadas con S-WH mostraron un aumento significativo de la proliferación celular a concentración del 100% a las 72 h, y a concentraciones del 25%, 50% y 100% a las 120 h. Las pruebas de Kruskal-Wallis revelaron diferencias globales entre la mayoría de las condiciones experimentales (Tabla 8).

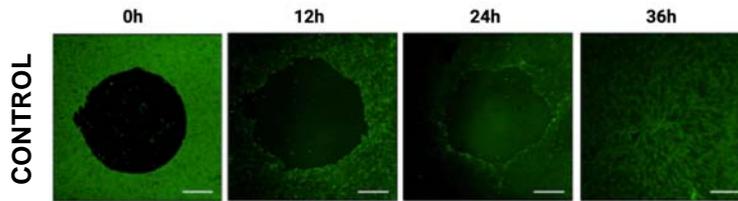
PROLIFERACIÓN		24 h	48 h	72 h	120 h
WST-1	25%	<b>0.034</b>	<b>0.022</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>
	50%	<b>0.008</b>	<b>0.026</b>	0.272	<b>0.002</b>
	75%	<b>0.007</b>	<b>0.004</b>	<b>0.008</b>	<b>0.021</b>
	100%	0.105	<b>0.042</b>	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>

**Tabla 8.** Valor de *p* del test de Kruskal-Wallis para proliferación celular medida mediante la mediación de la actividad WST-1. Significancia estadística resaltada en negrita.

Para concluir el estudio de la proliferación celular, se analizó la correlación entre los resultados de la citometría de flujo y la actividad del WST-1 hallándose que estos dos factores estaban positivamente correlacionados ( $r=0.432$ ;  $p<0.001$ ).

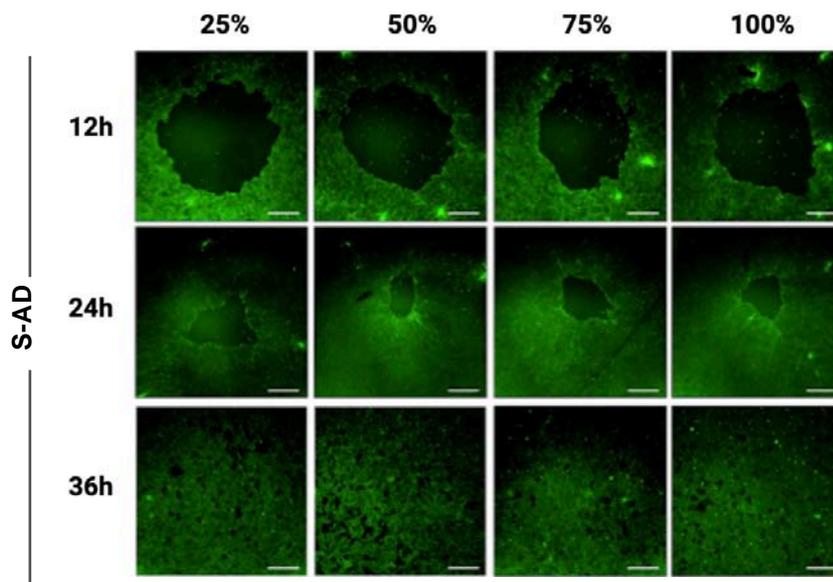
### 5.3.3. Prueba de reparación de heridas

Para determinar la capacidad de las células epiteliales de reparar un defecto tisular se realizó un análisis de cicatrización de heridas con medición cada 12 h hasta que la superficie de cultivo quedó completamente cubierta por células confluentes. Se estudió el efecto del secretoma de cada una de las fuentes analizadas en esta Tesis Doctoral (S-AD, S-PD y S-WH) en cada una de las cuatro concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%). Los resultados, con medio basal, mostraron que las células cultivadas tendían a proliferar y cubrir toda la superficie de cultivo después de 36 h (Figura 41).



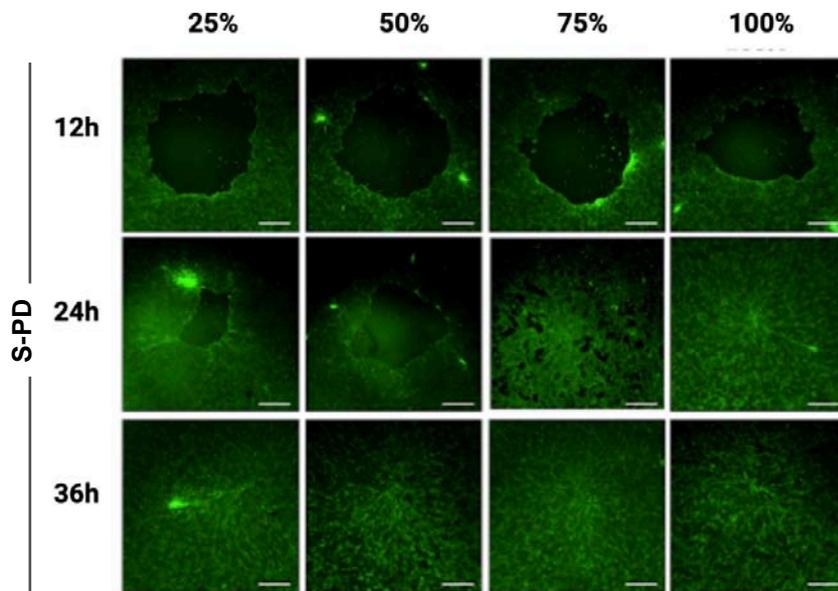
**Figura 41.** Prueba *in vitro* de reparación de heridas. Se aprecian células epiteliales cultivadas en medio basal (Controles) a tiempos de 0h, 12h, 24h y 36h. Barra de magnificación 100 $\mu$ m.

En el caso de las células epiteliales cultivadas en S-AD, el área libre de células tras el cultivo con concentraciones del 25%, 50% y 75% era similar a la observada en los controles después de 12 h. Sin embargo, las concentraciones del 100% de este tipo de secretoma se asociaron con una disminución significativa del área libre de células ( $p=0.0286$ ). Después de 24 h, un porcentaje considerable de la superficie de cultivo estaba cubierta por células en todas las concentraciones, siendo este efecto más apreciable a concentraciones altas. Además, tras 24h se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles para todas las concentraciones ( $p=0.0286$ ). A las 36 h, toda la superficie estaba cubierta por células, al igual que en los cultivos de control, no existiendo, por tanto, diferencias entre ellos (Figura 42).



**Figura 42.** Prueba de reparación de heridas *in vitro* tras la exposición a secretoma de células madre mesenquimales del tejido adiposo (S-AD). Se muestran imágenes a las 12h, 24h y 36h a concentraciones de secretoma de 25%, 50%, 75% y 100%. Barra de magnificación 100 $\mu$ m.

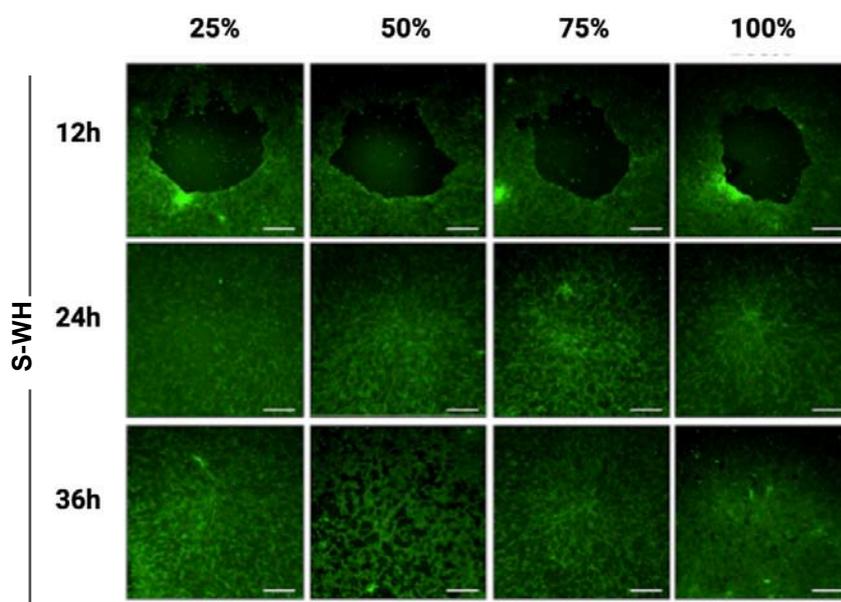
En segundo lugar, se estudiaron las células epiteliales cultivadas con S-PD. En este caso, tras 12 h de exposición se apreció que concentraciones de secretoma del 75% del 100% fueron capaces de inducir a las células a cubrir áreas de superficie mayores que los cultivos de control, con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0286$ ). A las 24 h, en concentraciones de secretoma del 25%, 75% y 100% se apreciaron reducciones significativas del espacio en comparación con los controles. Finalmente, a las 36 h todas las superficies estaban cubiertas de células, no apreciándose diferencias entre los cultivos con medio basal y los cultivos enriquecidos con secretoma (Figura 43).



**Figura 43.** Prueba de reparación de heridas in vitro tras la exposición a secretoma de células madre mesenquimales de la pulpa dental (S-PD). Se muestran imágenes a las 12h, 24h y 36h a concentraciones de secretoma de 25%, 50%, 75% y 100%. Barra de magnificación 100µm.

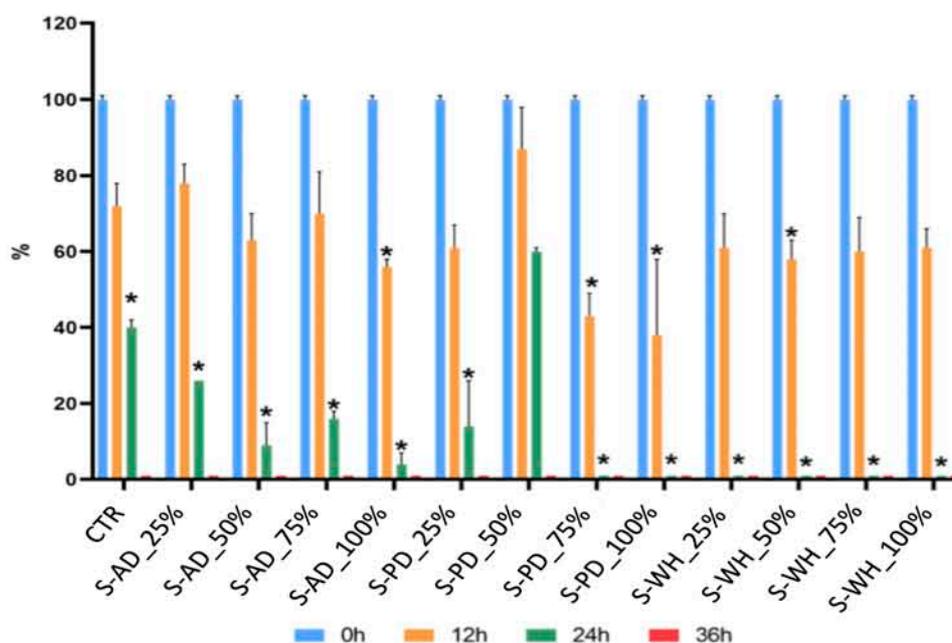
Por último, en referencia a las células epiteliales enriquecidas con S-WH, se apreció que tras 12 h existían diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles únicamente a concentración 50%. Sin embargo, las células cubrieron toda la superficie en todas las concentraciones después de 24 h con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles ( $p=0.0286$ ). Igualmente, tras 36

horas de seguimiento, todas las superficies de cultivo estaban ocupadas por células, tanto en los cultivos enriquecidos con secretoma como en aquellos en los que únicamente se utilizó el medio de cultivo basal (Figura 44).



**Figura 44.** Prueba de reparación de heridas *in vitro* tras la exposición a secretoma de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH). Se muestran imágenes a las 12h, 24h y 36h a concentraciones de secretoma de 25%, 50%, 75% y 100%. Barra de magnificación 100 $\mu$ m.

Se muestra, a continuación, en forma de histograma el área libre de células (Figura 45). Los valores se normalizaron tomando el valor 100 como el área en el momento 0, momento en que se retiró el tapón aportado por el *kit* comercial y se inició la migración celular.

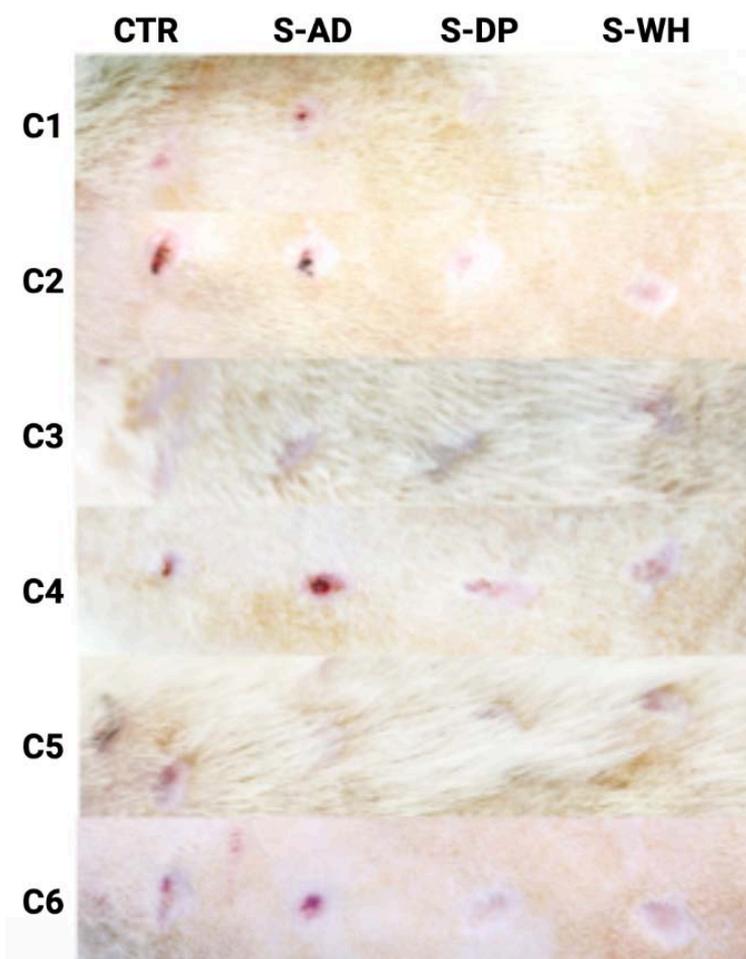


**Figura 45.** Resultados del análisis de la prueba de reparación de heridas *in vitro*. El histograma ilustra los resultados de la cuantificación de las áreas vacías en cada superficie de cultivo, normalizadas con respecto al área en el momento cero ( $t_0$ ). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles analizados en el mismo tiempo de seguimiento. Los porcentajes hacen referencia a la concentración de secretoma de cada tipo (25%, 50%, 75%, 100%). S-AD: secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo; S-PD a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental; S-WH: secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical.

#### 5.4. Análisis *in vivo* del efecto del secretoma de tejido adiposo (S-AD), de pulpa dental (S-PD) y de gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH).

Como se muestra en la Figura 46, el análisis de las heridas cutáneas tratadas con los distintos secretomas (S-AD, S-PD, S-WH) reveló algunas diferencias entre los grupos de estudio. La cuantificación del área de las lesiones cutáneas al final del periodo de seguimiento postquirúrgico mostró que el área media de las lesiones de control era de  $2.49 \pm 2.03 \text{ mm}^2$ . Sin embargo, el análisis de los defectos tratados con los diferentes secretomas mostró que el área media era de  $2.07 \pm 1.81 \text{ mm}^2$  para S-AD,  $0.26 \pm 0.30 \text{ mm}^2$  para S-PD y  $0.25 \pm 0.29 \text{ mm}^2$  para S-WH. Las diferencias con el control fueron no significativas para S-AD ( $p=0.8181$ ), mientras

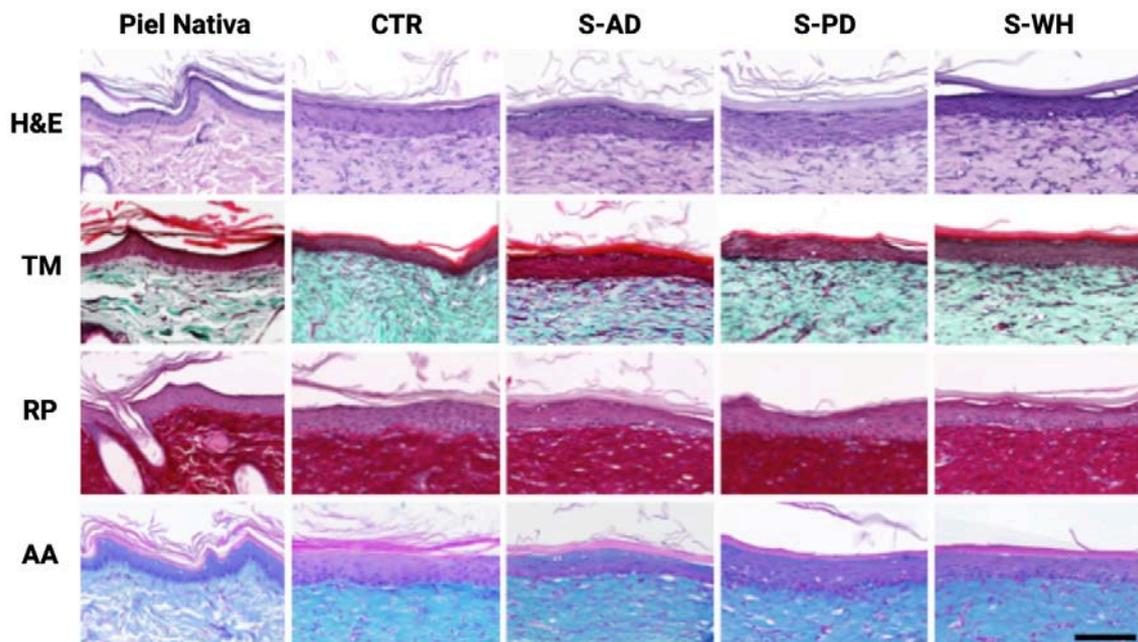
que el efecto del secretoma en la reparación de las heridas sí fue estadísticamente significativo al comparar S-DP y S-WH con el control ( $p=0.0259$  en ambos casos). Además, no se observaron efectos secundarios (necrosis, hemorragia, infección, tumorigénesis, etc.) tras el tratamiento con secretoma.



**Figura 46.** Análisis *in vivo* del efecto del secretoma de células madre mesenquimales del tejido adiposo (S-AD), de células madre mesenquimales de la pulpa dental (S-PD) y de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (S-WH) sobre ratas Wistar. Imágenes macroscópicas correspondientes a seis casos para cada condición experimental, tras cuatro semanas de seguimiento (C1 a C6). CTR: Control

Por otro lado, en referencia al análisis histológico de la piel tratada con las diferentes condiciones experimentales mostró muy pocas diferencias entre los grupos (Figura 47). En general, la epidermis encontrada en el

lugar de regeneración consistía en un epitelio estratificado que mostraba diferentes capas con signos de queratinización terminal en la capa más superficial, sin diferencias entre los grupos de estudio. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la presencia de fibras de colágeno y proteoglicanos en la dermis. En comparación con la piel nativa no lesionada del animal, la piel regenerada carecía de los anejos cutáneos típicos de la piel y la unión dermoepidérmica era más bien plana, sin las crestas epiteliales ni las papilas dérmicas de la piel normal. Ninguna de las muestras presentaba hallazgos patológicos como inflamación, transformación maligna u otras complicaciones.



**Figura 47.** Análisis histológico mediante hematoxilina-eosina (H&E), tinción de tricrómico de Masson (TM), rojo picrosirio (RP) y azul alcian (AA). La piel nativa corresponde a piel no lesionada mientras que el control corresponde a piel lesionada que no ha sido enriquecida con secretoma durante el proceso de epitelización. S-AD: secretoma procedente de células madre mesenquimales (CMM) del tejido adiposo; S-PD a secretoma procedente de CMM de la pulpa dental; S-WH: secretoma procedente de CMM de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. La barra de magnificación mostrada en la última imagen histológica se aplica a todas las imágenes histológicas y representa 100 $\mu$ m. CTR: Control



## **6. DISCUSIÓN**



La generación de sustitutos de piel artificial mediante Ingeniería Tisular es un desafío técnico y científico (254,258). La prevalencia de patologías que afectan a la piel, como el cáncer, las lesiones traumáticas o las infecciones conlleva la búsqueda de modelos mejorados de piel artificial capaces de contribuir al tratamiento de estas afecciones (259–262). En las últimas décadas se han descrito varias mejoras en los procedimientos de biofabricación de piel artificial incluyendo la utilización de modelos de piel basados en fibrina-agarosa, habiéndose comprobado que las características mecánicas son superiores a las dermis acelulares artificiales actualmente disponibles en el mercado así como similares a las características de la piel humana (263). Sin embargo, el tiempo necesario para obtener cultivos de células epiteliales humanas sigue siendo una de sus principales limitaciones. Esta demora en el tiempo de generación de la piel provoca un retraso terapéutico que, en el paciente con quemaduras de gran extensión, aumenta de manera considerable la morbilidad y la mortalidad. Por este motivo, existen líneas de investigación que pretenden acelerar este proceso de biofabricación de piel artificial. Una de ellas consiste en añadir factores de crecimiento a este proceso y uno de los productos con más potencial es el secretoma de las células madre mesenquimales (CMM), es decir, el conjunto de factores de crecimiento liberados por las CMM.

En la presente Tesis Doctoral se evalúa el potencial terapéutico del secretoma de CMM procedentes de diferentes tejidos. Las CMM fueron aisladas y caracterizadas de acuerdo a los criterios mínimos postulados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (130). El efecto de dichos secretomas fue estudiado sobre la viabilidad, la proliferación y la migración de las células epiteliales.

Como se ha descrito anteriormente, los secretomas de CMM contienen abundantes moléculas bioactivas con propiedades proliferativas e inmunomoduladoras, así como moléculas con capacidad para inducir vías an-

tiapoptóticas en múltiples tipos celulares (264,265). En el campo de la Ingeniería Tisular, el secretoma de las CMM se ha utilizado recientemente para inducir la proliferación, maduración y diferenciación de hueso, cartílago, dentina y mucosa (266–268). Sin embargo, su efecto sobre las células epiteliales ha sido mayoritariamente inexplorado (269). Además, hasta la fecha no ha sido comparado el efecto del secretoma derivado de diferentes fuentes celulares sobre las células epiteliales de la piel. En este sentido, identificar el secretoma con mayor potencial para la regeneración de la piel supondría un gran avance en la investigación para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Para ello, es necesario estudiar tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* cuál es la mejor fuente de CMM para obtener el secretoma.

En la presente Tesis Doctoral, se realizó un análisis proteico preliminar de cada tipo de secretoma. Los resultados sugirieron que los tres tipos de secretoma estudiados (S-AD, S-PD, S-WH) contienen varias proteínas que participan y optimizan los mecanismos de proliferación y metabolismo celular. En concreto, se observó que el S-PD contiene el mayor número de proteínas, seguido del S-WH y del S-AD. Sin embargo, la presencia de estas proteínas no es suficiente para demostrar el potencial de cada tipo de secretoma, por lo que es necesario realizar experimentos *in vitro* de viabilidad, proliferación y migración celular, así como experimentos *in vivo* para verificar los resultados. Es reseñable mencionar que la composición de los secretomas de una misma fuente presenta una variabilidad interpersonal e incluso intrapersonal en función del momento o de las características fisiopatológicas del individuo a partir del cual se obtienen las CMM de las cuales se aislará el secretoma (270).

Tal y como se ha comprobado, los secretomas expresan diferentes proteínas según la fuente de la cual provengan. Además, las proteínas que se expresan en todos los secretomas estudiados, presentan concentraciones diferentes en cada uno de ellos. Los resultados obtenidos de los

test de caracterización proteica sugirieron que el S-PD podría tener un potencial terapéutico superior en comparación con las otras fuentes consideradas (S-AD y S-WH). Asimismo, el análisis de los test de caracterización proteica, reveló la expresión de 5 proteínas comunes en los tres tipos de secretoma, todas ellas con funciones vinculadas con la proliferación celular.

La primera proteína común hallada fue la Serpina E1, una proteína capaz de estimular la migración de queratinocitos durante la reparación de lesiones cutáneas (271). En segundo y tercer lugar se encontraron las proteínas TIMP-1 y Trombospondina-1, ambas relacionadas con la diferenciación y la migración celular, actuando como factores de crecimiento (272,273). Asimismo, PTX3 participa en mecanismos de proliferación celular, principalmente en la próstata y riñón (274,275). Finalmente, la quinta proteína común en los tres tipos de secretoma estudiados fue la Serpina F1. Esta proteína participa en los mecanismos de proliferación de varios tipos celulares de la piel humana además de presentar un efecto antiangiogénico (276).

Otras proteínas que desempeñan un papel crucial en la viabilidad, la proliferación y la migración de las células también estaban presentes en algunos tipos específicos de secretomas, como por ejemplo, MMP-9, DPPIV, angiogenina, IL-8, MCP-1 y uPA, que se expresaban en el S-PD y en S-WH. Sorprendentemente, una de las proteínas que se expresaba con una concentración más reseñable en S-DP era el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF se ha asociado clásicamente a funciones angiogénicas y, de forma reciente, también se ha vinculado a la proliferación de queratinocitos, especialmente durante los procesos de reparación de heridas (277,278).

Una vez caracterizados los tres tipos de secretoma estudiados (S-AD, S-PD y S-WH), se evaluaron los efectos de los mismos sobre la viabilidad de células epiteliales mediante el ensayo LIVE/DEAD<sup>®</sup> y la cuantificación

del ADN libre. En conjunto, ambos experimentos mostraron resultados que permitieron establecer niveles altos de bioseguridad, dado que los cultivos celulares expuestos a los secretomas estaban libres de efectos deletéreos detectables. Incluso, se encontró que los diferentes tipos de secretoma mostraban un efecto positivo en la viabilidad celular, especialmente a tiempos largos. Los resultados del ensayo LIVE/DEAD<sup>®</sup> plantearon la posibilidad de mejorar la supervivencia celular mediante el uso de medios de cultivo enriquecidos con secretoma. Esta tendencia fue estadísticamente contrastada en los ensayos de cuantificación del ADN libre y se corroboró que la mayoría de condiciones en las que se utilizó S-WH y S-DP se asociaron a una mejora significativa de la viabilidad celular en comparación con los controles. Los resultados hallados concuerdan con trabajos anteriores que sugieren que los cultivos celulares enriquecidos con secretoma de CMM pueden aumentar la supervivencia y reducir la muerte celular *in vitro* e *in vivo* (279,280).

Una vez estudiada la viabilidad celular, se analizó la capacidad de cada tipo de secretoma (S-AD, S-PD y S-WH) de inducir la proliferación de las células epiteliales. Los resultados de la cuantificación mediante citometría de flujo mostraron que los tres tipos de secretoma fueron capaces de favorecer la proliferación celular, especialmente a tiempos de seguimiento largos (72 y 120 h). Sin embargo, aunque todos los secretomas consiguieron producir un elevado número de células, S-PD tendía a ser más eficaz que el S-AD y S-WH a las 72 h, mientras que el S-WH fue el más eficiente a las 120 h. Curiosamente, durante las primeras 24 h de exposición a los medios enriquecidos con secretoma, los datos de proliferación celular fueron poco reseñables, siendo en algunos casos similares a los controles. El hecho de que la proliferación celular no fuera claramente eficiente durante las primeras horas de exposición al secretoma puede deberse a que dicho efecto potenciador de la proliferación requiera varios días de exposición antes de ser totalmente efectivo (270). Este hallazgo

podría explicarse por el requerimiento de un periodo de adaptación celular tras la sustitución del medio convencional por el medio enriquecido con secretoma (281,282).

Con el objetivo de confirmar los hallazgos obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo, se cuantificó la proliferación celular determinando la actividad metabólica de las células con el ensayo WST-1. Los resultados mostraron que la capacidad de proliferación estaba aumentada en varios grupos, y que las células enriquecidas con S-PD tendían a mostrar una mayor actividad metabólica en comparación con las células que habían sido expuestas a S-AD y las S-WH. Este aumento en el potencial proliferativo atribuido al S-PD fue propuesto anteriormente por otros autores cuyos trabajos científicos sugirieron algunas aplicaciones terapéuticas del S-PD como la regeneración hepática (283) o la regeneración osteogénica y neurogénica (284).

El tercer estudio realizado a nivel *in vitro* en la presente Tesis Doctoral fue evaluar la capacidad de migración de las células epiteliales expuestas al secretoma. Los resultados mostraron que los controles requirieron hasta 36 h para migrar y cubrir completamente la superficie de cultivo expuesta. Sin embargo, los tres tipos de secretoma analizados (S-AD, S-PD y S-WH) mostraron un efecto positivo en la reducción del tiempo requerido para cubrir de manera completa la superficie libre de células. De hecho, son los S-WH y S-PD los que mostraron una mayor capacidad migratoria en comparación con S-AD. Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos en las pruebas de proliferación celular, sugiriendo que las células mesenquimales de la gelatina de Wharton y de la pulpa dental pueden ser fuentes de secretoma óptimas para la biofabricación de piel artificial.

Del mismo modo que en los test de proliferación y viabilidad los resultados son más evidentes a tiempos de 72 y 120 h, en la prueba de reparación de heridas los efectos del secretoma empiezan a hacerse evidentes

a partir de las 24 h, no siendo apreciables a las 12 h de seguimiento. Estos resultados ponen de relieve la necesidad de un tiempo de adaptación al nuevo medio, tal y como se observó en el resto de pruebas *in vitro*. Este hecho concuerda con estudios anteriores que apuntan a que los secretomas derivados de CMM de médula ósea y de tejido adiposo podrían mejorar la migración celular en ensayos de cicatrización de heridas tras 27 h de exposición al secretoma (285). Con estos hallazgos, se demuestra que el secretoma de CMM humanas mejora la cicatrización de heridas e induce la migración celular. Algunos autores han revelado efectos beneficiosos de la aplicación de secretoma de CMM sobre células epiteliales incluso en condiciones de hipoxia e inanición de suero (286).

La segunda parte del desarrollo experimental de la Tesis Doctoral consistió en corroborar los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro* en modelos animales. En primer lugar, se verificó que no existían efectos secundarios asociados al tratamiento, lo que sugiere la seguridad de los secretomas derivados de CMM a nivel *in vivo*. Estos datos se correlacionan con los resultados observados en las pruebas *in vitro* de viabilidad.

Tras comprobar la seguridad de la aplicación del secretoma en un modelo animal se evaluó el resultado sobre la velocidad de cicatrización de heridas. Así pues, los resultados de este análisis reflejaron un efecto positivo con respecto a la epitelización y la reparación de las heridas infligidas en el dorso de los animales, especialmente cuando se utilizó S-PD y S-WH. Además, los estudios histológicos apoyaron la hipótesis de que el uso de los diferentes secretomas estudiados en esta Tesis Doctoral es seguro para la piel tratada, ya que no se encontraron diferencias histológicas entre los controles y los defectos tratados con secretoma. Tanto la estructura histológica como la presencia de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular fueron similares en todos los grupos. En esta misma línea, trabajos anteriores han demostrado que las CMM podían tener propiedades antiinflamatorias y antifibróticas, de modo que,

podrían ser capaces de modular la síntesis de componentes de la matriz extracelular (287). A pesar de que estos resultados deberían confirmarse en una cohorte más amplia de animales, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que los secretomas de CMM podrían mejorar la regeneración de la piel y la cicatrización de las heridas *in vivo*, como se había sugerido anteriormente (288).

Parte de la importancia de esta Tesis Doctoral es que, hasta la fecha, pocos estudios publicados habían sido diseñados para comparar el efecto de diferentes tipos de secretoma sobre la proliferación celular y la reparación de heridas (289). Además, la mayoría de estos artículos se centran en la evaluación de los efectos del secretoma derivado de las CMM de la médula ósea. En la presente Tesis Doctoral se evalúan tres tipos de secretoma derivados de diferentes fuentes de CMM accesibles y de fácil obtención a partir de procedimientos de liposucción, extracciones de tercer molar o cordones umbilicales desechados después del parto. La obtención de CMM procedentes de estas fuentes de obtención contrasta con los aspirados medulares requeridos para la obtención de CMM de la médula ósea, un procedimiento de recolección invasivo que puede estar asociado a una morbilidad considerable (287,290).

Esta Tesis Doctoral, por tanto, aporta información comparativa importante en referencia a los distintos tipos de secretoma de CMM. De hecho, hasta la fecha, ningún trabajo ha analizado los efectos del secretoma de diferentes fuentes en función de la concentración y tampoco ha sido estudiado el efecto de los diferentes tipos de secretoma de CMM de manera multimodal integrando resultados de viabilidad, proliferación y migración celular. Los datos presentados sugieren una posible relación entre la concentración de secretoma aplicado y la proliferación celular de células epiteliales. Sin embargo, deben realizarse más estudios en el futuro para hallar la concentración óptima del mismo.

Por otro lado, los hallazgos revelan que los mejores datos de viabilidad, proliferación, migración y reparación de heridas se han obtenido con S-PD y S-WH, siendo estos secretomas los que presentan una mayor y más variada expresión proteica. Es importante mencionar que en la presente Tesis Doctoral se valora el efecto de los distintos tipos de secretoma de CMM sobre células epiteliales humanas, por lo que los resultados acerca de las fuentes con mayor potencial terapéutico son únicamente aplicables a la piel. Así pues, es plausible que en otros tejidos exista una fuente de secretoma con mayor potencial regenerativo. De modo que sería interesante analizar, en el futuro, si en otros tejidos el S-PD y el S-WH también son los secretomas con mayor potencial terapéutico.

En la misma línea, el hecho de que la eficiencia en la inducción fuera mayor con S-PD y S-WH que con S-AD puede estar relacionado con el origen indiferenciado de ambos tipos de CMM, que se originan muy pronto en el desarrollo embrionario (288,291–293). En comparación con el tejido adiposo, la médula ósea u otras fuentes adultas de CMM, se cree que la pulpa dental y el cordón umbilical contienen importantes precursores celulares que permanecen en un estado indiferenciado (294), y que tienen un amplio espectro de diferenciación (197,295). Los resultados apoyan el uso de secretoma de CMM para mejorar los protocolos de cultivo celular actualmente disponibles, siendo útiles para su aplicación en el campo de la Ingeniería Tisular, especialmente para la generación de piel artificial, pero también para otros órganos que requieran el cultivo de células epiteliales, por ejemplo, la córnea humana, la mucosa oral o el paladar.

Además de los aspectos positivos comentados, en la actualidad existen una serie de limitaciones respecto al uso de secretoma de CMM que deben ser mencionadas. En primer lugar, no se dispone de estudios a largo plazo que evalúen el efecto del secretoma sobre la piel. Algunos autores consideran que su uso podría presentar un riesgo neoplásico debido a la

gran cantidad y variedad de factores de crecimiento hallados en los mismos (296,297). Sin embargo, también existen trabajos que apuntan a que el secretoma de CMM podría tener un efecto protector debido al potencial inmunomodulador y antitumoral de algunas moléculas presentes el mismo (246–248).

Por otra parte, como se ha visto en las pruebas de expresión proteica y se ha puesto de manifiesto en la literatura (298), existe una heterogeneidad en la composición del secretoma según la fuente de obtención de las CMM por lo que es difícil extraer conclusiones generales de todos los secretomas. Por ejemplo, se ha visto que el secretoma de CMM procedentes del cérvix uterino presenta poca cantidad de factores involucrados en la progresión cancerígena y niveles altos de factores inhibidores de cáncer (298). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el efecto del secretoma depende de su origen y, por lo tanto, debería analizarse el potencial oncogénico o la capacidad oncoprotectora a medio y largo plazo de cada fuente de secretoma y para cada tejido de manera independiente.

A pesar de las ventajas y limitaciones ya mencionadas, existe otra gran ventaja en lo que se refiere al uso de secretomas de CMM. Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años ha tenido lugar un cambio de paradigma en relación al potencial regenerativo de las CMM. Actualmente se postula que dicho potencial, atribuido clásicamente a las células, se debe esencialmente al efecto paracrino de las biomoléculas secretadas por estas. En los últimos años se han desarrollado varias líneas de investigación que pretenden esclarecer y confirmar esta hipótesis, además de profundizar en los beneficios de las terapias acelulares (299).

Esencialmente, las terapias acelulares conllevan una serie de ventajas importantes desde un punto de vista técnico respecto a las terapias celulares en lo que se refiere a infraestructura, normativa, metodología de

trabajo en la fase de desarrollo preclínico y también en la fase de aplicación del producto (300). Además de estas ventajas técnicas, desde un punto de vista biológico, las terapias acelulares podrían minimizar el riesgo de transferencia de células con posibles mutaciones. Por otra parte, se ha visto que el tamaño de las biomoléculas que configuran el secretoma permite una circulación de las mismas con mayor facilidad por el organismo. Otra ventaja importante de las terapias acelulares es la posibilidad de utilizar el producto de manera alogénica debido a la escasa evidencia de rechazo inmunológico por parte del organismo receptor (301–303). Por lo tanto, se trata de terapias que podrían ser utilizadas en varios pacientes indistintamente de la fuente a partir de la cual se obtengan (304).

Dado que una parte esencial de esta Tesis Doctoral es la integración de la Ingeniería Tisular y la Cirugía Plástica Reparadora, es interesante profundizar en una de las más interesantes aplicaciones del secretoma y, quizás, en la que de manera más inmediata debería plantearse su aplicación clínica. El motivo de este salto es la inexistencia, en la actualidad, de un método alternativo adecuado para dar una respuesta terapéutica satisfactoria. Se trata del manejo de las quemaduras de gran extensión. El tratamiento actual de los pacientes que sufren quemaduras de gran extensión requiere de injertos de piel autóloga tras el desbridamiento de las quemaduras.

Existen formas para aumentar la superficie de cobertura de los injertos cutáneos, como por ejemplo, el mallado de los mismos. Según el tipo de mallador que se utilice, se realizarán unos orificios de un tamaño determinado y controlado en la piel para poder extenderlos y cubrir un espacio más grande. Sin embargo, cuando se trata de quemaduras en torno a 80-85% de superficie cutánea total o superiores, no se dispone de suficiente zona sana para obtener la piel necesaria para cubrir la zona cruenta secundaria al desbridamiento de la quemadura. Además, en es-

tos casos, técnicas como el mallado de la piel resultan también insuficientes. En este escenario, una de las técnicas utilizadas es el injerto de piel de cadáver, es decir, los aloinjertos de piel. Así pues, los aloinjertos aportan una cobertura transitoria mientras se recupera la zona sana y esta puede ser utilizada de nuevo para obtener injertos de piel del propio paciente. Los injertos de piel de cadáver permiten disponer de más tiempo para preparar una técnica definitiva, ya que estos acabarán siendo rechazados por el individuo receptor requiriéndose una cobertura autóloga.

Una de las estrategias novedosas para dar respuestas a quemaduras de gran extensión (>80%) es la utilización de piel artificial. El procedimiento consiste en obtener una biopsia de piel sana del paciente quemado y generar piel artificial a partir de los queratinocitos y los fibroblastos derivados de la misma (305,306). El principal problema que se plantea con esta técnica es el tiempo, ya que el proceso de biofabricación de la piel artificial requiere de aproximadamente cuatro semanas (307,308).

En la actualidad, según los recursos, el paciente y las habilidades de la Unidad de Quemados en la que se esté realizando el tratamiento, se optará por unas técnicas u otras. En general, se optará por tratamientos combinados cuyo factor limitante es la demora terapéutica y las complicaciones asociadas. Algunos ejemplos de estas complicaciones son las infecciones de las quemaduras debido a no disponer de una cobertura definitiva, los desajustes hidroelectrolíticos y hemodinámicos debido a la pérdida de las funciones de regulación atribuibles a la piel sana, o bien, las infecciones respiratorias o de tracto urinario consecuentes a los largos periodos de ingreso hospitalario (309–311). Por todo ello, el avance en líneas de investigación que reduzcan el tiempo de biofabricación de la piel artificial es esencial y permitiría reducir de manera importante la mortalidad y la morbilidad de los pacientes con quemaduras de gran extensión. Así pues, productos que permitan mejorar y acelerar el crecimiento

celular, especialmente en el caso de las células epiteliales, supondrían un avance significativo en esta línea.

Otro espacio en el que convergen la Ingeniería Tisular y la Cirugía Plástica Reparadora, aunque probablemente de manera menos inmediata, es en las reconstrucciones tisulares que generan una zona donante, es decir, una zona desprovista de tejido al haberse transferido el mismo a otra parte del cuerpo. Esta secuela suele ser liviana, resultando en una pequeña cicatriz o hiperpigmentación en el caso de las zonas donante de los injertos cutáneos. Sin embargo, en los casos en los que se requiere la utilización de colgajos musculares u óseos, pueden generarse complicaciones importantes como por ejemplo la debilidad muscular o el dolor crónico.

Además de las secuelas a medio y largo plazo comentadas, también existen una serie de complicaciones intraquirúrgicas atribuidas a las cirugías prolongadas o a los hematomas e infecciones de la zona donante (312–314). En este contexto, herramientas que eviten el requerimiento de una zona donante o permitan una más rápida recuperación de la misma, serán muy beneficiosas para los pacientes. La Ingeniería Tisular permite avanzar hasta ese escenario a partir de la generación de tejidos y órganos artificiales, o bien con herramientas como el secretoma de CMM que fomenta la viabilidad y la proliferación celular promoviendo una más rápida generación de tejido.

Además de mejorar el cultivo de células epiteliales en el procedimiento de biofabricación de tejidos artificiales, el secretoma de CMM puede tener aplicaciones en lesiones como las quemaduras superficiales que epitelizarán de manera espontánea o en el caso de cicatrices patológicas, ya que se ha visto que las biomoléculas contenidas en el mismo mejoran el trofismo cutáneo, reduciendo los tiempos de reparación y aumentando la calidad de la piel (315,316).

Por todo lo mencionado, los hallazgos de la presente Tesis Doctoral ponen de relieve el potencial terapéutico del secretoma procedente de las CMM y las ventajas de las terapias acelulares. Así pues, el secretoma de las CMM puede considerarse una herramienta terapéutica prometedora capaz de promover la reparación de heridas y de optimizar los procedimientos de generación de piel artificial.



## **7. CONCLUSIONES**



1. La aplicación de los métodos y técnicas desarrollados y optimizados en la presente Tesis Doctoral permitió el establecimiento de cultivos celulares primarios de células madre mesenquimales de la grasa, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental humana sin que se generasen alteraciones artefactuales significativas.
2. La aplicación de los métodos y técnicas desarrollados y optimizados en la presente Tesis Doctoral permitió el aislamiento y la purificación del secretoma de las células madre mesenquimales de la grasa, de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y de la pulpa dental humana, así como la determinación de su contenido proteico y las características del secretoma de cada tipo celular. Las proteínas pentraxina-3, serpin-E1, serpin-F1, TIMP-1 y trombospondina-1 fueron identificadas en todos los tipos de secretoma derivados de células madre mesenquimales, observándose un mayor espectro de diversificación proteica en los secretomas de la pulpa dental y la gelatina de Wharton.
3. La evaluación *in vitro* del efecto del secretoma de los tres tipos de células madre mesenquimales sobre la viabilidad de células epiteliales humanas pone de relieve la existencia de porcentajes de viabilidad superiores al 85% tras la utilización de la técnica LIVE/DEAD<sup>®</sup>, lo que sugiere que dichos secretomas pueden utilizarse potencialmente en los distintos protocolos de Ingeniería Tisular. La utilización de pruebas más sensibles como la liberación de ADN al medio de cultivo puso igualmente de relieve la existencia de diferencias significativas entre los efectos de los distintos tipos de secretoma, observándose un efecto directamente proporcional a la concentración de secretoma y un mayor efecto sobre la viabilidad celular del secretoma de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton .
4. La evaluación *in vitro* del efecto del secretoma de los tres tipos de células madre mesenquimales sobre la proliferación de las células epiteliales humanas tras la utilización de citometría de flujo y técnicas colo-

rimétricas de actividad metabólica WST-1, pone de relieve que el secretoma de los tres tipos de células mesenquimales constituye un potente inductor de la proliferación celular a las 72 horas de exposición, observándose un mayor efecto inductor en los secretomas de las células madre mesenquimales de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton.

5. La evaluación *in vitro* del efecto del secretoma de los tres tipos de células madre mesenquimales sobre la capacidad de migración de células epiteliales humanas y, por tanto, sobre la reparación de heridas, pone de relieve una reducción temporal en el recubrimiento completo de la superficie acelular en relación con el grupo control, observándose un mayor efecto migratorio del secretoma de las células madre mesenquimales de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton.
6. La evaluación *in vivo* del efecto del secretoma de los tres tipos de células madre mesenquimales sobre la reparación de heridas pone de relieve la existencia de un efecto reparador a nivel clínico y temporal. Dicha reparación resulta compatible con los patrones histológicos ortotípicos existentes a nivel de la epidermis y de los componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de la dermis. Los efectos del secretoma de las células madre mesenquimales de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton aceleran dicho proceso reparador en relación con el secretoma de las células madre de la grasa, por lo que podrían constituir potencialmente factores estimulantes para la generación de piel artificial en los protocolos de Ingeniería Tisular.
7. Los resultados generados en la presente Tesis Doctoral ponen de relieve, en consecuencia, que el secretoma de las células madre mesenquimales puede configurarse como una nueva terapia biológica capaz de potenciar la reparación de heridas a distintos niveles tisulares y constituir, además, un compuesto bioactivo multiproteico eficaz para la

generación de tejidos artificiales mediante protocolos de Ingeniería Tisular.

8. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral apuntan a que el secretoma de las células madre mesenquimales puede considerarse una terapia avanzada prometedora libre de células, capaz de mejorar la reparación de heridas y la regeneración celular. Además, parece desempeñar un papel importante en la mejora de los procedimientos de generación de piel artificial.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*. 2020; 160(2): 116–25.
2. Khavkin J, Ellis DAF. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011; 19(2): 229–34.
3. Médica A, Fernández González A, Manuel Lizana Moreno A, del Mar de Pablos Ramos M, Ruiz García A, Espinosa Ibáñez O, et al. Optimización del cultivo de queratinocitos humanos para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana: alternativas celulares como capa alimentadora. *Actual Medica*. 2016; 101(798): 85–94.
4. Montagna W. Comparative anatomy and physiology of the skin. *Arch Dermatol*. 1967; 96(4): 357–63.
5. Brohem CA, Da Silva Cardeal LB, Tiago M, Soengas MS, De Moraes Barros SB, Maria-Engler SS. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011; 24(1): 35–50.
6. Piotrowska A, Wierzbick J, Zmijewski MA. Vitamin D in the skin physiology and pathology. *Acta Biochim Pol*. 2016; 63(1): 17-29.
7. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*. 2006; 52(9): 24–37.
8. Kasiri MM, Beer L, Nemeč L, Gruber F, Pietkiewicz S, Haider T, et al. Dying blood mononuclear cell secretome exerts antimicrobial activity. *Eur J Clin Invest*. 2016; 46(10): 853–63.
9. White SD, Yager JA. Resident Dendritic Cells in the Epidermis: Langerhans Cells, Merkel Cells and Melanocytes. *Vet Dermatol*. 1995; 6(1): 1–8.
10. Nordlund JJ. The Melanocyte and the Epidermal Melanin Unit: An Expanded Concept. *Dermatol Clin*. 2007; 25(3): 271–81.

11. Park S, Matte-Martone C, Gonzalez DG, Lathrop EA, May DP, Pineda CM, et al. Skin-resident immune cells actively coordinate their distribution with epidermal cells during homeostasis. *Nat Cell Biol.* 2021; 23(5): 476–84.
12. Yousef H, Alhadj M, Sandeep S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls (Internet).* 2022
13. Watt FM. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol.* 1989; 1(6): 1107–15.
14. Zirra AM. The functional significance of the skin's stratum lucidum. *Morphol Embryol (Bucur).* 1976; 22(1): 9–12.
15. Frost JK. XI. Typical Functional Differentiation of Keratinizing Stratified Squamous Epithelium. 1986; 2: 153–64.
16. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther.* 2004; 17 Suppl 1(1): 6–15.
17. Suter MM, Schulze K, Bergman W, Welle M, Roosje P, Müller EJ. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol.* 2009; 20(5–6): 515–32.
18. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019; 234(4): 438–55.
19. Chan LS. Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci.* 1997; 2(4): 343–52.
20. Becerra MM. Biología de la zona de membrana basal. *Rev la Asoc Colomb Dermatología y Cirugía Dermatológica.* 2007; 15(2): 122–8.
21. Quain AM, Khardori NM. Nutrition in Wound Care Management: A Comprehensive Overview. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2015; 27(12): 327–35.

22. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest.* 2018; 128(1): 26–35.
23. Kloc M, Ghobrial RM, Wosik J, Lewicka A, Lewicki S, Kubiak JZ. Macrophage functions in wound healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019; 13(1): 99–109.
24. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.* 1997; 77(4): 1033–79.
25. Eble J. The extracellular matrix in health and disease. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(12): 1275–6.
26. Frances C, Robert L. Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin. *Int J Dermatol.* 1984; 23(3): 166–79.
27. Pérez-García LJ. Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermosifiliogr.* 2004; 95(7): 413–23.
28. Woodley DT. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatol Clin.* 2017; 35(1): 95–100.
29. Paul SP. Biodynamic excisional skin tension lines for surgical excisions: untangling the science. *Ann R Coll Surg Engl.* 2018; 100(4): 330–7.
30. Frayn KN, Karpe F. Regulation of human subcutaneous adipose tissue blood flow. *Int J Obes (Lond).* 2014; 38(8): 1019–26.
31. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9).
32. Park AM, Khan S, Rawnsley J. Hair Biology: Growth and Pigmentation. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018; 26(4): 415–24.

33. Van Neste D, Tobin DJ. Hair cycle and hair pigmentation: Dynamic interactions and changes associated with aging. *Micron*. 2004; 35(3): 193–200.
34. Buffoli B, Rinaldi F, Labanca M, Sorbellini E, Trink A, Guanziroli E, et al. The human hair: from anatomy to physiology. *Int J Dermatol*. 2014; 53(3): 331–41.
35. Yamamoto N, Nambu M, Azuma R, Kiyosawa T. Dermal neoformation during partial-thickness skin wound healing. *Ann Plast Surg*. 2006; 56(2): 182–5.
36. Davis SC, Mertz PM, Eaglstein WH. Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream. *J Surg Res*. 1990; 48(3): 245–8.
37. Thody AJ, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev*. 1989; 69(2): 383–416.
38. Dietrich J, Garreis F, Paulsen F. Pathophysiology of Meibomian Glands - An Overview. *Ocul Immunol Inflamm*. 2021; 29(4): 803–10.
39. Montagna W, Yun JS. The glands of Montgomery. *Br J Dermatol*. 1972; 86(2): 126–33.
40. Kobayashi T, Voisin B, Kim DY, Kennedy EA, Jo JH, Shih HY, et al. Homeostatic Control of Sebaceous Glands by Innate Lymphoid Cells Regulates Commensal Bacteria Equilibrium. *Cell*. 2019; 176(5): 982-997.e16.
41. Chen YL, Kuan WH, Liu CL. Comparative Study of the Composition of Sweat from Eccrine and Apocrine Sweat Glands during Exercise and in Heat. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(10): 3377
42. Grubbs H, Nassereddin A, Morrison M. Embryology, Hair. *StatPearls (Internet)*. 2022
43. Taylor NAS. Eccrine sweat glands. Adaptations to physical training

- and heat acclimation. *Sports Med.* 1986; 3(6): 387–97.
44. De Berker DAR, André J, Baran R. Nail biology and nail science. *Int J Cosmet Sci.* 2007; 29(4): 241–75.
  45. Baswan S, Kasting GB, Li SK, Wickett R, Adams B, Eurich S, et al. Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases. *Mycoses.* 2017; 60(5): 284–95.
  46. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg.* 1987; 40(2): 113–41.
  47. Morris SF, Tang M, Almutari K, Geddes C, Yang D. The anatomic basis of perforator flaps. *Clin Plast Surg.* 2010; 37(4): 553–70.
  48. Wikslund LK, Kaljusto ML, Amundsen VS, Kvernebo K. Microvascular remodeling following skin injury. *Microcirculation.* 2022; 00: e12755
  49. Cobo R, García-Mesa Y, Cárcaba L, Martín-Cruces J, Feito J, García-Suárez O, et al. Verification and characterisation of human digital Ruffini's sensory corpuscles. *J Anat.* 2021; 238(1):13–9.
  50. Neubarth NL, Emanuel AJ, Liu Y, Springel MW, Handler A, Zhang Q, et al. Meissner corpuscles and their spatially intermingled afferents underlie gentle touch perception. *Science.* 2020; 368(6497): eabb2751
  51. Meyer W, Neurand K. The demonstration of Krause end bulbs (Paciform corpuscles) in the hairy skin of the pig. *Anat Histol Embryol.* 1982; 11(3): 283–8.
  52. Quondamatteo F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? *Cell Tissue Res.* 2014; 355(1): 1–21.
  53. Dehal A, Patel S, Kim S, Shapera E, Hussain F. Cutaneous

- Metastasis of Rectal Cancer: A Case Report and Literature Review. Perm J. 2016; 20(1): 74–8.
54. Moffarah AS, Al Mohajer M, Hurwitz BL, Armstrong DG. Skin and Soft Tissue Infections. Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang Y-W, editors. Microbiol Spectr. 2016; 4(4): 1-16
55. Olivera ALM, Blasco PB, Enríquez GS, Cantero AG. Dermatitis eritematoescamosas. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2022; 13(48): 2810–7.
56. Brady SP. Parakeratosis. J Am Acad Dermatol. 2004; 50(1): 77–84.
57. Sticherling M, Erfurt-Berge C. Autoimmune blistering diseases of the skin. Autoimmun Rev. 2012; 11(3): 226–30.
58. Yamamoto T. Psoriasis and Connective Tissue Diseases. Int J Mol Sci. 2020; 21(16): 5803.
59. Stölzel U, Doss MO, Schuppan D. Clinical Guide and Update on Porphyrias. Gastroenterology. 2019; 157(2): 365-381.e4.
60. van Waateringe RP, Fokkens BT, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostaptchouk JV, Graaff R, et al. Skin autofluorescence predicts incident type 2 diabetes, cardiovascular disease and mortality in the general population. Diabetologia. 2019; 62(2): 269–80.
61. Wick MR. Panniculitis: A summary. Seminars in Diagnostic Pathology. 2017; 34(3): 261-272.
62. Shavit E, Alavi A, Sibbald RG. Vasculitis - What do we have to know? A review of literature. Int J Low Extrem Wounds. 2018; 17(4): 218-226.
63. Alessandrini A, Bruni F, Piraccini BM, Starace M. Common causes of hair loss - clinical manifestations, trichoscopy and therapy. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021; 35(3): 629–40.

64. Koeppel M-C, Andrac-Meyer L. Tumores benignos de los tejidos blandos de la piel. *EMC - Dermatología*. 2006; 40(4): 1–21.
65. Rodríguez Caravaca G, García-Cruces Méndez J, Hobson S, Rodríguez Caravaca F, Villar Del Campo M, González Mosquera M. Validez del diagnóstico clínico de carcinoma basocelular en atención primaria. *Aten Primaria*. 2001; 28(6): 391.
66. Lee EH, Nehal KS, Disa JJ. Benign and premalignant skin lesions. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 125(5): 188e-198e.
67. Gutzmer R, Wiegand S, Kölbl O, Wermker K, Heppt M, Berking C. Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2019; 116(37): 616-626.
68. Kontogeorgakos VA, Eward WC, Brigman BE. Microsurgery in musculoskeletal oncology. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2019; 29(2): 271–8.
69. Mahajan RK, Srinivasan K, Singh M, Jain A, Kapadia T, Tambotra A. Management of Post-Traumatic Composite Bone and Soft Tissue Defect of Leg. *Indian J Plast Surg*. 2019; 52(1): 45–54.
70. Lee A. Skin manifestations of systemic disease. *Aust Fam Physician*. 2009; 38(7): 498-505.
71. Robles-Mendez JC, Vazquez-Martinez O, Ocampo-Candiani J. Skin manifestations of chronic kidney disease. *Actas Dermosifiliogr*. 2015; 106(8): 609–22.
72. Zaba LC, Fiorentino DF. Skin disease in dermatomyositis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012; 24(6): 597–601.
73. Horton WB, Boler PL, Subauste AR. Diabetes Mellitus and the Skin: Recognition and Management of Cutaneous Manifestations. *South Med J*. 2016; 109(10): 636–46.
74. da Costa REAR, Dos Reis CA, Moura R de D, Araújo ALN, de

- Oliveira FTR, Vieira SC. Cutaneous metastasis of occult breast cancer: a case report. *Pan Afr Med J.* 2021; 40: 23
75. Clebak KT, Malone MA. Skin Infections. *Prim Care.* 2018; 45(3): 433–54.
76. Panthagani AP, Tidman MJ. Diagnosis directs treatment in fungal infections of the skin. *Practitioner.* 2015; 259(1786): 25–9.
77. Stulberg DL, Penrod MA, Blatny RA. Common bacterial skin infections. *Am Fam Physician.* 2002; 66(1): 119–24.
78. Ramdass P, Mullick S, Farber HF. Viral Skin Diseases. *Prim Care.* 2015; 42(4): 517–67.
79. Elmetts CA, Lim HW, Stoff B, Connor C, Cordoro KM, Lebwohl M, et al. Joint American Academy of Dermatology-National Psoriasis Foundation guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with phototherapy. *J Am Acad Dermatol.* 2019; 81(3): 775–804.
80. Micheletti RG, Pagnoux C. Management of cutaneous vasculitis. *Presse Med.* 2020; 49(3): 104033.
81. Mitchell KM, Beck DE. Hidradenitis suppurativa. *Surg Clin North Am.* 2002; 82(6): 1187–97.
82. Stevens J, Khetarpal S. Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: A review of the literature and proposed treatment protocol. *Int J women's dermatology.* 2018; 5(1): 46–51.
83. Kumar AR, Ishii LE. Hair Transplantation for Scarring Alopecia. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2020; 28(2): 177–9.
84. Jimenez F, Alam M, Vogel JE, Avram M. Hair transplantation: Basic overview. *J Am Acad Dermatol.* 2021; 85(4): 803–14.
85. Luba MC, Bangs SA, Mohler AM, Stulberg DL. Common benign

- skin tumors. *Am Fam Physician*. 2003; 67(4): 729–38.
86. Linares MA, Zakaria A, Nizran P. Skin Cancer. *Prim Care*. 2015; 42(4): 645–59.
87. Brandt MG, Moore CC. Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2019; 27(1): 1–13.
88. Bennett J. Aspects of the history of plastic surgery since the 16th century. *J R Soc Med*. 1983; 76(2): 152–6.
89. Tomba P, Viganò A, Ruggieri P, Gasbarrini A. Gaspare Tagliacozzi, pioneer of plastic surgery and the spread of his technique throughout Europe in “De Curtorum Chirurgia per Insitionem.” *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18(4): 445–50.
90. Pierce GW, Klabunde EH, Brobst HT. Surgical reconstruction of large lip losses . *Plast Reconstr Surg*. 1946; 9(1): 68–82.
91. Historia de la Cirugía Plástica (A partir del Siglo XIX). *Rev. argent. cir. plást*. 1996; 2(2): 130-6.
92. van de Graaf R. Some remarks on the revival of rhinoplasty in Europe in the early nineteenth century . *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2009; 29(4): 226–7.
93. Al-Benna S, Bruce-Chwatt A, Gohritz A. The origins of modern plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2020; 73(11): 2086–102.
94. Mazzola RF, Kon M. EURAPS at 20 years. A brief history of European Plastic Surgery from the Société Européenne de Chirurgie Structive to the European Association of Plastic Surgeons (EURAPS). *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010; 63(6): 888–95.
95. Pećanac M. Development of Plastic Surgery. *Med Pregl*. 2015; 68(5–6): 199–204.

96. Qué es la Cirugía Plástica [Internet]. Sociedad Española de Cirugía Plástica (SECPRE). Disponible en: [secpres.org](http://secpres.org)
97. Ministerio de Sanidad y Política Social. Orden SAS/1257/2010, de 7 de mayo, por la que se aprueba y publica el programa formativo de la especialidad de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora. 2010: 42857–74.
98. Özkan Ö, Özgentas HE, Islamoglu K, Boztug N, Bigat Z, Dikici MB. Experiences with microsurgical tissue transfers in elderly patients. *Microsurgery*. 2005; 25(5): 390–5.
99. Lin PY, Cabrera R, Chew KY, Kuo YR. The outcome of free tissue transfers in patients with hematological diseases: 20-year experiences in single microsurgical center. *Microsurgery*. 2014; 34(7): 505–10.
100. Asuku M, Yu TC, Yan Q, Böing E, Hahn H, Hovland S, et al. Split-thickness skin graft donor-site morbidity: A systematic literature review. *Burns*. 2021; 47(7): 1525–46.
101. Lee KT, Mun GH. A systematic review of functional donor-site morbidity after latissimus dorsi muscle transfer. *Plast Reconstr Surg*. 2014; 134(2): 303–14.
102. Riccio M, Zingaretti N, Verdini F, Marchesini A, De Francesco F, Parodi PC. Functional donor-site morbidity after soleus muscle-flap procedure in the treatment of lower limb severe injuries. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2019; 51(6): 453–63.
103. Siegwart LC, Bolbos A, Tapking C, Seide SE, Diehm Y, Fischer S, et al. Safety and donor site morbidity of the transverse musculocutaneous gracilis (TMG) flap in autologous breast reconstruction-A systematic review and meta-analysis. *J Surg Oncol*. 2021; 124(4): 492–509.

104. Khan AA, Khan IM, Nguyen PP, Lo E, Chahadeh H, Cerniglia M, et al. Skin Graft Techniques. *Clin Podiatr Med Surg.* 2020; 37(4): 821–35.
105. Lee RG, Baskin JZ. Improving outcomes of locoregional flaps: an emphasis on anatomy and basic science. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 14(4): 260–4.
106. Khan AA, Khan IM, Nguyen PP, Lo E, Chahadeh H, Cerniglia M, et al. Skin Graft Techniques. *Clin Podiatr Med Surg.* 2020; 37(4): 821–35.
107. Fowler A, Dempsey A. Split-thickness skin graft donor sites. *J Wound Care.* 1998; 7(8): 399–402.
108. Guogiene I, Kievišas M, Grigaitė A, Braziulis K, Rimdeika R. Split-thickness skin grafting: early outcomes of a clinical trial using different graft thickness. *J Wound Care.* 2018; 27(1): 5–13.
109. Kania K, Chang DK, Abu-Ghname A, Reece EM, Chu CK, Maricevich M, et al. Microsurgery Training in Plastic Surgery. *Plast Reconstr surgery Glob open.* 2020; 8(7): e2898
110. Fujii M, Terashi H. Angiosome and Tissue Healing. *Ann Vasc Dis.* 2019; 12(2): 147–50.
111. Gohritz A, Osinga R, Haumer A, Schaefer DJ. Microsurgical Reconstruction of the Lower Extremity in the Elderly. *Clin Plast Surg.* 2021; 48(2): 331–40.
112. Wei FC, Jain V, Celik N, Chen HC, Chuang DCC, Lin CH. Have we found an ideal soft-tissue flap? An experience with 672 anterolateral thigh flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109(7): 2219–26.
113. Masia J, Olivares L, Koshima I, Teo TC, Suominen S, Van Landuyt K, et al. Barcelona consensus on supermicrosurgery. *J Reconstr Microsurg.* 2014; 30(1): 53–8.

114. Hong JP, Pak CJ, Suh HP. Supermicrosurgery in Lower Extremity Reconstruction. *Clin Plast Surg.* 2021; 48(2): 299–306.
115. Gómez Díaz OJ, Parra Carreño A. Evolución de la Cirugía Plástica en España (1953/2030). *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana.* 2020; 46(3): 349–60.
116. Gao J, Yu X, Wang X, He Y, Ding J. Biomaterial–Related Cell Microenvironment in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Engineering.* 2022; 13: 31-45
117. Heineken FG, Skalak R. Tissue Engineering: A Brief Overview. *J Biomech Eng.* 1991; 113(2): 111–2.
118. 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.
119. Shafiee A, Atala A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu Rev Med.* 2017; 68: 29–40.
120. Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *J Med Life.* 2019; 12(3): 225–9.
121. Ross LM. The Cell. *Clin Symp.* 1973; 25(4): 4–35.
122. Venkei ZG, Yamashita YM. Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *J Cell Biol.* 2018; 217(11): 3785–95.
123. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663–76.
124. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev.* 2009; 30(3): 204–13.

125. de Kretser D. Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. *J Law Med.* 2007; 15(2): 212–8.
126. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran.* 2017; 55(1): 6–23.
127. Bradley A. Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1990; 2(6): 1013–7.
128. Sensebé L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation.* 2009; 87(9Suppl): S49-53
129. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9(5): 641–50.
130. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315–7.
131. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 2004; 18(9): 980–2.
132. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011; 20(1): 5–14.
133. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(13): 2345–60.
134. Chen Y, Yu Q, Hu Y, Shi Y. Current Research and Use of Mesenchymal Stem Cells in the Therapy of Autoimmune Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019; 14(7): 579–82.
135. Lin W, Huang L, Li Y, Fang B, Li G, Chen L, et al. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities.

- Biomed Res Int. 2019; 2019: 2820853
136. Naderi-Meshkin H, Bahrami AR, Bidkhorri HR, Mirahmadi M, Ahmadiankia N. Strategies to improve homing of mesenchymal stem cells for greater efficacy in stem cell therapy. *Cell Biol Int.* 2015; 39(1): 23–34.
  137. Yuan M, Hu X, Yao L, Jiang Y, Li L. Mesenchymal stem cell homing to improve therapeutic efficacy in liver disease. *Stem Cell Res Ther.* 2022; 13(1): 179.
  138. Gnecci M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Methods Mol Biol.* 2016; 1416: 123–46.
  139. Huang B, Qian J, Ma J, Huang Z, Shen Y, Chen X, et al. Myocardial transfection of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and co-transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5(1): 22.
  140. L. PK, Kandoi S, Misra R, S. V, K. R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46:1–9.
  141. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(9): 1852.
  142. Teixeira F, Salgado A. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges. *Neural Regen Res.* 2020; 15(1): 75–7.
  143. Kamplleitner C, Obi J, Vassilev N, Epstein MM, Hoffmann O. Biological Compatibility Profile on Biomaterials for Bone

- Regeneration. *J Vis Exp.* 2018; 2018(141): e58077.
144. Zor F, Selek FN, Orlando G, Williams DF. Biocompatibility in regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 2019; 14(20): 2763–75.
  145. Lekic N, Dodds SD. Suture Materials, Needles, and Methods of Skin Closure: What Every Hand Surgeon Should Know. *J Hand Surg Am.* 2022; 47(2): 160-171.e1.
  146. Liu Y, Nelson T, Chakroff J, Cromeens B, Johnson J, Lannutti J, et al. Comparison of polyglycolic acid, polycaprolactone, and collagen as scaffolds for the production of tissue engineered intestine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019; 107(3): 750–60.
  147. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Chato-Astrain J, Sánchez-Porras D, García-García ÓD, Carmona R, et al. Evaluation of Fibrin-Agarose Tissue-Like Hydrogels Biocompatibility for Tissue Engineering Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 596.
  148. Alaminos M, Sánchez-Quevedo MDC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(8): 3311–7.
  149. Carriel V, Garzón I, Jiménez JM, Oliveira ACX, 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.
  150. Garzón I, Miyake J, González-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sánchez-Quevedo M del C, et al. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2(8): 625–32.
  151. Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, Oyonarte S, Bermejo-Casares F,

- España-López A, Fernández-Valadés R, et al. Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential. *J Periodontal Res.* 2021; 56(6): 1116–31.
152. Bouhadir KH, Mooney DJ. In vitro and in vivo models for the reconstruction of intercellular signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 842: 188–94.
153. Giannobile W V. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone.* 1996; 19(1Suppl): S23–37.
154. Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy.* 2016; 18(1): 13–24.
155. Gallina C, Turinetti V, Giachino C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 765846.
156. Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006; 20(6): 661–9.
157. Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC, Cervio E, Calvillo L, Copes F, et al. Conditioned Medium From Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells Limits Infarct Size and Enhances Angiogenesis. *Stem Cells Transl Med.* 2015; 4(5): 448–58.
158. Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 2008; 26(8): 2075–82.
159. Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C.

- Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Physiol.* 2005; 289(1): F31–42.
160. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res.* 2003; 73(6): 778–86.
161. Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res.* 2010; 88(5): 1017–25.
162. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 965849
163. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol.* 2013; 91(1): 19–26.
164. MW K, CH W. Mesenchymal stem cells in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in experimental animal models. *World J Stem Cells.* 2015; 7(3): 556.
165. Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, Imberti B, et al. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells.* 2010; 28(3): 513–22.
166. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Nahmias Y, Goldwasser Y, Kitagawa Y, et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1. *Mol Ther.* 2010; 18(10): 1857–64.
167. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al.

- Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2004; 94(5): 678–85.
168. Gao F, He T, Wang HB, Yu SQ, Yi DH, Liu WY, et al. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. *Can J Cardiol.* 2007; 23(11): 891–8.
169. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(6): H2670-6
170. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007; 48(1): 15–24.
171. Tonnesen MG, Feng X, Clark RAF. Angiogenesis in wound healing. *J Investig dermatology Symp Proc.* 2000; 5(1): 40–6.
172. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49(1): 35–43.
173. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int.* 2010; 203(1–3): 93–8.
174. Beers EH. Palliative Wound Care: Less Is More. *Surg Clin North Am.* 2019; 99(5): 899–919.
175. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007; 25(10): 2648–59.

176. Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3): 606.
177. Carriquiry C, Gutiérrez D. Puesta al día Puesta al día Cicatrices hipertróficas y queloides. *Tendencias en Medicina.* 2017; 51: 140–8.
178. Liu J, Ren J, Su L, Cheng S, Zhou J, Ye X, et al. Human adipose tissue-derived stem cells inhibit the activity of keloid fibroblasts and fibrosis in a keloid model by paracrine signaling. *Burns.* 2018; 44(2): 370–85.
179. Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Mol Ther.* 2018; 26(2): 606–17.
180. Baez-Jurado E, Hidalgo-Lanussa O, Barrera-Bailón B, Sahebkar A, Ashraf GM, Echeverria V, et al. Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Protective Effects on Brain Pathologies. *Mol Neurobiol.* 2019; 56(10): 6902–27.
181. Rhatomy S, Pawitan JA, Kurniawati T, Fiolin J, Dilogo IH. Allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium (secretome) for treating posterior cruciate ligament rupture: a prospective single-arm study. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2022.
182. Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V. Dental Pulp Stem Cell-Derived Conditioned Medium: An Attractive Alternative for Regenerative Therapy. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019; 25(1): 78–88.
183. Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Mol Ther.* 2018; 26(2): 606–17.
184. Ribeiro CA, Fraga JS, Grãos M, Neves NM, Reis RL, Gimble JM, et

- al. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem Cell Res Ther.* 2012; 3(3): 18.
185. Samaeekia R, Rabiee B, Putra I, Shen X, Park YJ, Hematti P, et al. Effect of Human Corneal Mesenchymal Stromal Cell-derived Exosomes on Corneal Epithelial Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018; 59(12): 5194–200.
186. Caseiro AR, Pedrosa SS, Ivanova G, Branquinho MV, Almeida A, Faria F, et al. Mesenchymal Stem/ Stromal Cells metabolomic and bioactive factors profiles: A comparative analysis on the umbilical cord and dental pulp derived Stem/ Stromal Cells secretome. *PLoS One.* 2019; 14(11): e0221378.
187. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2548–56.
188. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus M V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* 2018; 27(1): 68–83.
189. Strong AL, Cederna PS, Rubin JP, Coleman SR, Levi B. The Current State of Fat Grafting: A Review of Harvesting, Processing, and Injection Techniques. *Plast Reconstr Surg.* 2015; 136(4): 897–912.
190. Pamphilon D, Selogie E, Mckenna D, Cancelas-Peres JA, Szczepiorkowski ZM, Sacher R, et al. Current practices and prospects for standardization of the hematopoietic colony-forming unit assay: a report by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Cytotherapy.* 2013; 15(3): 255–62.
191. Miana VV, Prieto González EA. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience.* 2018; 12: 822.

192. J. Braga Osorio Gomes Salgado A, L. Goncalves Reis R, Jorge Carvalho Sousa N, M. Gimble J, J. Salgado A, L. Reis R, et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010; 5(2): 103–10.
193. Erland Linde L, Rasmussen S, Kessler J, Ebbing C. Extreme umbilical cord lengths, cord knot and entanglement: Risk factors and risk of adverse outcomes, a population-based study. *PLoS One.* 2018; 13(3): e0194814.
194. Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 144(Suppl1): S108-13.
195. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, et al. Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran.* 2018; 56(1): 28–33.
196. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 236.
197. Garzon I, Chato-Astrain J, Campos F, Fernandez-Valades R, Sanchez-Montesinos I, Campos A, et al. Expanded Differentiation Capability of Human Wharton's Jelly Stem Cells Toward Pluripotency: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2020; 26(4): 301–12.
198. Shin S, Lee J, Kwon Y, Park KS, Jeong JH, Choi SJ, et al. Comparative Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells Secretome from Adipose, Bone Marrow, Placenta and Wharton's Jelly. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(2): 1–17.
199. Yu C, Abbott P V. An overview of the dental pulp: its functions and

- responses to injury. *Aust Dent J.* 2007; 52(1 Suppl): S4–6.
200. Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* 2018; 6: 2.
201. Tang X, Fan L, Pei M, Zeng L, Ge Z. Evolving concepts of chondrogenic differentiation: history, state-of-the-art and future perspectives. *Eur Cell Mater.* 2015; 30: 12–27.
202. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(1): 55–71.
203. Bousnaki M, Bakopoulou A, Pich A, Papachristou E, Kritis A, Koidis P. Mapping the Secretome of Dental Pulp Stem Cells Under Variable Microenvironmental Conditions. *Stem cell Rev reports.* 2022; 18(4): 1372–407.
204. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(3): 170–81.
205. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12): 1974.
206. Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE. Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective. *Molecules.* 2021; 26(9). 2518.
207. Smit FE, Dohmen PM. Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now? *Med Sci Monit Basic Res.* 2015; 21: 1–3.
208. Simaioforidis V, De Jonge P, Sloff M, Oosterwijk E, Geutjes P, Feitz WFJ. Ureteral tissue engineering: where are we and how to proceed? *Tissue Eng Part B Rev.* 2013; 19(5): 413–9.

209. Berman B, Maderal A, Raphael B. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatol Surg.* 2017; 43(Suppl1): S3–18.
210. Wainwright DJ, Bury SB. Acellular dermal matrix in the management of the burn patient. *Aesthetic Surg J.* 2011; 31(Suppl7): 13S-23S.
211. Lai C, Song G, Zhao B, Wang H, Pan B, Guo X, et al. Preparation and characterization of human scar acellular dermal matrix. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019; 30(9): 769–84.
212. O’Connell B, Wragg NM, Wilson SL. The use of PRP injections in the management of knee osteoarthritis. *Cell Tissue Res.* 2019; 376(2): 143–52.
213. Li F, Guo W, Li K, Yu M, Tang W, Wang H, et al. Improved fat graft survival by different volume fractions of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells. *Aesthetic Surg J.* 2015; 35(3): 319–33.
214. Schoenberg E, O’Connor M, Wang J V., Yang S, Saedi N. Microneedling and PRP for acne scars: A new tool in our arsenal. *J Cosmet Dermatol.* 2020; 19(1): 112–4.
215. Smith DJ, Thomson PD, Garner WL, Rodriguez JL. Donor site repair. *Am J Surg.* 1994; 167(1A): 49S-51S.
216. Cuomo R, Grimaldi L, Cesare B, Nisi G, D’Aniello C. Skin graft donor site: a procedure for a faster healing. *Acta Biomed.* 2017; 88(3): 310–4.
217. Goverman J, Kraft CT, Fagan S, Levi B. Back Grafting the Split-Thickness Skin Graft Donor Site. *J Burn Care Res.* 2017; 38(1): e443–9.
218. Earle SA, Marshall DM. Management of giant congenital nevi with artificial skin substitutes in children. *J Craniofac Surg.* 2005; 16(5):

- 904–7.
219. Schulz IT, Tompkins RG, Burke JF. Artificial skin. *Annu Rev Med.* 2000; 51: 231–44.
220. Tzeng Y-S, Chen S-G, Dai N-T, Fu J-P, Chang S-C, Deng S-C, et al. Clinical experience using cadaveric skin for wound closure in taiwan. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2012; 24(10): 293–8.
221. Stegeman SA, van Doorn LP, Calame JJ, Steenvoorde P. Use of Cadaveric Donor Skin to Predict Success of a Definitive Split-thickness Skin Graft in Complicated Wounds. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2010; 22(11): 284–8.
222. Przekora A. A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro? *Cells.* 2020; 9(7): 1622.
223. Gao C, Lu C, Jian Z, Zhang T, Chen Z, Zhu Q, et al. 3D bioprinting for fabricating artificial skin tissue. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021; 208: 112041.
224. Tamayol A, Akbari M, Annabi N, Paul A, Khademhosseini A, Juncker D. Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(5): 669-87.
225. Oravcová D, Koller J. Currently available skin substitutes. *Cas Lek Cesk.* 2014; 153(1): 7-12.
226. Meuli M, Hartmann-Fritsch F, Hüging M, Marino D, Saglini M, Hynes S, et al. A Cultured Autologous Dermo-epidermal Skin Substitute for Full-Thickness Skin Defects: A Phase I, Open, Prospective Clinical Trial in Children. *Plast Reconstr Surg.* 2019; 144(1): 188–98.
227. Wu S, Coombs DM, Gurunian R. Liposuction: Concepts, safety, and techniques in body-contouring surgery. *Cleve Clin J Med.* 2020; 87(6): 367–75.

228. Klein JA. Anesthesia for liposuction in dermatologic surgery. *J Dermatol Surg Oncol.* 1988; 14(10): 1124–32.
229. Bunnell BA. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2021; 10(12): 3433.
230. Fiedler LS, Saleh DB, Mukrowsky A. Autologous fat grafting in the face and neck: Multinational trends and knowledge of the safety, applications, and indications considering oncologic risk potential. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2021; 6(5): 1024–30.
231. Lei H, Ma GE, Liu Z. Evaluation of Repairing Facial Depression Deformities Secondary to Lupus Erythematosus Panniculitis With Autologous Fat Grafting. *J Craniofac Surg.* 2016; 27(7): 1765–9.
232. Ra JC, Kang SK, Shin IS, Park HG, Joo SA, Kim JG, et al. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2011; 9(1): 181
233. Pu LLQ, Yoshimura K, Coleman SR. Future Perspectives of Fat Grafting. *Clin Plast Surg.* 2015; 42(3): 389–94.
234. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011; 9: 66.
235. Zhang B, Li J, He L, Huang H, Weng J. Bio-surface coated titanium scaffolds with cancellous bone-like biomimetic structure for enhanced bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2020; 114:431–48.
236. Sparks DS, Saleh DB, Rozen WM, Hutmacher DW, Schuetz MA, Wagels M. Vascularised bone transfer: History, blood supply and contemporary problems. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2017; 70(1): 1–11.

237. Shi Y, Tan X, Sun H, Char S. Experience With Autologous Nasal Septum Cartilage Combined With Conchal Cartilage in Nasal Tip Reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2021; 86(3S Suppl2): S189–S193.
238. Bagher Z, Asgari N, Bozorgmehr P, Kamrava SK, Alizadeh R, Seifalian A. Will Tissue-Engineering Strategies Bring New Hope for the Reconstruction of Nasal Septal Cartilage? *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020; 15(2): 144–54.
239. Yue H, Pathak JL, Zou R, Qin L, Liao T, Hu Y, et al. Fabrication of chondrocytes/chondrocyte-microtissues laden fibrin gel auricular scaffold for microtia reconstruction. *J Biomater Appl.* 2021; 35(7): 838–48.
240. Niveditha K, Vineeth CA, Josna J, Arun U, Annie J, Annie A. Mesenchymal Stem Cells Seeded Decellularized Tendon Scaffold for Tissue Engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021; 16(2): 155–64.
241. Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME. Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(12): 3002.
242. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 2014; 35(24): 6143–56.
243. Jahromi M, Razavi S, Bakhtiari A. The advances in nerve tissue engineering: From fabrication of nerve conduit to in vivo nerve regeneration assays. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019; 13(11): 2077-100.
244. Xiao N, Le QT. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016; 64(2): 89–99.
245. Nayyer L, Patel KH, Esmaeili A, Rippel RA, Birchall M, O'Toole G,

- Butler PE, Seifalian AM. Tissue engineering: revolution and challenge in auricular cartilage reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2012; 129(5):1123-1137.
246. Jovic TH, Combella EJ, Jessop ZM, Whitaker I. 3D Bioprinting and the Future of Surgery. *Front Surg.* 2020; 7:609836.
247. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillal S, Dennis V, Singh S. Advances in skin regeneration using Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(4):789.
248. Labus W, Kitala D, Szapski M, Klama-Baryla A, Kraut M, Smetek W. Tissue engineering in skin substitute. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1345:193-208.
249. Ulatowski L, Kaniewska A. The Use Of The Diep Flap In The Modern Reconstructive Surgery. *Pol Przegl Chir.* 2015; 87(9): 472-81.
250. Dibbs R, Trost J, Degregorio V, Izaddoost S. Free Tissue Breast Reconstruction. *Semin Plast Surg.* 2019; 33(1): 59–66.
251. Aguilera V, Briceño L, Contreras H, Lamperti L, Sepúlveda E, Díaz-Perez F, et al. Endothelium trans differentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors. *PLoS One.* 2014; 9(11): e111025.
252. García-García ÓD, El Soury M, González-Quevedo D, Sánchez-Porras D, Chato-Astrain J, Campos F, et al. Histological, Biomechanical, and Biological Properties of Genipin-Crosslinked Decellularized Peripheral Nerves. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(2): 1–21.
253. Irastorza-lorenzo A, Sánchez-porras D, Ortiz-arrabal O, Frutos MJ de, Esteban E, Fernández J, et al. Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(4): 1–20.

254. Chato-Astrain J, Chato-Astrain I, Sánchez-Porras D, García-García ÓD, 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.
255. Larson K, Ho HH, Anumolu L, Chen TM. Hematoxylin and eosin tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatol Surg*. 2011; 37(8):1089-99.
256. Vela-Romera A, Carriel V, Martín-Piedra MA, Aneiros-Fernández J, Campos F, Chato-Astrain J, et al. Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. *Histochem Cell Biol*. 2019; 151(1): 57–73.
257. Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez CA, Zapater A, Durand-Herrera D, Chato-Astrain J, Campos F, et al. Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2019; 37: 233–49.
258. 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.
259. Takeichi T, Akiyama M. Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J Dermatol*. 2016; 43(3): 242–51.
260. Terziroli Beretta-Piccoli B, Invernizzi P, Gershwin ME, Mainetti C. Skin Manifestations Associated with Autoimmune Liver Diseases: a Systematic Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017; 53(3): 394–412.
261. Stücker M, Schöbe MC, Hoffmann K, Schultz-Ehrenburg U.

- Cutaneous microcirculation in skin lesions associated with chronic venous insufficiency. *Dermatol Surg.* 1995; 21(10): 877–82.
262. Demirkesen C. Skin Manifestations of Endocrine Diseases. *Turk Patoloji Derg.* 2015; 31(Suppl1): 145–54.
263. Ionescu AM, Chato-Astrain J, Cardona J de la C, Campos F, Pérez MM, 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.
264. Urist MR, Nogami H. Morphogenetic Substratum for Differentiation of Cartilage in Tissue Culture. *Nat* 1970 2255237. 1970; 225(5237): 1051–2.
265. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells.* 2019; 8(5): 467.
266. Gnecci M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005; 11(4): 367-8.
267. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017; 35(4): 851–8.
268. Cooper LF, Ravindran S, Huang CC, Kang M. A Role for Exosomes in Craniofacial Tissue Engineering and Regeneration. *Front Physiol.* 2020; 10: 1569.
269. Xia J, Minamino S, Kuwabara K, Arai S. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *Biosci Trends.* 2019; 13(4): 299–307.
270. Carter K, Lee HJ, Na KS, Fernandes-Cunha GM, Blanco IJ, Djalilian

- A, et al. Characterizing the impact of 2D and 3D culture conditions on the therapeutic effects of human mesenchymal stem cell secretome on corneal wound healing in vitro and *ex vivo*. *Acta Biomater.* 2019; 99: 247–57.
271. Providence KM, Higgins SP, Mullen A, Battista A, Samarakoon R, Higgins CE, et al. Serpine1 (PAI-1) is deposited into keratinocyte migration “trails” and required for optimal monolayer wound repair. *Arch Dermatol Res.* 2008; 300(6): 303–10.
272. Lee SY, Kim JM, Cho SY, Kim HS, Shin HS, Jeon JY, et al. TIMP-1 modulates chemotaxis of human neural stem cells through CD63 and integrin signalling. *Biochem J.* 2014; 459(3): 565–76.
273. Osthues A, Knäuper V, Oberhoff R, Reinke H, Tschesche H. Isolation and characterization of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) from human rheumatoid synovial fluid. *FEBS Lett.* 1992; 296(1): 16–20.
274. Netti GS, Lucarelli G, Spadaccino F, Castellano G, Gigante M, Divella C, et al. PTX3 modulates the immunoflogosis in tumor microenvironment and is a prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY).* 2020; 12(8): 7585–602.
275. Stallone G, Netti GS, Cormio L, Castellano G, Infante B, Pontrelli P, et al. Modulation of complement activation by pentraxin-3 in prostate cancer. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 18400.
276. Dong B Bin, Yan JS, Yan YY, Xie TC, Xu L, Hu GH, et al. Downregulation of pigment epithelium-derived factor is associated with increased epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer. *Panminerva Med.* 2017; 59(1): 9–14.
277. Ong HT, Dilley RJ. Novel non-angiogenic role for mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor on

- keratinocytes during wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018; 44: 69-79.
278. Kawamura R, Hayashi Y, Murakami H, Nakashima M. EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration, and odontoblastic differentiation. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7(1): 1–14.
279. Xu J, Wang B, Sun Y, Wu T, Liu Y, Zhang J, et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7(1): 134.
280. Sevivas N, Teixeira FG, Portugal R, Direito-Santos B, Espregueira-Mendes J, Oliveira FJ, et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome Improves Tendon Cell Viability In Vitro and Tendon-Bone Healing In Vivo When a Tissue Engineering Strategy Is Used in a Rat Model of Chronic Massive Rotator Cuff Tear. *Am J Sports Med.* 2018; 46(2): 449–59.
281. Radek KA, Baer LA, Eckhardt J, DiPietro LA, Wade CE. Mechanical unloading impairs keratinocyte migration and angiogenesis during cutaneous wound healing. *J Appl Physiol.* 2008; 104(5): 1295–303.
282. Sandu C, Dumas M, Malan A, Sambakhe D, Marteau C, Nizard C, et al. Human skin keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts contain distinct circadian clock machineries. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69(19): 3329–39.
283. Kumar A, Kumar V, Rattan V, Jha V, Pal A, Bhattacharyya S. Molecular spectrum of secretome regulates the relative hepatogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow and dental tissue. *Sci Rep.* 2017; 7(1).
284. Yu S, Zhao Y, Fang TJ, Ge L. Effect of the Soluble Factors Released by Dental Apical Papilla-Derived Stem Cells on the

- Osteo/Odontogenic, Angiogenic, and Neurogenic Differentiation of Dental Pulp Cells. *Stem Cells Dev.* 2020; 29(12): 795–805.
285. Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 2010; 316(7): 1271–81.
286. Kosol W, Kumar S, Marrero-Berríos I, Berthiaume F. Medium conditioned by human mesenchymal stromal cells reverses low serum and hypoxia-induced inhibition of wound closure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 522(2): 335–41.
287. Bellei B, Migliano E, Picardo M. Therapeutic potential of adipose tissue-derivatives in modern dermatology. *Exp Dermatol.* 2022.
288. Rong X, Li J, Yang Y, Shi L, Jiang T. Human fetal skin-derived stem cell secretome enhances radiation-induced skin injury therapeutic effects by promoting angiogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10(1): 383.
289. Maguire G. The Safe and Efficacious Use of Secretome From Fibroblasts and Adipose-derived (but not Bone Marrow-derived) Mesenchymal Stem Cells for Skin Therapeutics. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2019; 12(8): e57.
290. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, et al. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy.* 2014; 16(2): 266–77.
291. Garzón I, Martin-Piedra MA, Alaminos M. Human Dental Pulp Stem Cells. A promising epithelial-like cell source. *Med Hypotheses.* 2015; 84(5): 516–7.
292. Huang AHC, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AWS. Isolation and

- characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(9): 571–4.
293. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009; 4(3): 423–33.
294. Stanko P, Kaiserova K, Altanero V, Altaner C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014; 158(3): 373–7.
295. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25): 13625–30.
296. Eltoukhy HS, Sinha G, Moore CA, Gergues M, Rameshwar P. Secretome within the bone marrow microenvironment: A basis for mesenchymal stem cell treatment and role in cancer dormancy. *Biochimie.* 2018; 155: 92–103.
297. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(7): 1167.
298. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(9): 1852.
299. Kulmar LP, Kandoi S, Misra R, Vijayalakhmi S, Rajagopal K, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46: 1–9.

300. Ajit A, Ambika Gopalankutty I. Adipose-derived stem cell secretome as a cell-free product for cutaneous wound healing. *3 Biotech.* 2021; 11(9): 413
301. Hu C, Zhao L, Zhang L, Bao Q, Li L. Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1): 377.
302. Kingsbury C, Stuppia L. Stem cell secretome derived from human amniotic fluid affords neuroprotection in an ischemic model. *Brain Circ.* 2021; 7(1): 18.
303. Nazarie SR, Gharbia S, Hermenean A, Dinescu S, Costache M. Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells' (MSCs) Secretome for Liver Fibrosis Therapies. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(24): 13292.
304. Vackovcá I, Kubinová S. Stem cell conditioned medium for cell-free therapies. *Ceskoslov Fysiol.* 2016; 65(1): 25–31.
305. Garcia M, Escamez MJ, Carretero M, Mirones I, Martínez-Santamaría L, Navarro M, Jorcano JL, Meana A, Del Rio M, Marcher F. Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering. *Mol Carcinog.* 2007; 46(8): 741-5.
306. Low ZWK, Li Z, Owh C, Chee PL, Ye E, Dan K, et al. Recent innovations in artificial skin. *Biomater Sci.* 2020; 8(3): 776–97.
307. Suzuki S, Matsuda K, Nishimura Y, Maruguchi Y, Maruguchi T, Ikada Y, et al. Review of acellular and cellular artificial skins. *Tissue Eng.* 1996; 2(4): 267–75.
308. Mao J, Zhao L, De Yao K, Shang Q, Yang G, Cao Y. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 64(2): 301–8.
309. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP,

- Herndon DN. Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)*. 2009; 10(5): 389–97.
310. Vivó C, Galeiras R, del Caz MDP. Initial evaluation and management of the critical burn patient. *Med intensiva*. 2016; 40(1): 49–59.
311. Vigani A, Culler CA. Systemic and Local Management of Burn Wounds. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017; 47(6): 1149–63.
312. Buchwach KA. Graft harvesting and management of the donor site. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2013; 21(3): 363–74.
313. Delgove A, Weigert R, Casoli V. Evaluation of donor site morbidity after medial triceps brachii free flap for lower limb reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2017; 137(12): 1659–66.
314. Besset M, Penaud A, Quignon R, Bahe L, Brilhault J, Fouquet B. Donor site morbidity after free gracilis muscle flap. Report of 32 cases. *Ann Chir Plast Esthet*. 2014; 59(1): 53–60.
315. Ajit A, Ambika Gopalankutty I. Adipose-derived stem cell secretome as a cell-free product for cutaneous wound healing. *3 Biotech*. 2021; 11(9): 413.
316. Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application: A Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021; 14: 1401–12.

