

Universidad de Granada  
Facultad de Medicina  
Departamento de Histología

**GENERACIÓN DE NUEVOS MODELOS DE MUCOSA ORAL  
HUMANA MASTICATORIA Y DE REVESTIMIENTO CON  
BIOMATERIALES FUNCIONALIZADOS Y FUENTES  
CELULARES ALTERNATIVAS PARA SU USO EN TERAPIAS  
AVANZADAS**

Programa de Doctorado en Biomedicina



Doctoranda: **Cristina Blanco Elices**

Directora: **Ingrid J. Garzón Bello**

2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Cristina Blanco Elices  
ISBN: 978-84-1117-975-1  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84391>

**GENERACIÓN DE NUEVOS MODELOS DE MUCOSA ORAL  
HUMANA MASTICATORIA Y DE REVESTIMIENTO CON  
BIOMATERIALES FUNCIONALIZADOS Y FUENTES  
CELULARES ALTERNATIVAS PARA SU USO EN TERAPIAS  
AVANZADAS**

Memoria presentada por **D<sup>a</sup>. Cristina Blanco Elices**  
Graduada en Biotecnología con mención en Biosalud y  
Máster en Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas  
para aspirar al título de:  
**Doctora por la Universidad de Granada**  
**dentro del Programa de Doctorado de Biomedicina**

**Fdo: Cristina Blanco Elices**

**Fdo: Dra. Ingrid J. Garzón Bello**  
Doctora en Ingeniería Tisular  
Universidad de Granada, España

Departamento de Histología  
Universidad de Granada

2023

La doctoranda, **Cristina Blanco Elices** y su directora de tesis, **Dra. Ingrid J. Garzón Bello**.

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

|

*The doctoral candidate, **Cristina Blanco Elices** and her thesis supervisor **Dra. Ingrid J. Garzón Bello**.*

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

Firman en Granada, 30 de mayo de 2023

**Fdo: Cristina Blanco Elices**

**Fdo: Dra. Ingrid J. Garzón Bello**  
Doctora en Ingeniería Tisular  
Universidad de Granada, España

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por los proyectos de investigación FIS PI18/00331, FIS PI21/00980 y ICI19-00024 (BIOCLEFT) del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (cofinanciados por fondos FEDER, UE).

La doctoranda, Cristina Blanco Elices realizó el presente proyecto de Tesis Doctoral en la Universidad de Granada con un contrato predoctoral de formación en investigación con expediente FI19/00279 del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

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

1- **Blanco-Elices C**, Chato-Astrain J, Oyonarte S, Bermejo-Casares F, España-López A, Fernández-Valadés R, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Martín-Piedra MA and Garzón I. *Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential*. J Periodontal Res. 2021 Dec;56(6):1116-1131. **Factor de Impacto: 3,946; Cuartil: Q1; Percentil: 78,80.**

La presente Tesis Doctoral se desarrolló en el marco de una colaboración internacional, con lo cual se opta al título de Doctora por la Universidad de Granada en el programa de Biomedicina con Mención Internacional.

La doctoranda, Cristina Blanco Elices realizó una estancia de investigación predoctoral bajo la supervisión del Doctor Xiaohua Liu, profesor en el Departamento de Ciencias Biomédicas de *Texas A&M College of Dentistry*, Estados Unidos. Esta estancia se desarrolló con la financiación de las ayudas para la movilidad del personal investigador (Modalidad M-AES) de la convocatoria 2021 con expediente MV21/00036 del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España en el período comprendido entre el 01/02/2022 y el 31/07/2022 (6 meses).

*“Como no estás experimentado en las cosas del mundo,  
todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen  
imposibles. Confía en el tiempo, que consigue dar dulces  
salidas a muchas amargas dificultades.”*

Miguel de Cervantes

## **AGRADECIMIENTOS**

---



A mi familia, en especial a mis padres y mi hermano Alejandro, por haber sido hogar y refugio todos estos años. Por haberme demostrado siempre un apoyo incondicional para cumplir cada uno de mis sueños y metas en la vida. Por haber confiado siempre en mí, incluso cuando ni yo misma lo hacía. Sin vuestro ejemplo y vuestro apoyo nada de esto habría sido posible.

A mi directora, la Profesora Ingrid Garzón, por haber confiado en mí desde el primer momento y haberme dado la oportunidad de emprender esta aventura en el mundo de la investigación.

A los Profesores Antonio Campos y M<sup>a</sup> Carmen Sánchez, por abrirme las puertas de este departamento y por haberme permitido aprender en todo momento del mejor ejemplo docente e investigador.

Al resto de profesores del Departamento de Histología, en especial al Profesor Miguel Alaminos, personas de las que no he hecho más que aprender de su gran labor como investigadores y docentes durante estos años.

A Jesús y Fernando, por haberme prestado su ayuda y apoyo desde el primer día. Por haberme enseñado no solo nuevas técnicas y protocolos, sino a ser paciente y no darme nunca por vencida.

A Dani, porque sin sus sabios consejos nada de esto habría sido posible.

A Paula, por haber sido persona vitamina desde el primer día y por contagiarme con su positividad incluso en los momentos más difíciles.

A todos mis compañeros de laboratorio en el grupo de Ingeniería Tisular, porque el trabajo duro se hace más llevadero cuando la amistad es parte de la ecuación.

A todos mis compañeros de laboratorio en la Texas A&M University, en especial al Profesor Liu, por haberme tratado como una más durante los meses que compartí con ellos y haberme echo sentir como en casa a pesar de estar a 8000 km de distancia.

A mis amigos “Biotec”, por compartir conmigo el intrépido y emocionante camino de la ciencia, desde la carrera hasta el doctorado. Por haber estado siempre en los buenos momentos que esta disciplina que compartimos nos ha dado y por haberme apoyado en los malos.

A mi mejor amigo, por haber mostrado un apoyo incondicional durante todo el camino y enseñarme a relativizar los problemas. La suerte es la suma de preparación y oportunidad.

Al resto de personas a los que tengo la gran suerte de llamar amigos, por haberme enseñado lo que es una amistad verdadera, sin importar la distancia que nos separé o los años que pasen. Por haberme acompañado en este camino y haber confiado siempre en mí.

¡Gracias a todos!

## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>19</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Estructura y función de la mucosa oral humana .....</b>	<b>25</b>
1.1. Histología de la mucosa oral .....	26
1.1.1. Epitelio de la mucosa oral .....	27
1.1.1.1. Epitelio estratificado plano queratinizado .....	27
1.1.1.2. Epitelio estratificado plano paraqueratinizado .....	31
1.1.1.3. Epitelio estratificado plano no queratinizado .....	31
1.1.2. Membrana basal de la mucosa oral .....	32
1.1.3. Estroma de la mucosa oral .....	33
1.1.4. Submucosa .....	34
1.2. Clasificación de la mucosa oral .....	35
1.2.1. Mucosa oral de revestimiento .....	35
1.2.2. Mucosa oral masticatoria .....	36
1.2.3. Mucosa oral especializada .....	36
<b>2. Ingeniería Tisular .....</b>	<b>39</b>
2.1. Conceptos básicos .....	39
2.2. Herramientas de la Ingeniería Tisular .....	40
2.2.1. Células .....	41
2.2.1.1. Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo .....	46
2.2.1.2. Células madre mesenquimales de la médula ósea .....	48
2.2.1.3. Células madre mesenquimales de la pulpa dental .....	49
2.2.2. Moléculas de señalización .....	50
2.2.3. Biomateriales .....	52
2.3. Perspectivas futuras de la Ingeniería Tisular .....	55
<b>3. Ingeniería Tisular de la mucosa oral .....</b>	<b>57</b>

<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>63</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>1. Objetivo general .....</b>	<b>69</b>
<b>2. Objetivos específicos .....</b>	<b>69</b>
<b>MATERIALES &amp; MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
<b>1. Optimización de nuevos biomateriales para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana .....</b>	<b>73</b>
1.1. Generación de nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana usando nuevos tipos de agarosas.....	73
1.2. Evaluación biomecánica de los nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana usando nuevos tipos de agarosas .....	74
<b>2. Obtención de cultivos celulares para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana.....</b>	<b>75</b>
2.1. Fibroblastos de mucosa oral humana .....	75
2.2. Células madre mesenquimales humanas .....	75
2.3. Células endoteliales de la vena umbilical humana.....	76
<b>3. Caracterización de las células madre mesenquimales mediante citometría de flujo e histoquímica .....</b>	<b>77</b>
<b>4. Diferenciación vascular <i>in vitro</i> de células madre mesenquimales</b>	<b>79</b>
4.1. Análisis <i>in vitro</i> del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimale mediante inmunofluorescencia .....	79
4.2. Análisis <i>in vitro</i> del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimales mediante array de proteínas .....	81
<b>5. Generación de modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial de vasculogénico .....</b>	<b>83</b>
<b>6. Evaluación <i>in vivo</i> de los modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial vasculogénico .....</b>	<b>86</b>
6.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico .....	86
6.2. Aprobación del comité de investigación y declaración de ética .....	88

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Evaluación del proceso de optimización de nuevos biomateriales para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana .</b>	<b>91</b>
1.1. Generación de nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana usando nuevos tipos de agarosas.....	91
1.2. Propiedades biomecánicas de los nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana .....	92
<b>2. Evaluación del proceso de obtención de cultivos celulares para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana.....</b>	<b>96</b>
<b>3. Evaluación del proceso de caracterización de las células madre mesenquimales .....</b>	<b>97</b>
<b>4. Evaluación del proceso de diferenciación vascular <i>in vitro</i> de las células madre mesenquimales .....</b>	<b>100</b>
4.1. Análisis <i>in vitro</i> del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimale mediante inmunofluorescencia .....	100
4.2. Análisis <i>in vitro</i> del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimales mediante array de proteínas .....	102
<b>5. Evaluación <i>in vivo</i> de los modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial vasculogénico .....</b>	<b>103</b>
5.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico .....	103
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>

## RESUMEN

Los trastornos de la mucosa oral humana como el cáncer oral, los traumatismos y las enfermedades periodontales, son afecciones muy prevalentes en la actualidad. El tratamiento de estas patologías depende en gran medida de la disponibilidad de mucosa oral humana sana que permita una terapia de sustitución, algo que dificulta su tratamiento debido a la escasez de donantes. En este sentido, la Ingeniería Tisular surge como una gran alternativa para el tratamiento de estas patologías, ya que es una rama de la medicina que tiene como objetivo básico la elaboración de tejidos artificiales que permitan la reparación restauración o incluso la mejora de las funciones de tejidos y órganos dañados.

En la presente Tesis Doctoral en primer lugar se ha llevado a cabo la optimización de las propiedades biomecánicas del biomaterial de fibrina y agarosa, previamente desarrollado por el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, con el objetivo de generar modelos mejorados de mucosa oral humana mediante protocolos de Ingeniería Tisular. En concreto, se han estudiado cinco tipos de agarosas diferentes y cada una de ellas a cuatro concentraciones, sobre las que se evaluaron las propiedades biomecánicas.

Los modelos mejorados de mucosa oral humana permitirían el tratamiento clínico de afecciones que afectan a la mucosa oral humana. Sin embargo, la biointegración es un problema importante en la generación de estos tejidos artificiales, el cual podría verse favorecido por la generación de sustitutos con un mayor potencial de vascularización. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo una segunda optimización para la mejora de los procesos de biointegración a partir de la incorporación de células madre mesenquimales humanas (MSC) con capacidad de vascularización en el estroma de los sustitutos de mucosa oral humana, para así generar modelos mejorados de mucosa oral humana prevascularizados.

En concreto, se han empleado MSC obtenidas a partir de tejido adiposo (ADSC), médula ósea (BMSC) y pulpa dental (DPSC). Los tres tipos de MSC fueron diferenciados a linaje endotelial utilizando medios inductores. Una vez inducida la diferenciación vascular se evaluó el potencial de vascularización de las MSC

antes y después de la inducción. Como control positivo se emplearon células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). La inducción *in vitro* de las MSC a estirpe endotelial fue capaz de aumentar la expresión de los marcadores endoteliales VEGF, CD31 y vWF, especialmente en las MSC de médula ósea y pulpa dental.

El siguiente paso fue generar sustitutos de mucosa oral humana empleando el biomaterial de fibrina y agarosa, previamente optimizado, combinando fibroblastos de mucosa oral humana (HFOM) y cada tipo de MSC antes y después de la inducción vascular. Una vez generados los modelos mejorados de mucosa oral humana se implantaron en ratones atímicos durante una semana y se evaluó el potencial de vascularización de cada sustituto *in vivo*. La implantación *in vivo* dio lugar a un aumento significativo de la formación de vasos sanguíneos en la zona intermedia entre el sustituto artificial y los tejidos del huésped, con una expresión significativa de los marcadores vasculares VEGF, CD31, vWF y CD34 en comparación con los controles. Al igual que en el estudio *in vitro*, el valor fue más alto en las MSC diferenciadas de BMSC y DPSC.

De este modo, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral suponen una importante mejora a nivel biomecánico y de vascularización de los modelos previamente desarrollados. Dichas mejoras, representan un avance para el potencial uso clínico de mucosa oral humana generada mediante protocolos de Ingeniería Tisular. La caracterización preclínica y el análisis de los controles de calidad desarrollados en la presente Tesis Doctoral constituyen un paso fundamental para su futura translación clínica.

## SUMMARY

Disorders of the human oral mucosa, such as oral cancer, trauma and periodontal diseases, are very prevalent conditions today. The treatment of these pathologies depends to a great extent on the availability of healthy human oral mucosa that allows replacement therapy, something that makes their treatment difficult due to the scarcity of donors. In this sense, Tissue Engineering emerges as a great alternative for the treatment of these pathologies, since it is a branch of medicine whose basic objective is the elaboration of artificial tissues that allow the repair, restoration or even the improvement of the functions of damaged tissues and organs.

In the present Doctoral Thesis, first, the optimization of the biomechanical properties of the fibrin-agarose biomaterial, previously developed by the Tissue Engineering group of the University of Granada, has been carried out with the aim of generating improved models of human oral mucosa by means of tissue engineering protocols. Specifically, five different types of agaroses have been studied, each at four different concentrations, on which the biomechanical properties were evaluated.

Improved models of human oral mucosa would allow the clinical treatment of conditions affecting the human oral mucosa. However, biointegration is a major problem in the generation of these artificial tissues, which could be favored by the generation of substitutes with a higher vascularization potential. In this sense, in this Doctoral Thesis a second optimization for the improvement of biointegration processes has been carried out based on the incorporation of human mesenchymal stem cells (MSC) with vascularization capacity in the stroma of human oral mucosa substitutes, to generate improved models of prevascularized human oral mucosa.

Specifically, MSC obtained from adipose tissue (ADSC), bone marrow (BMSC) and dental pulp (DPSC) were used. The three types of MSC were differentiated to endothelial lineage using inducing media. Once vascular differentiation was induced, the vascularization potential of MSCs was assessed before and after induction. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used as a positive control. In vitro induction of MSCs to endothelial lineage was able to

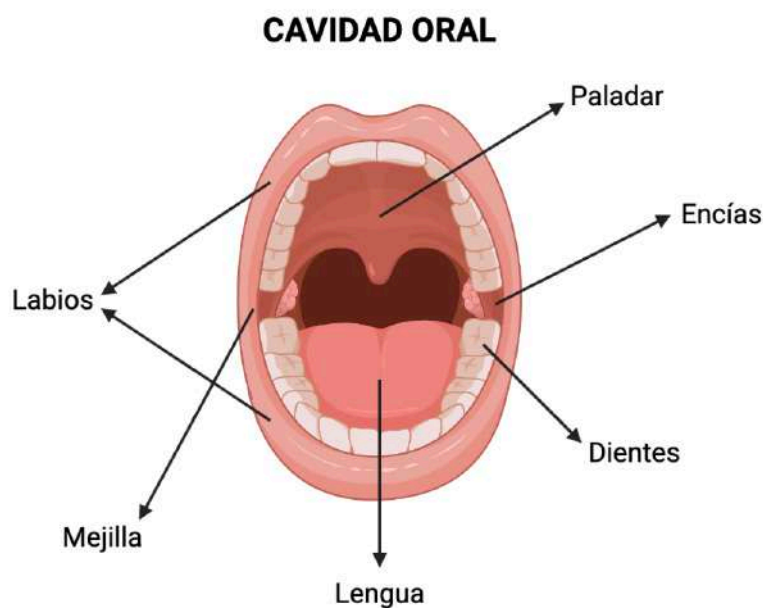


## **INTRODUCCIÓN**

---

# 1. Estructura y función de la mucosa oral humana

La cavidad oral humana es una estructura anatómica ubicada en la parte superior del cuerpo humano, en la cabeza. La cavidad oral está constituida por un conjunto de órganos, como son los labios, las mejillas, la lengua, el paladar, los dientes y las encías (Figura 1). Este conjunto de órganos contribuye a la masticación, secreción salival y absorción de nutrientes, mediante un proceso sinérgico. Además de ser un importante componente del sistema digestivo, la cavidad oral promueve la fonación y el lenguaje articulado.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo de los órganos que forman la cavidad oral humana (elaborado en la aplicación en línea [biorender.com](https://www.biorender.com)).

Dentro de la cavidad oral humana, hay varias estructuras importantes, incluyendo la lengua, que es responsable de la deglución del alimento y del habla. Los dientes son estructuras duras y calcificadas diseñadas para cortar, triturar y masticar los alimentos. Por otra parte, las glándulas salivales encargadas de la producción de saliva, son importante en el proceso de digestión y protección de los dientes y las encías (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

Es importante remarcar que todos estos órganos son estructuralmente independientes, y poseen características propias y diferenciadas, aunque son funcionalmente dependientes.

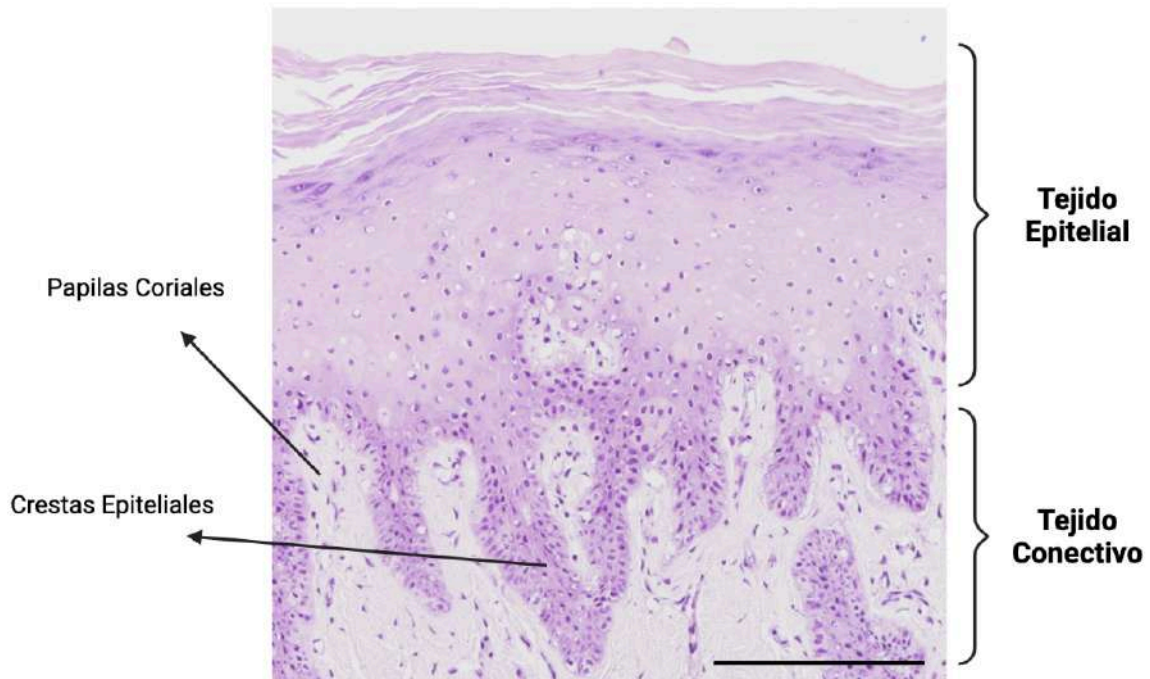
La cavidad oral humana se encuentra tapizada por un tejido blando denominado mucosa oral. La mucosa oral se encuentra en un entorno húmedo, la humedad de este tejido es aportada por las glándulas salivales principales y accesorias. La saliva es una sustancia viscosa que contiene un 95% de agua, un 3% de sustancias orgánicas y un 2% de sales minerales (grandes cantidades de iones de potasio y bicarbonato) (Heaney, Faustini *et al.* 2022). La saliva, juega un importante papel en el proceso defensivo de la mucosa oral debido a su alto contenido en inmunoglobulinas (Ig), siendo la IgA el tipo más predominante en la saliva. Por tanto, la mucosa oral es un tejido que se mantiene constantemente lubricado, y tiene importantes propiedades defensivas (Nikodijevic, Blagojevic *et al.* 2022).

### **1.1. Histología de la mucosa oral**

A nivel histológico, la mucosa oral, está formada por dos capas de tejido que son estructural y embriológicamente diferentes. En primer lugar, el tejido epitelial de origen ectodérmico y en segundo lugar, el tejido conectivo subyacente también denominado corion, lámina propia o estroma, de origen mesodérmico. En la presente Tesis Doctoral se denominará este tejido conectivo como estroma. Es importante señalar que ambos tejidos se encuentran conectados a través de la membrana basal. La membrana basal, se genera a partir de la interacción entre el tejido epitelial y el tejido conectivo. En este sentido, el tejido epitelial emite proyecciones hacia el estroma en forma de evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales. Por otra parte, el tejido conectivo también emite prolongaciones hacia el tejido epitelial las cuales reciben el nombre de papilas coriales, como se observa en la figura 2. Estas estructuras de crestas epiteliales y papilas coriales facilitan la nutrición del epitelio, dado que el epitelio es un tejido avascular que requiere del aporte de nutrientes mediante absorción, por parte del tejido conectivo subyacente, el cual sí tiene un carácter vascular (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

Es importante conocer en profundidad ambas capas de la mucosa oral humana para el estudio de posibles patologías y también para el desarrollo de nuevas terapias, como la generación de sustitutos de modelos mejorados de mucosa oral humana mediante protocolos de Ingeniería Tisular que se abordará en la

presente Tesis Doctoral. A continuación, se describirán las principales características histológicas de la mucosa oral humana.



**Figura 2.** Imagen histológica de mucosa oral humana teñida con hematoxilina-eosina. Escala de magnificación: 100  $\mu$ m.

### 1.1.1. Epitelio de la mucosa oral

El epitelio de la mucosa oral humana es de tipo estratificado plano o pavimentoso. Según la localización anatómica dentro de la cavidad oral en la que se encuentre, el epitelio puede ser queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado. Las células epiteliales que forman el epitelio de la mucosa oral humana se encuentran estrechamente unidas entre sí, por lo que forman una barrera funcional de protección entre el medio bucal y el tejido conectivo subyacente (Vinuela-Prieto, Sanchez-Quevedo *et al.* 2015).

En los siguientes apartados se detallarán en profundidad las características histológicas de los distintos tipos de epitelio de la mucosa oral humana según su localización anatómica en la cavidad oral.

#### 1.1.1.1. Epitelio estratificado plano queratinizado

El epitelio estratificado plano queratinizado de la mucosa oral humana se encuentra constituido por dos poblaciones celulares diferentes: la población intrínseca y la población extrínseca. En primer lugar, se va a describir la

población intrínseca, que representa un 90% del total de la población celular, y se origina en el tejido epitelial. En segundo lugar, se explicará la población extrínseca, formada por el 10% restante de las poblaciones celulares, que provienen de un origen ajeno al tejido epitelial (Sanchez-Quevedo, Alaminos *et al.* 2007, Alaminos and Campos 2023).

En la población intrínseca o propia del epitelio destacan los queratinocitos, células del epitelio destinadas a queratinizarse. Durante su maduración estas células experimentan una migración desde las capas más basales del tejido epitelial hacia las capas más superficiales. En este proceso de migración, la célula sufre una citodiferenciación la cual conlleva cambios bioquímicos y morfológicos, que culmina con la formación de una escama queratinizada y anuclear de carácter eosinófilo, que sufrirá un proceso de descamación natural (Pawlina and Ross 2018, Alaminos and Campos 2023).

Por otro lado, dentro de las poblaciones extrínsecas, que forman el 10% de la población celular total del tejido epitelial, un 9% corresponde a células extrínsecas permanentes en el tejido epitelial, mientras que el 1% son células que pertenecen a la población extrínseca transitoria.

De este modo, las células dendríticas o células claras son las que pertenecen a la población extrínseca permanente, las cuales agrupan a melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans. Mientras que granulocitos, linfocitos y monocitos, los cuales pueden infiltrarse en el epitelio de la mucosa oral humana, son las células que forman la población extrínseca transitoria.

En concreto, en la población extrínseca permanente encontramos en primer lugar los melanocitos. Los melanocitos son células redondeadas con un núcleo pequeño y prolongaciones alargadas de aspecto dendrítico que derivan del ectodermo de la cresta neural. Poseen melanosomas, gránulos que contienen melanina, los cuales son transferidos a los queratinocitos a través de un proceso denominado citocrino. Este proceso permite llevar a cabo la función de pigmentación homogénea en todo el tejido.

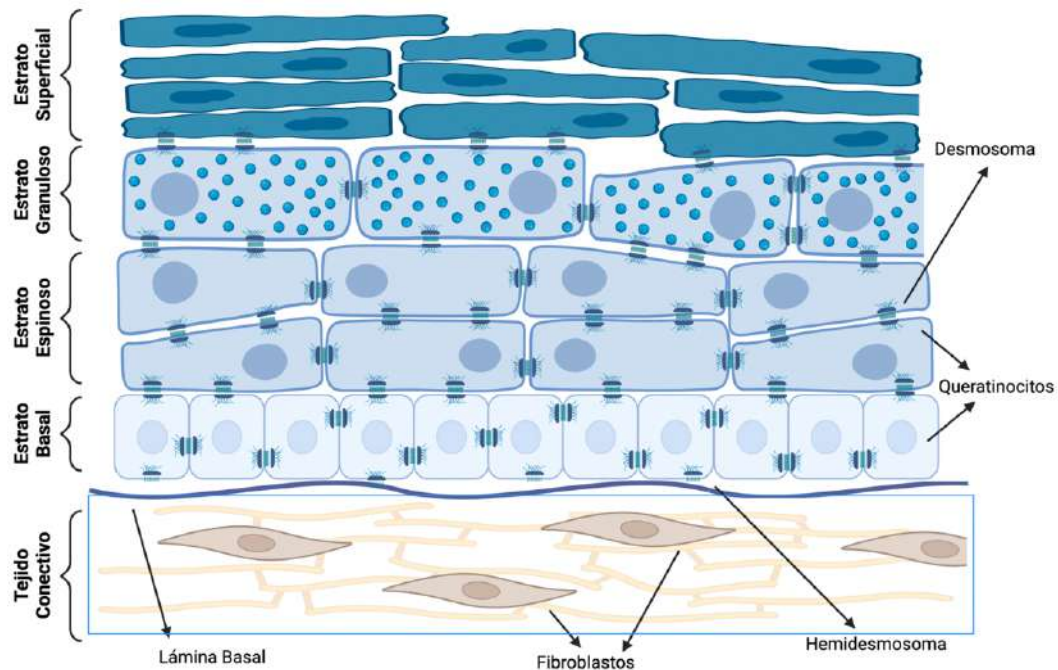
En segundo lugar, las células de Merkel son células esféricas con pequeños y escasos gránulos que carecen de prolongaciones. Estas células derivan del ectodermo y se localizan entre las células de la capa basal del epitelio. La base

de estas células se encuentra en contacto con unas terminaciones nerviosas expandidas, ya que su función principal es actuar como receptores sensoriales para los estímulos táctiles. Las células de Merkel también están involucradas en la percepción de la temperatura, la presión y el dolor.

En tercer lugar, las células de Langerhans poseen prolongaciones de tipo dendrítico y gránulos en su citoplasma con morfología bastoniforme, llamados gránulos de Birbeck. Estas células derivan del mesénquima, un tejido conectivo embrionario que procede del mesodermo y pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. La función de estas células es procesar y presentar los antígenos de los linfocitos T, de manera que podemos decir que son las encargadas de iniciar una rápida respuesta inmunológica contra los antígenos que penetran en el organismo a través de lesiones originadas en el epitelio (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009, Pawlina and Ross 2018).

Una vez descritas las poblaciones celulares que forman el epitelio de la mucosa oral humana se describirá de forma detallada cada una de las cuatro capas o estratos que forman los queratinocitos que integran el epitelio estratificado plano queratinizado de la mucosa oral humana. En este contexto, se empezará describiendo el estrato más basal, es decir el estrato que se encuentra en contacto con la membrana basal, y al cual le subyace el tejido conectivo. Posteriormente, se describirán los estratos más apicales como el estrato, espinoso, granuloso y superficial, como se ilustra en la figura 3.

Inicialmente, el estrato basal o germinativo está formado por una única capa de células basófilas, con alta actividad mitótica y de síntesis proteica. Estas células basales presentan una morfología cúbica o cilíndrica y núcleos redondeados. Los queratinocitos de este estrato son los encargados de iniciar la formación de las crestas epiteliales. El proceso de renovación epitelial se lleva a cabo en el estrato basal, dado que es donde se localizan las células madre del tejido epitelial. Además, en el estrato basal se identifican algunas células de la población extrínsecas permanente, como los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans (Adams 1976, Wang, Tang *et al.* 2019).



**Figura 3.** Esquema del proceso de diferenciación celular de un epitelio estratificado plano queratinizado de mucosa oral humana (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

Por encima del estrato basal, encontramos el estrato espinoso, constituido por varias hileras de queratinocitos con morfología poligonal y núcleos redondeados, de cromatina laxa, y con citoplasma ligeramente basófilo. Los queratinocitos de este estrato son los encargados de formar uniones intercelulares que llevarán a cabo una de las principales funciones de protección y barrera del tejido epitelial. Al igual que ocurre en el estrato basal, aparecen inmersas células de la población extrínseca permanente como las células de Langerhans y las de Merkel, aunque en menor proporción con respecto al estrato basal (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

Continuando hacia la región más apical se encuentra el estrato granuloso, formado por dos o tres capas de células aplanadas o escamosas con pequeños núcleos de cromatina densa. El citoplasma de estas células presenta gránulos de queratohialina, una molécula intensamente basófila. En este estrato también se pueden encontrar unos pequeños organoides redondeados característicos de los epitelios queratinizados, los cuerpos de Odland o queratinosomas, que se encuentran en las células granulosas más profundas, aunque en ocasiones también pueden hallarse en las células del estrato espinoso. Estos gránulos se descargan mediante exocitosis al espacio intercelular, pero hasta la fecha su función en dicho proceso no está clara; aunque se cree que actúan como una

sustancia cementante que genera una barrera impermeable al agua. En el estrato espinoso también comienzan los procesos que originan la degeneración del núcleo y del resto de los orgánoides celulares (Adams 1976, Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009, Wang, Tang *et al.* 2019).

Finalmente, el estrato más apical es el estrato superficial, que se caracteriza por sus células planas, sin núcleo evidente y con un citoplasma fuertemente acidófilo. Ultraestructuralmente, las células de este nivel carecen de cualquier orgánoides y su citoplasma está compuesto por una gran cantidad de filamentos de queratina los cuales se agrupan de modo compacto. Las células queratinizadas poseen morfología de “escama” compacta y deshidratada, que cubre una superficie bastante mayor que la célula basal a partir de la cual se formó y, se encuentran íntimamente adosadas a las escamas adyacentes, pero las uniones intercelulares se modifican, lo que facilita el proceso de descamación celular natural (Adams 1976, Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009, Alaminos and Campos 2023).

#### **1.1.1.2. Epitelio estratificado plano paraqueratinizado**

Una vez descrito el epitelio estratificado plano queratinizado de la mucosa oral humana es importante destacar que el epitelio paraqueratinizado presenta características muy similares en los estratos basal y espinoso. Las diferencias de este epitelio se manifiestan principalmente en los estratos granuloso y superficial. El estrato granuloso tiende a ser poco desarrollado y carece de gránulos de queratohialina bajo su observación con técnicas histológicas rutinarias como la hematoxilina-eosina (HE). Por otra parte, otra de las diferencias más destacables se encuentra a nivel de las células del estrato superficial, las cuales conservan sus núcleos y algunas organelas parcialmente lisadas, hasta que se produce el proceso de descamación. Las células del estrato superficial del epitelio estratificado plano paraqueratinizado tienen un metabolismo celular escaso como indica su menor coloración acidófila cuando se tiñen con tinciones histoquímicas como por ejemplo HE (Adams 1976, Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

#### **1.1.1.3. Epitelio estratificado plano no queratinizado**

La principal diferencia del epitelio estratificado plano no queratinizado con el epitelio estratificado plano queratinizado y paraqueratinizado es la ausencia de



los estratos superficial y granuloso, aunque en ocasiones pueden formarse gránulos incompletos o vestigiales. De este modo, los estratos que pueden encontrarse en un epitelio no queratinizado son: basal, intermedia y superficial.

En el estrato basal las células presentan una morfología cúbica y una alta capacidad de diferenciación. Por otro lado, en el estrato intermedio las células son poliédricas y presentan un citoplasma poco basófilo. Los núcleos de estas células son redondeados y de cromatina laxa, donde en ocasiones es posible identificar el Corpúsculo de Barr mediante estudio citológico. Por último, en el estrato superficial las células tienen una morfología aplanada, y se descaman (Adams 1976, Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

### **1.1.2. Membrana basal de la mucosa oral**

Una vez que han sido descritos los diferentes epitelios estratificados que se pueden identificar en la mucosa oral humana, se pasará a describir la membrana basal. La membrana basal separa el tejido epitelial del tejido conjuntivo subyacente. Cuando se estudia la membrana basal mediante microscopía óptica se observa la presencia de una banda acelular homogénea y estrecha que se tiñe con tinciones específicas para la detección de glucoproteínas, como la del ácido peryódico de Schiff (PAS). Sin embargo, cuando se observa la membrana basal mediante microscopía electrónica, se pueden distinguir dos láminas: la lámina basal y la lámina reticular.

La lámina basal es la porción amorfa y glicoprotéica que forma parte de la membrana basal. Esta lámina es sintetizada por células epiteliales y se encuentra formada por dos láminas independientes: la lámina lúcida y la lámina densa, ambas con un grosor aproximado de 50 nm. En la lámina lúcida se pueden observar mayoritariamente componentes como la laminina o la entactina, mientras que, en la lámina densa, se observan fibras de colágeno tipo IV, heparansulfato y fibronectina.

Por otro lado, la lámina reticular es sintetizada por células del tejido conectivo subyacente. La lámina reticular está formada por fibras inmersas en una matriz de glucosaminoglicanos. El espesor de esta lámina puede variar en función del grado de fricción al que se encuentre sometido el epitelio, siendo bastante más grueso en los epitelios queratinizados.

Entre algunas de las funciones de la membrana basal es importante destacar la de ser una estructura de fijación entre el tejido epitelial y el tejido conectivo subyacente, además de ser un filtro molecular no sólo a nivel físico, sino también químico. Esto se debe al alto nivel de cargas negativas que posee y que permiten restringir el paso de moléculas con esa misma carga. Además, esta estructura juega un importante papel en el sistema defensivo del organismo.

En este sentido, la membrana basal que se localiza en la interfase entre el tejido epitelial y el tejido conjuntivo de la cavidad oral presenta algunas características especiales; teniendo un mayor grosor en los epitelios no queratinizados y disminuyendo el grosor de forma progresiva con la edad (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

### **1.1.3. Estroma de la mucosa oral**

El tejido conjuntivo o estroma de la mucosa oral presenta un espesor variable en función de la zona en la que se localice. Este tejido conjuntivo se encarga de aportar sostén y nutrición al tejido epitelial, viéndose estas funciones reforzadas por la presencia de papilas coriales y el contenido de estructuras importantes como son los vasos sanguíneos. El estroma de la mucosa oral humana está formado por células inmersas en una matriz extracelular (MEC) y según su localización puede ser laxo, denso o semidenso. Entre las células de este tejido podemos encontrar fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas.

La MEC del estroma de la mucosa oral humana está formada por dos componentes: las fibras y la sustancia fundamental. Dentro de las fibras pueden encontrarse tres tipos diferentes: fibras de colágeno, elásticas y reticulares. En primer lugar, las fibras de colágeno son las encargadas de resistir las fuerzas de tracción y tensión, además de evitar que se produzca la deformación de la morfología de la mucosa oral. Por otro lado, las fibras elásticas son las encargadas de devolver al tejido a su estado original después de que una fuerza de tensión haya actuado sobre él. Por último, las fibras reticulares tienen la función de reforzar las paredes de los vasos sanguíneos para que puedan resistir las altas presiones a las que están sometidas estas estructuras (Chen, Ahmad *et al.* 2015).

Además del componente celular y fibrilar el estroma de la mucosa oral humana contiene sustancia fundamental. La sustancia fundamental es una matriz gelatinosa y amorfa, esencial para el soporte, la nutrición y la protección del tejido conectivo. La sustancia fundamental está compuesta principalmente de proteoglicanos, que son grandes moléculas compuestas de proteínas y carbohidratos y glicoproteínas, proteínas con grupos carbohidratos unidos. Otro importante componente de la sustancia fundamental son las glucoproteínas multiadhesivas, que son proteínas reguladoras y estructurales.

Es importante destacar que los proteoglicanos y las glicoproteínas tienen la capacidad de retener moléculas de agua, lo que ayuda a mantener la hidratación y elasticidad del estroma de la mucosa oral. La retención de estas moléculas de agua también facilita la difusión de nutrientes desde los vasos del tejido conjuntivo hasta los epitelios, permitiendo así la nutrición.

En el estroma de la mucosa oral existe una alta inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información acerca de hechos como la percepción del dolor (nocirreceptores), la temperatura (termorreceptores), el tacto y la presión (mecanorreceptores). Las terminaciones mecanorreceptoras que podemos encontrar en la mucosa oral humana son: el corpúsculo de Meissner y el complejo de Merkel. Por otro lado, las terminaciones nocirreceptoras y termorreceptoras son terminaciones libres que se ubican, tanto en la lámina propia, bajo la lámina basal, como entre las células del epitelio (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

#### **1.1.4. Submucosa**

La submucosa se encuentra formada por un tejido conjuntivo laxo de espesor y densidad variable, el cual tiene la función de unir la mucosa con los tejidos subyacentes. La submucosa puede aparecer como una capa separada y bien definida, o estar ausente cuando el estroma está firmemente adherido a la estructura ósea subyacente. Esta estructura puede localizarse en aquellas zonas que requieren movimiento y las cuales no se encuentran expuestas de forma directa a un desgaste continuado debido a la masticación.

En esta capa se suelen encontrar estructuras como las glándulas salivales, los vasos sanguíneos o los nervios, además del tejido adiposo. También es importante destacar que las fibras nerviosas que atraviesan la submucosa son mielínicas, sin embargo, pierden su vaina antes de dividirse en arborizaciones terminales en la lámina propia (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009, Chen, Ahmad *et al.* 2015).

## **1.2. Clasificación de la mucosa oral**

Una vez han sido descritas en profundidad las características histológicas de la mucosa oral humana, enumerando las distintas poblaciones que forman este órgano, profundizando en los distintos tipos de epitelio que se pueden estudiar en la cavidad oral y detallando la organización de cada tipo de epitelio bucal en estratos, se pasará a clasificar anatómicamente la mucosa oral humana en función de su localización.

La mucosa oral humana puede variar en función de las diferentes adaptaciones a las que debe someterse debido a la influencia mecánica a la que se encuentra sometida dependiendo de su localización anatómica. En este sentido, podemos clasificar la mucosa oral humana de acuerdo con su estructura, localización y función en: mucosa oral de revestimiento, mucosa oral masticatoria y mucosa oral especializada o sensitiva, (Adams 1976, Fleisch and Austin 1978, Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

### **1.2.1. Mucosa oral de revestimiento**

La mucosa de revestimiento es una estructura cuya función principal es la protección, la cual se localiza fundamentalmente en el paladar blando, el vestíbulo labial y el suelo de la boca. En cuanto a su epitelio, muestra bajos niveles de queratinización y un estroma laxo o semilaxo subyacente, además de una submucosa bien definida. Las fibras de colágeno del tejido conjuntivo no se encuentran organizadas en haces. Además, presenta fibras elásticas, lo que confiere a este tejido la capacidad de estirarse y volver a su estado de reposo cuando la distensión a la que es sometido cesa. Todo esto aporta a la mucosa de revestimiento un carácter distensible que hace que se adapte fácilmente a la contracción y la relajación a la que se encuentran sometidas estructuras como las mejillas, los labios y la lengua. Además, aportar capacidad de distensión a

los movimientos que se producen en el maxilar inferior, los cuales se llevan a cabo durante el proceso de masticación (Sawada, Wakabayashi *et al.* 2011).

A nivel de la submucosa, la cual se encuentra bien desarrollada en la mucosa oral de revestimiento, se pueden identificar estructuras histológicas como son las glándulas salivales menores, fibras musculares estriadas o incluso tejido adiposo, de acuerdo con las distintas zonas que tapizan este tipo de mucosa (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009, Wang, Yuan *et al.* 2018).

### **1.2.2. Mucosa oral masticatoria**

La mucosa masticatoria presenta un epitelio queratinizado y paraqueratinizado según su localización anatómica dentro de la cavidad oral. La mucosa masticatoria se puede localizar en el paladar duro, trígono retromolar, zonas de encía fijadas al hueso y algunas partes del dorso de la lengua (Arvidson, Grafstrom *et al.* 1988, Taybos 2003). Esta mucosa oral humana puede encontrarse sometida directamente a fuerzas intensas de fricción, presión y extensión que se originan como resultado del proceso de masticación. Debido a su localización anatómica la mucosa oral masticatoria humana requiere una elevada resistencia y por ello presenta unas características biomecánicas muy definidas que vienen dadas por su característica morfología. Es importante destacar que a nivel histológico posee un elevado número de crestas epiteliales y un tejido conjuntivo denso o semidenso en el estroma. La submucosa se encuentra presente en el lateral del paladar duro, pero no se detecta en la encía.

Es importante destacar que las crestas epiteliales y las papilas coriales del tejido conectivo de la mucosa oral masticatoria son más abundantes que las de la mucosa oral de revestimiento. Sin embargo, el número de capas en el epitelio de la mucosa oral de revestimiento es mayor.

### **1.2.3. Mucosa oral especializada**

La mucosa oral especializada se localiza en la cara dorsal de la lengua. El epitelio que forma la mucosa oral especializada es de tipo plano y el estroma está formado por tejido conectivo laxo con células adiposas. Existe una separación de la mucosa con la submucosa que está formada por tejido conectivo denso, sobre todo en la punta de la lengua donde se forma la fascia lingual. Es importante destacar, que la superficie de esta porción de la lengua

tiene un aspecto aterciopelado debido a la presencia de pequeñas proyecciones llamadas papilas linguales (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

Las papilas linguales pueden ser de cuatro tipos: filiformes, fungiformes, caliciformes o circunvaladas y foliadas.

En primer lugar, las papilas filiformes son las más abundantes. Las papilas linguales filiformes tienen una morfología cónica, es decir son proyecciones epiteliales, y tienen un epitelio paraqueratinizado. Presentan un estroma muy escaso y carecen de papilas secundarias y botones gustativos.

En segundo lugar, las papilas fungiformes son menos numerosas y reciben este nombre por la similitud de su morfología a la de los hongos, delgada en la base y más dilatada en los extremos proximales. Aparecen como puntos de color rojizo, debido a su fino epitelio, lo que permite detectar la coloración de los vasos sanguíneos que las irrigan. El estroma aparece como un núcleo central con fibras de colágeno que forman la papila primaria, a partir de la que surgen las papilas secundarias, que penetran en el epitelio de revestimiento. Además, presentan corpúsculos gustativos intraepiteliales.

En tercer lugar, las papilas caliciformes o circunvaladas son las más grandes que encontramos en la lengua humana. Cada papila caliciforme se encuentra rodeada por un profundo surco, llamado surco circunvalador, en cuyo fondo se abren los conductos de pequeñas glándulas salivales, que secretan un líquido que disuelve el alimento y facilita la recepción del gusto.

En cuarto y último lugar, las papilas foliadas son muy abundantes en el recién nacido y escasas en el individuo adulto. Son pliegues perpendiculares al borde de la lengua, tienen estroma y contienen corpúsculos gustativos.

De este modo, el sentido del gusto no viene dado por las papilas linguales, sino por pequeños corpúsculos contenidos en ellas, los denominados corpúsculos gustativos. Los corpúsculos gustativos principalmente se localizan en las papilas linguales de tipo caliciforme, pero pueden encontrarse también en el epitelio del paladar blando y en otras áreas de la región bucofaríngea.

Los botones gustativos son órganos que ocupan casi todo el espesor del epitelio y que están constituidos por células alargadas que se extienden desde la membrana basal hasta la superficie de revestimiento. Estas células se abren en

la superficie de revestimiento por un poro conocido como poro gustativo. Mediante microscopía óptica, se han descrito tres tipos celulares en los botones gustativos. En primer lugar, las células de sostén, que se disponen en la periferia del corpúsculo, como gajos de naranja. En segundo lugar, las células neuroepiteliales o células gustativas, que se disponen en la parte central. Por último, la célula basal que se supone precursora de uno de los dos tipos descritos anteriormente.

Sin embargo, mediante microscopía electrónica se han podido distinguir en el corpúsculo gustativo hasta cinco tipos celulares diferentes. En primer lugar, las células tipo I, son las más abundantes, contienen gránulos densos y presentan *microvillis* a nivel del poro gustativo. En segundo lugar, al igual que las anteriores, las células tipo II presentan *microvisllis*, pero muy cortos y escasos. En tercer lugar, las células tipo III contienen vesículas pequeñas ricas en serotonina, las cuales se ubican en el citoplasma basal. Es característico de este tipo celular que terminan en el poro gustativo formando una protrusión en forma de maza. En cuarto lugar, las células tipo IV son células madre localizadas en la base del corpúsculo. Por quinto y último lugar, las células tipo V se sitúan en la zona periférica delimitando el órgano de las células epiteliales.

## 2. Ingeniería Tisular

### 2.1. Conceptos básicos

El término Ingeniería Tisular (IT) fue acuñado en 1987 por el Profesor Fung de la Universidad de California en San Diego durante una reunión de la *National Science Foundation* de Estados Unidos (Vacanti 2006). Sin embargo, la expansión y generalización del término de IT no se produjo hasta unos años más tarde con la publicación en 1993, del trabajo titulado *Tissue Engineering* en la revista *Science* firmado por los autores Robert Langer y Joseph Vacanti (Langer and Vacanti 1993).

En este sentido, no es hasta el año 2004 cuando el término es introducido en España por el Profesor Don Antonio Campos Muñoz. De este modo, define la IT como “*la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica, para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos*” en su discurso de toma de posesión en la Real Academia Nacional de Medicina de España en Madrid (Campos 2004). Recientemente, en el discurso impartido por el Profesor Campos en la solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2023 de la Real Academia Nacional de Medicina de España en Madrid aporta una nueva visión al concepto de IT describiendo los tejidos artificiales como “*la agregación de distintos elementos -células, biomateriales, compuestos químicos, etc.- a los que hacemos converger para obtener un artefacto final, un producto que pretende ser lo más biomimético posible al tejido biológico que quiere imitar*” (Campos 2023).

Desde entonces, el crecimiento y el desarrollo de la IT ha sido exponencial, permitiendo la biogeneración de tejidos artificiales para su uso en el tratamiento de diferentes patologías, traduciéndose en la publicación de numerosos trabajos científicos (Martin-Piedra, Alfonso-Rodriguez *et al.* 2019, Martin-Piedra, Santisteban-Espejo *et al.* 2020, Garzon, Jaimes-Parra *et al.* 2021, Sanchez-Porras, Caro-Magdaleno *et al.* 2021). Sin embargo, la IT no solo se ha configurado como una línea de investigación científica fundamental y prioritaria en la actualidad, sino también como una actividad industrial de primera magnitud en los países más avanzados con un gran impacto en la economía y en el



desarrollo, como es el caso de Estados Unidos, Japón, Alemania o la propia España (Campos 2004).

Además, la generación de tejidos artificiales biomiméticos es un área de la medicina que se fundamenta en los niveles de organización que corresponden al ámbito de la histología, extendiéndose, desde el nivel celular hasta el de las poblaciones celulares y matrices que conforman los órganos del cuerpo humano (Santisteban-Espejo, Martin-Piedra *et al.* 2021, Campos 2023). De este modo, podemos clasificar el conocimiento obtenido en el área de la IT durante los últimos años en tres grandes apartados. En primer lugar, todo lo referente a la composición y estructura de los tejidos bioartificiales. En segundo lugar, la tecnología empleada para su construcción y utilización médica. En tercer y último lugar, la integración de los nuevos tejidos artificiales en la estructura corporal humana (Campos 2004).

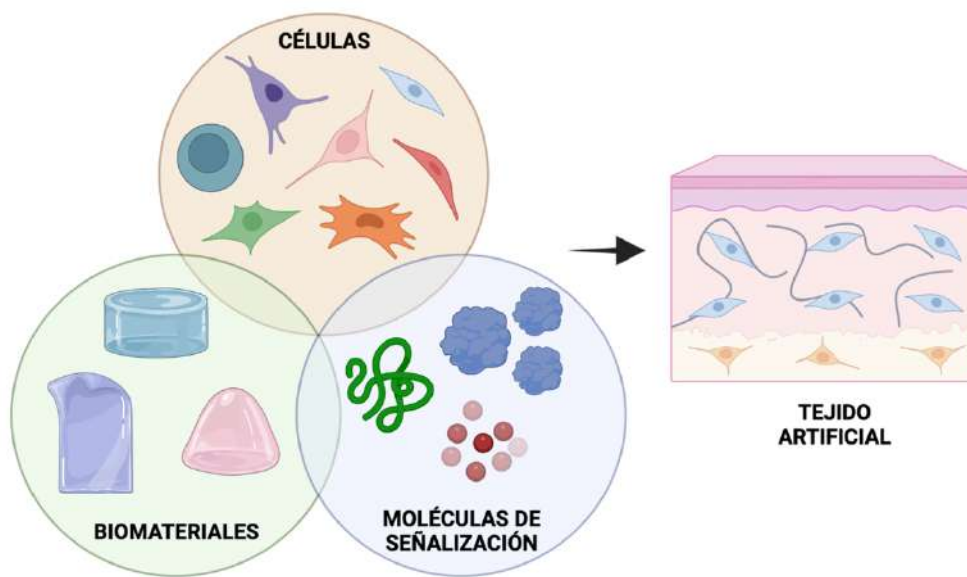
Por otro lado, el uso de novedosos tejidos artificiales no es solo importante por el efecto terapéutico que tienen en sí mismo, sino porque persiguen mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren enfermedades o situaciones graves. Un ejemplo, es el tratamiento de patologías de la mucosa oral causadas por diversos factores, como infecciones, lesiones traumáticas o enfermedades autoinmunes. El desarrollo de sustitutos de mucosa oral humana mediante técnicas de IT en los últimos años ha permitido reemplazar la mucosa oral afectada y acelerar el proceso de regeneración (Kobayashi, Kanai *et al.* 2014, Lee, Kim *et al.* 2017).

En este sentido, ha sido tal la importancia de esta nueva disciplina, que junto con la Terapia Celular y la Terapia Génica constituyen las tres modalidades de Terapias Avanzadas que con mayor impacto han irrumpido en la medicina de los últimos cincuenta años (Langer and Vacanti 1993).

## **2.2. Herramientas de la Ingeniería Tisular**

Para la generación de nuevos tejidos artificiales empleando protocolos de IT se requiere el uso de tres herramientas básicas, los cuales forman los pilares de esta disciplina: las células, las matrices extracelulares y las moléculas de señalización, como se representa en la figura 4.

En primer lugar, el papel de las células en los tejidos artificiales es sintetizar las proteínas necesarias para el correcto desarrollo de la función de celular. En segundo lugar, la matriz extracelular es la encargada de proporcionar un ambiente adecuado para permitir la proliferación y diferenciación celular. Por último, las moléculas de señalización son las encargadas de promover la regeneración del nuevo tejido mediante la activación de una serie de cascadas de señalización que inducen una respuesta celular en los nuevos tejidos artificiales.



**Figura 4.** Herramientas básicas para la fabricación de tejidos artificiales mediante protocolos de Ingeniería Tisular (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

A continuación, se detallarán cada una de las herramientas fundamentales para la fabricación de tejidos artificiales mediante técnicas de IT. En primer lugar, se detallarán las células, posteriormente las señales moleculares y en último lugar los biomateriales.

### 2.2.1. Células

Es importante conocer los elementos básicos del tejido nativo que se pretende regenerar antes de comenzar a trabajar en la generación de un tejido artificial, siendo la célula el componente básico, funcional y estructural (Vacanti 2010). Para ello, es importante empezar estudiando las estrategias que emplean las células para regenerar tejidos expuestos a una lesión. Durante el desarrollo de este complejo proceso de regeneración se llevan a cabo distintos eventos biológicos, como la proliferación o la diferenciación celular necesarios para

inducir el proceso regenerativo. Durante el proceso de regeneración, las células activan múltiples señalizaciones mediante la utilización de la información genética preprogramada en su material genético (Campos 2004).

Para inducir los procesos de regeneración tisular a partir del uso de células es importante conocer los tipos de células que se pueden usar en protocolos de IT. En este sentido, podemos diferenciar tres tipos diferentes de células en relación con su origen: células autólogas, células alogénicas y células xenogénicas.

Las células autólogas son aquellas que proceden de un mismo individuo, esto permite su manipulación con un riesgo mínimo de reacciones inmunológicas postimplantación. Por otro lado, las células alogénicas son las que pertenecen a un individuo de la misma especie y su principal ventaja es que permiten su conservación en bancos biológicos con carácter previo a su utilización. Por último, las células xenogénicas proceden de otras especies y por lo tanto, ofrecen, junto con las alogénicas, un riesgo importante de rechazo inmunológico por parte del hospedador (Campos 2004, Stocum 2004, Stocum 2012). En este contexto, las células de mayor uso en protocolos de IT debido a sus propiedades inmunológicas son las células autólogas y las alogénicas.

Cabe destacar que las células pueden emplear dos estrategias en el proceso de regeneración de un nuevo tejido: por un lado, el proceso de transdiferenciación y, por otro lado, la capacidad de división celular. En relación con el proceso de transdiferenciación, como se ha descrito previamente en la literatura, en una lesión se produce un microambiente capaz de estimular el mecanismo de transdiferenciación en la célula (Ibrahim, Moss *et al.* 2020). El mecanismo de transdiferenciación consiste en la capacidad de desdiferenciación y posterior rediferenciación que tienen algunas células, lo que les permite adquirir nuevos fenotipos (Tsonis 2002, Collas and Hakelien 2003). Por otro lado, en relación al proceso de diferenciación celular, este consiste en la capacidad que tienen las células de regenerar un entorno lesivo gracias a su capacidad de división, lo que les permite originar nuevas células hijas (Bianco and Robey 2001). Esta capacidad de división celular es una característica importante de las células madre. La definición científica de célula madre hace referencia a aquellas células que tienen capacidad de división asimétrica, y dan origen a una célula hija idéntica a la célula madre y otra con capacidad de diferenciación terminal

(Yamanaka 2020). A pesar de que no existe un acuerdo universal sobre lo que es exactamente una célula madre, suele aceptarse que son aquellas células de carácter indiferenciado, con alta capacidad de proliferación y capaces de originar nuevas células hijas destinadas a la diferenciación terminal (Campos 2004).

En este sentido, es importante poner de relieve la existencia de una clasificación de células madre en el ámbito de la IT. De acuerdo con esto, existen dos grandes grupos, según su grado de desarrollo: las células madre embrionarias y las células madre adultas (Bajada, Mazakova *et al.* 2008, Stocum 2012). Del mismo modo, según la capacidad de diferenciación, las células madre embrionarias se clasifican en células madre embrionarias totipotentes y pluripotentes. Mientras que las células madre adultas pueden clasificarse en células madre adultas multipotentes y unipotentes (Kim and Evans , Bajada, Mazakova *et al.* 2008).

Las células madre embrionarias totipotentes son aquellas que se aíslan del cigoto hasta su estado de mórula y que tienen la capacidad de generar un organismo completo (embrión y placenta). Por otro lado, se definen como células madre embrionarias pluripotentes, todas aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas que forman al embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo). Esto permite que estas células puedan diferenciarse a la mayoría de los linajes celulares, pero que no puedan dar origen a un organismo completo. Es importante mencionar que el uso clínico de las células madre embrionarias está muy limitado debido a las diversas consideraciones éticas y legales que implica su uso (Evans and Kaufman 1981, Commission 1999, Bajada, Mazakova *et al.* 2008).

Por otra parte, las células madre adultas multipotentes poseen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los linajes celulares que derivan de una de las capas del embrión. Las células madre mesenquimales (MSC) con las que se ha trabajado en la presente Tesis Doctoral pertenecen a este grupo de células madre adultas multipotentes. Por último, las células madre adultas unipotentes son aquellas con capacidad para diferenciarse exclusivamente en un linaje celular como es el caso de las células madre epiteliales o las neurales (Lanza, Langer *et al.* 2007, Kjell, Fischer-Sternjak *et al.* 2020). Este tipo celular tiene un importante papel en los procesos de regeneración y autorenovación de los diferentes tejidos y órganos a lo largo de la vida del individuo (Wagers 2012).

Dada la importancia de las MSC en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral a continuación, se detallarán las principales características de estas células y su uso en IT. De este modo, las MSC son consideradas células con capacidades inmunomoduladoras, ya que a través de la liberación de diversas citoquinas son capaces de modular la respuesta inmunológica del huésped (Baergen 2005, Figueroa, Carrion *et al.* 2012, Stefanska, Ozegowska *et al.* 2020). Esta es una importante característica, ya que pueden contribuir a regular y reducir la respuesta inmunológica del huésped frente a un tejido bioartificial, algo muy importante para prevenir el rechazo del sustituto artificial biogenerado, ya que permitiría el uso de estas células de carácter alogénico en diferentes pacientes (Carriel, Alaminos *et al.* 2014, Liao, Ruszymah *et al.* 2020, Carriel 2017). Otra de sus cualidades es que cuentan con una baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (HLA-ABC) (Sarugaser, Lickorish *et al.* 2005, Lu, Liu *et al.* 2006) y no expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Conconi, Burra *et al.* 2006). Además, las MSC, consideradas células madre adultas multipotenciales, presentan la ventaja de ser una fuente celular de fácil obtención, lo que facilita su uso a nivel ético y legal (Lu, Liu *et al.* 2006, Liao, Ruszymah *et al.* 2020). Asimismo, es destacable su gran capacidad de proliferación y de mantener un estado de indiferenciación *in vitro*. Esto se debe a la alta actividad enzimática de las telomerasas de estas células (Hiyama and Hiyama 2007, Celtikci, Erkmen *et al.* 2020). Además, las MSC cuentan con un cariotipo estable a lo largo de múltiples pases celulares y mantienen su capacidad de adhesión e inhibición por contacto, lo que las hace una fuente celular importante para su uso en Terapias de Medicina Regenerativa (Lund, Loytomaki *et al.* 2007, Garzon, Perez-Kohler *et al.* 2012, Durand-Herrera, Campos *et al.* 2018, Blanco-Elices, Chato-Astrain *et al.* 2021). Todas estas características permiten que las MSC puedan ser criopreservadas en bancos biológicos hasta ser empleadas para la generación de los tejidos artificiales, reduciendo el aislamiento y utilización de células autólogas (Lu, Liu *et al.* 2006, Stefanska, Ozegowska *et al.* 2020).

Asimismo, recientes estudios del grupo de investigación de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada han demostrado un posible carácter pluripotencial de estas células, consideradas en la actualidad multipotentes (Garzon, Miyake *et al.*

2013). Este hecho aumentaría significativamente el uso de estas células como fuente alternativa en protocolos de IT.

En este contexto, para desarrollar un tejido artificial mediante protocolos de IT se puede contar con el uso de células madre adultas unipotenciales o multipotenciales, que son las más usadas actualmente en el campo de la IT. En concreto, la utilización de células madre adultas multipotentes requiere, en la mayoría de casos, procesos de transdiferenciación en el laboratorio que permitan inducir cambios fenotípicos específicos del tejido que se quiere generar (Bonassar and Vacanti 1998).

Una vez seleccionados los tipos celulares necesarios con los que se desea trabajar, el siguiente paso es llevar a cabo el cultivo y la expansión celular en el laboratorio con medios de cultivo específicos que modulen el comportamiento celular. Este proceso, puede llevarse a cabo mediante modificaciones en el microambiente del cultivo celular. Un ejemplo de esto es el uso de medios de cultivo suplementados con factores de crecimiento, los cuales pueden ocasionar, como se mencionó anteriormente, una modulación del comportamiento celular (Lanza, Cibelli *et al.* 2000, Atala 2012). En concreto, en la presente Tesis Doctoral se han empleado medios de cultivo suplementados con factor de crecimiento endotelial (EGF) para inducir la transdiferenciación de MSC hacia células vasculares. Otro mecanismo de modulación del comportamiento celular puede ser mediante reprogramaciones genéticas (Surani 2001). Este último proceso se realiza mediante la Terapia Génica, con la cual se realizan modificaciones en la información genética de la célula traduciéndose en modificaciones en la síntesis de proteínas, inhibiendo la respuesta inmune o incluso generando alteraciones en la proliferación celular.

Otro importante factor que se debe de tener en cuenta cuando se planifica la generación de tejidos artificiales mediante protocolos de IT es que las células madre adultas diferenciadas suelen ser difíciles de aislar y cultivar *in vitro*. Además, estas células generalmente presentan una capacidad de proliferación muy limitada, lo que dificulta la obtención de un número adecuado de células en periodos cortos de tiempo debido a que cuando se asilan y expanden *ex vivo* en el laboratorio disminuyen su función, expresión génica, viabilidad y capacidad de diferenciación (Rodríguez-Morata, Garzon *et al.* 2008, Alaminos, Perez-Kohler *et*

*al.* 2010, Garzon, Carriel *et al.* 2012, Garzon, Perez-Kohler *et al.* 2012). Sin embargo, estas células son las más eficientes para promover la generación de un tejido artificial altamente biomimético y funcional, dado que presentan las mismas características fenotípicas y funcionales del tejido que se quiere regenerar (Atala 2012, Carriel, Alaminos *et al.* 2014, Carriel, Geuna *et al.* 2018).

En conclusión, se puede decir que todas las células difieren entre sí en cuanto a su origen, fenotipo, morfología, función, actividad metabólica y capacidad de regeneración. Asimismo, es importante reconocer que la célula es el asiento básico de todo proceso patológico, y por tanto, toda enfermedad se basa en la alteración de un conjunto grande o pequeño de unidades celulares de un organismo viviente como bien lo describió Rudolph Virchow en 1858 (Geneser 1993, Kierszenbaum and Tres 2015). De acuerdo con esto, la célula constituye uno de los ejes fundamentales en el desarrollo de tejidos artificiales que permiten el tratamiento de diversas patologías.

Actualmente, las terapias basadas en el uso de células madre tienen un importante potencial terapéutico, además de múltiples beneficios sobre el uso de tratamientos convencionales. Esto ha ocasionado que durante los últimos años un gran número de trabajos científicos se hayan centrado en el desarrollo y la mejora de terapias clínicas basadas en el uso de células madre. Al mismo tiempo, estos trabajos han permitido profundizar en la investigación y el conocimiento de su potencial terapéutico (Egana, Fierro *et al.* 2009, Wang, Yuan *et al.* 2018, Xiong, Sun *et al.* 2020).

#### **2.2.1.1. Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo**

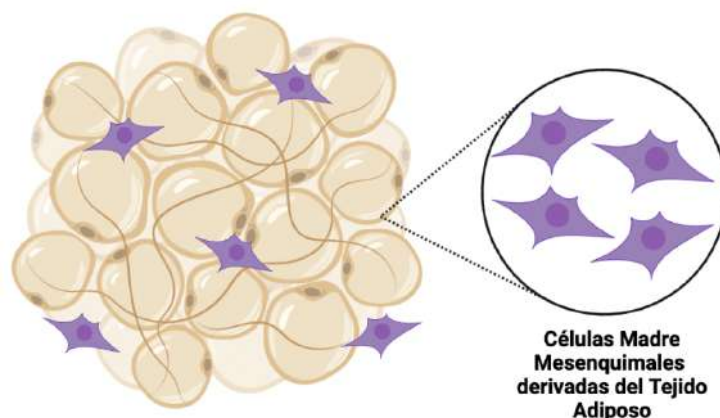
Una vez detallados los tipos de células madre más utilizados en los protocolos de generación de tejidos artificiales, a continuación, se describirán los diferentes tipos de células madre adultas multipotenciales utilizados en la presente Tesis Doctoral. En concreto, se han utilizado células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ADSC), células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSC) y células madre mesenquimales de la pulpa dental (DPSC).

Las ADSC se localizan en el tejido adiposo. El tejido adiposo es un tejido conjuntivo especializado que se encuentra presente en todas las especies de mamíferos. El tejido adiposo se localiza en los tejidos subcutáneos, en el

compartimento intraperitoneal (tratándose de la grasa visceral que rodea los órganos) y de forma difusa por todo el organismo. El componente celular principal del tejido adiposo son los adipocitos maduros, células mononucleadas que tienen una vacuola lipídica en su citoplasma. Además, el tejido adiposo está circundado por tejido conectivo que brinda soporte y nutrición a partir de la presencia de vasos sanguíneos y otras estructuras histológicas como los ganglios linfáticos y los nervios.

Dentro de las funciones más importantes del tejido adiposo destaca el mantenimiento del metabolismo energético del cuerpo. Esta función se realiza a través del almacenamiento de lípidos, proceso que llevan a cabo los adipocitos maduros como respuesta a la secreción de hormonas específicas circulantes en el torrente sanguíneo (Minteer, Marra *et al.* 2013).

Además de los componentes del tejido adiposo descritos previamente, en el año 2001, se describió por primera vez unas células denominadas “preadipocitos”. Siendo los preadipocitos una población celular con una alta plasticidad en la diferenciación a distintas estirpes celulares (Zuk, Zhu *et al.* 2001). Posteriormente se les renombró como “células madre derivadas del tejido adiposo” (ADSC) debido a sus características de autorrenovación, división asimétrica y multipotencialidad (Brayfield, Marra *et al.* 2010) (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema representativo de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

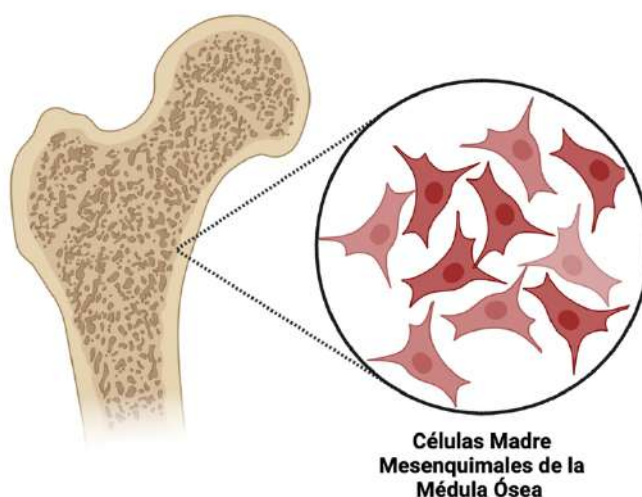
De este modo, las ADSC son células madre adultas mesenquimales con capacidad de diferenciación multipotencial tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, y aunque suelen proliferar con bastante facilidad, son necesarias altas concentraciones de factores de crecimiento en el medio de cultivo para inducir



la diferenciación de un linaje celular específico (Brayfield, Marra *et al.* 2010, Gerlach, Lin *et al.* 2012). Asimismo, las ADSC son células de fácil obtención. Todas estas características, han permitido que las ADSC se consideren como una prometedora fuente celular alternativa de gran aplicación en Medicina Regenerativa (Chandra, G *et al.* 2009, Kajiyama, Hamazaki *et al.* 2010).

### **2.2.1.2. Células madre mesenquimales de la médula ósea**

Las BMSC se obtienen de la médula ósea. La médula ósea es un tejido esponjoso que se encuentra en la mayoría de los huesos largos, como el fémur. En la médula ósea se lleva a cabo la hematopoyesis, el proceso mediante el cual los componentes celulares de la sangre se reponen de forma continuada a lo largo de la vida de un individuo. En la hematopoyesis intervienen varias poblaciones celulares altamente especializadas que tienen funciones únicas, como es el transporte de oxígeno de los hematíes o la defensa inmunitaria frente a patógenos de los linfocitos. Entre estas poblaciones se encuentran las células madre mesenquimales de la médula ósea, las cuales se caracterizan por su alta capacidad de autorrenovación y de originar diversos progenitores que tienen capacidad de diferenciarse a células sanguíneas maduras (Pinho and Frenette 2019) (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema representativo de las células madre mesenquimales de la médula ósea (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

Las BMSC fueron descritas por primera vez como células madre mesenquimales por Arnold Caplan en el año 1991 (Caplan 1991). Desde ese momento, se han sucedido multitud de estudios científicos que han permitido conocer con mayor profundidad la actividad de esta población celular y de sus nichos celulares

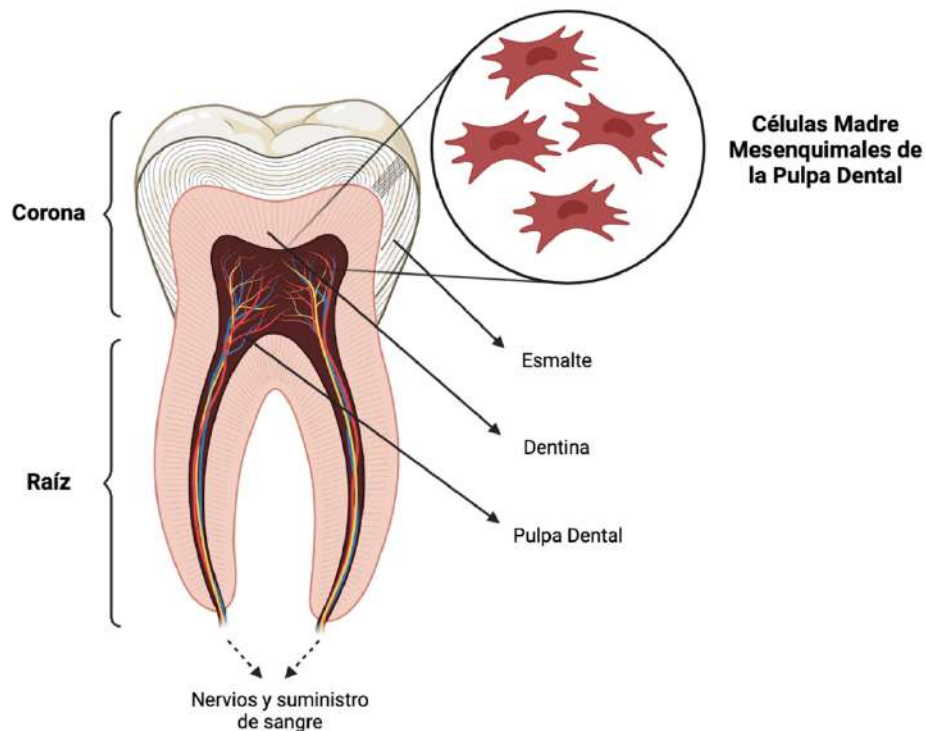
(Wilson and Trumpp 2006, Morrison and Scadden 2014). De este modo, distintas investigaciones han revelado la importancia de la regulación transcripcional y los mecanismos de regulación epigenéticos en la actividad de las BMSC (Pinho and Frenette 2019).

En este sentido, las BMSC no sólo son las encargadas de proporcionar un apoyo microambiental a las células hematopoyéticas, sino que también poseen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes mesodérmicos dado su carácter multipotencial. Entre algunas de sus ventajas, al igual que las ADSC, destaca la su fácil obtención a partir de punciones de médula ósea, además de mantener su alta capacidad de proliferación *in vitro*. De la misma forma, presentan interesantes propiedades inmunomoduladoras, lo que las hace atractivas candidatas para su utilización en Terapia Celular, como es el caso de su uso en protocolos de IT (Pontikoglou, Deschaseaux *et al.* 2011).

### **2.2.1.3. Células madre mesenquimales de la pulpa dental**

Dentro de la cavidad oral se localizan varios órganos, siendo los dientes uno de los más importantes debido a su participación en funciones tan significativas para el aparato digestivo como son la masticación, la fonación o la deglución (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009). Las DPSC se localizan dentro de la cavidad pulpar de los dientes como se ilustra en la figura 7.

Histológicamente, el diente adulto está formado por varios tejidos mineralizados, como son el esmalte, la dentina y el cemento. Estos tejidos mineralizados al mismo tiempo envuelven y protegen a la pulpa dental, un tejido conjuntivo laxo mucoso. El tejido pulpar está formado por diferentes poblaciones celulares y una matriz extracelular. Dentro del componente celular destaca la presencia de DPSC, fibroblastos, odontoblastos, células endoteliales, macrófagos, células dendríticas y linfocitos. La mayoría de estos componentes celulares poseen un alto grado de diferenciación celular, excepto las DPSC que son consideradas células madre adultas multipotenciales. Además, en la pulpa dental aparecen vasos sanguíneos e inervaciones nerviosas, que se encargan de la irrigación y la inervación del diente (Liu, Gronthos *et al.* 2006, Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).



**Figura 7.** Esquema de la estructura histológica de un diente y de las células madre mesenquimales de la pulpa dental (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

Las DPSC son células madre mesenquimales que fueron descritas por primera vez en el año 2000 por Gronthos (Gronthos, Mankani *et al.* 2000), y desde entonces, múltiples trabajos de investigación han demostrado que se tratan de células con una alta capacidad de proliferación y de diferenciación (Martin-Piedra, Garzon *et al.* 2014, Martin-Piedra, Alfonso-Rodriguez *et al.* 2019). Además, este tipo celular tiene una gran aplicación en los protocolos de IT en la actualidad, ya que trabajos previos han demostrado su capacidad de desarrollar tejidos mineralizados tanto en cultivo *in vitro*, como en procesos *in vivo* (Gronthos, Mankani *et al.* 2000, Seo, Miura *et al.* 2004).

### 2.2.2. Moléculas de señalización

En el desarrollo de tejidos artificiales las moléculas de señalización son un pilar fundamental, ya que promueven la activación de distintos procesos celulares (Campos 2004). Las moléculas de señalización tienen una importante función en la comunicación intercelular, dado que pueden influir y modificar el comportamiento celular a través de la unión a receptores específicos y la activación de complejas cascadas de señalización (Kierszenbaum and Tres 2015). En concreto, las moléculas de señalización permiten la activación de diferentes mecanismos moleculares y biológicos que permiten el desarrollo de

complejos procesos como son la división, la migración, la diferenciación, el mantenimiento del fenotipo e incluso la activación de la muerte celular mediante apoptosis (Campos, Bonhome-Espinosa *et al.* 2018, Shen, Guerra-Librero *et al.* 2018, Bonhome-Espinosa, Campos *et al.* 2020). De este modo, el desarrollo coordinado de los procesos de señalización celular permite la correcta configuración de la estructura histológica y funcional de los tejidos (Campos 2004, Mills 2012, Kierszenbaum and Tres 2015).

En este sentido, los estudios más recientes de los últimos años han permitido describir las diferentes moléculas de señalización existentes y las vías en las que intervienen dichas moléculas para inducir el desarrollo y regeneración de los tejidos (Geneser 1993, Mills 2012, Kierszenbaum and Tres 2015). Dado que muchos de los eventos del desarrollo embrionario tienen lugar durante este complejo proceso, su conocimiento y entendimiento es crucial para poder realizar el correcto diseño de nuevas estrategias que permitan el desarrollo de protocolos de IT más efectivos (Herbert and Stainier 2011). La utilización de las moléculas de señalización en IT se ha realizado a través de tres estrategias de biofabricación de tejidos artificiales. La primera de ellas está enfocada a la incorporación de moléculas de señalización en el medio de cultivo, y es la que ha sido empleada en la presente Tesis Doctoral. La segunda persigue la combinación de las moléculas de señalización con biomateriales y finalmente, la tercera estrategia propone la encapsulación o el recubrimiento de nanopartículas con moléculas de señalización (Chiu and Radisic 2010, Bonhome-Espinosa, Campos *et al.* 2017, Cheng, Qu *et al.* 2017).

Con respecto a la combinación de biomateriales el objetivo fundamental es la funcionalización de los biomateriales. En el caso de la encapsulación o el recubrimiento, aparte de funcionalizar, el objetivo es la liberación controlada de las moléculas de señalización. En este sentido, estudios recientes han combinado ambos mecanismos, la funcionalización del biomaterial y el encapsulamiento de las moléculas de señalización, con el fin de obtener gradientes de liberación diferentes de distintas moléculas de señalización lo que permite la generación de un microambiente en el tejido huésped mucho más controlado (Chiu and Radisic 2010, Anisimov, Tvorogov *et al.* 2013).

### 2.2.3. Biomateriales

Una vez descritas las células y las moléculas de señalización, se procederá a describir la última herramienta fundamental de la IT, los biomateriales. Los biomateriales proveen un sustrato para la proliferación y diferenciación de las células. Además, juegan un papel muy importante, ya que pretenden imitar la MEC de los tejidos nativos. Los biomateriales, por tanto, deben aportar soporte estructural, tridimensionalidad y propiedades biomecánicas que permitan el correcto funcionamiento de los tejidos artificiales (Griffith and Naughton 2002).

Los biomateriales empleados en IT deben cumplir una serie de requisitos básicos; biocompatibilidad, biodegradación, soporte estructural, facilidad de síntesis y reproducibilidad (Jorgensen, Yoo *et al.* 2020, Brassolatti, Bossini *et al.* 2021, Yang, Campbell Ritchie *et al.* 2021, Zhao, Shen *et al.* 2021). En primer lugar, los biomateriales deben ser biocompatibles con las células y el nicho receptor, es decir, no deben ocasionar ningún tipo de citotoxicidad y deben promover las principales funciones celulares (Williams 2008, Carriel, Alaminos *et al.* 2014, Jin, Shi *et al.* 2021, Johari, Khodaei *et al.* 2022). En segundo lugar, deben ser biodegradables, esto quiere decir que deben ser química y estructuralmente estables durante todo el proceso, tener propiedades biomecánicas y morfológicas adecuadas, y en algunos casos, pueden estar sujetos a un proceso de degradación controlado (Ionescu, Alaminos *et al.* 2011, Scionti, Moral *et al.* 2014, Carriel, Scionti *et al.* 2017). En tercer lugar, los biomateriales deben proveer de un soporte estructural a las células, en este sentido la organización tridimensional debe ir orientada a imitar la estructura de la MEC de un tejido nativo (Hutmacher, Goh *et al.* 2001, Williams 2019). De hecho, trabajos previos han demostrado que la rigidez y la elasticidad son propiedades que pueden afectar significativamente al potencial de regeneración de los tejidos artificiales, además de alterar la viabilidad celular (Kim, Ferguson *et al.* 2016). Por último, otra de las propiedades fundamentales que debe de tener un biomaterial es ser fácil de sintetizar en el laboratorio y tener un alto grado de reproducibilidad biológica (Lanza, Langer *et al.* 2020). Todo ello hace que el control de las propiedades biomecánicas sea uno de los requisitos más importantes de los biomateriales que se emplean para la generación de tejidos artificiales y sean por tanto, las propiedades biomecánicas abordadas con

especial interés en la presente Tesis Doctoral. Del mismo modo, cada aplicación específica debe tener en cuenta las distintas propiedades biomecánicas de cada material (Carletti, Motta *et al.* 2011).

El impacto biológico de un biomaterial en la función celular viene dado por su naturaleza química. Aunque hasta la fecha no existe una clasificación universal que englobe a todos los biomateriales utilizados en IT, existen diversos criterios, siendo el más empleado aquel que permite determinar su impacto biológico obedeciendo a la naturaleza del biomaterial. En este sentido, los biomateriales se clasifican en naturales, sintéticos o híbridos (Binyamin, Shafi *et al.* 2006, Carriel, Alaminos *et al.* 2014).

Los biomateriales naturales proceden fundamentalmente de matrices extracelulares o productos naturales, algunos ejemplos son el colágeno, el quitosano, la fibrina y la agarosa. Estos dos últimos utilizados en la presente Tesis Doctoral para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana. En general, estos biomateriales se caracterizan por su alto grado de biocompatibilidad y biodegradabilidad, motivo por el que suelen ser los más utilizados en protocolos de IT. Sin embargo, su estabilidad mecánica suele ser muy variable, siendo el control de sus propiedades biomecánicas (módulo de Young, carga a la rotura, deformación a la fractura) un desafío en la actualidad y motivo de estudio de esta Tesis (Gu, Ding *et al.* 2014, Scionti, Moral *et al.* 2014, Carriel, Scionti *et al.* 2017, Lanza, Langer *et al.* 2020).

La fibrina es una proteína que se elabora a partir del fibrinógeno, la cual participa en la hemostasis y la coagulación. El proceso de escisión del fibrinógeno en monómeros de fibrina es llevado a cabo por la trombina. Los oligómeros resultantes, se alargan en protofibrillas, que se agregan lateralmente para formar fibras, que posteriormente se agregan y ramifican para dar lugar a una red tridimensional (Mosesson 2005, Shirure and George 2017). Cabe destacar que la fibrina se encuentra entre uno de los biomateriales más prometedores en el ámbito de la IT, debido a su accesibilidad y propiedades biológicas únicas. Esta proteína tiene la capacidad de formar matrices porosas tridimensionales bioactivas capaces de promover el crecimiento y la diferenciación celular (Rojas-Murillo, Simental-Mendia *et al.* 2022). Otra importante ventaja de este biomaterial es su fácil obtención a partir de la sangre de pacientes, lo que permite eliminar

el riesgo de rechazo inmunitario y reduce los costes de fabricación (Breen, O'Brien *et al.* 2009). Hasta la fecha, este prometedor biomaterial ha sido empleado para la generación de numerosos tejidos artificiales, como hueso (Cassaro, Justulin *et al.* 2019), cartílago (Barbon, Stocco *et al.* 2019, Rojas-Murillo, Simental-Mendia *et al.* 2022) y piel (Shao, Lyu *et al.* 2021), entre otros. Sin embargo, las propiedades biomecánicas de los hidrogeles sintetizados a partir de la fibrina, junto con la rápida tasa de degradación una vez son implantados *in vivo*, hacen necesaria la mejora de las propiedades intrínsecas de este biomaterial para superar estas limitaciones (Noori, Ashrafi *et al.* 2017).

Otro biomaterial de origen natural que ha sido ampliamente utilizado en protocolos de IT para la generación de tejidos y órganos son los polisacáridos marinos, como la agarosa (Sun, Ma *et al.* 2021). Las propiedades inherentes a estos productos marinos, como la biodegradabilidad y la biocompatibilidad, hacen de la agarosa un producto idóneo para su uso en la generación de tejidos artificiales. Este polisacárido natural presenta propiedades autogelificantes controladas, alta biocompatibilidad y solubilidad en agua. Además, ha sido demostrada su capacidad para potenciar la proliferación y actividad celular (Salati, Khazai *et al.* 2020).

Hasta la fecha varios tipos de agarosas han sido descritas, y recientemente el grupo de investigación de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ha demostrado que la concentración y el tipo específico de agarosa empleado en los protocolos de biofabricación puede influir significativamente en las propiedades biomecánicas, además de en las funciones biológicas y la biocompatibilidad *in vivo* del biomaterial (Irastorza-Lorenzo, Sanchez-Porras *et al.* 2021). Debido a esto, se deben de emplear concentraciones y tipos específicos de agarosas según la aplicación concreta que se deseé.

Por otro lado, los biomateriales sintéticos son principalmente polímeros de naturaleza química, como por ejemplo el ácido poliláctico (PLA) o el poliuretano. La principal ventaja de los biomateriales sintéticos es que se pueden regular sus parámetros estructurales, además de su estabilidad química y mecánica (Binyamin, Shafi *et al.* 2006, Gu, Ding *et al.* 2014). No obstante, muchos de estos biomateriales, aunque catalogados como biocompatibles, pueden liberar sustancias tóxicas durante el proceso de biodegradación, lo que dificulta su uso

en protocolos de IT. Para solventar este problema los biomateriales sintéticos suelen combinarse con biomateriales naturales, que presentan propiedades celulares más adecuadas, surgiendo los biomateriales híbridos.

Los biomateriales híbridos combinan diferentes tipos de materiales para aprovechar las principales ventajas de cada uno de ellos. Estos biomateriales han sido utilizados en protocolos de IT para mejorar la biocompatibilidad, la funcionalidad y la eficacia de los tejidos artificiales. Un ejemplo de biomaterial híbrido es la combinación de cerámicas con polímeros como es el caso de la combinación de hidroxiapatita con polímeros de ácido poliláctico para la regeneración de tejido óseo (He, Hu *et al.* 2021, Zhang, Chen *et al.* 2022). Otro ejemplo son los hidrogeles combinados con nanopartículas. Como se ha mencionado previamente las moléculas de señalización pueden encapsularse o recubrir nanopartículas con el fin de controlar su liberación. Con el fin de regenerar tejido nervioso mediante técnicas de IT se han usado hidrogeles de colágeno funcionalizados con nanopartículas de oro (Vijayavenkataraman, Vialli *et al.* 2019).

En este sentido, no existe un biomaterial ideal para la fabricación de todos los tejidos, sino que la combinación de algunos elementos químicos suele ser una de las estrategias que reporta mejores resultados en este campo y permite optimizar los mismos biomateriales para aplicaciones específicas en IT.

### **2.3. Perspectivas futuras de la Ingeniería Tisular**

En la actualidad, la IT es un área de la medicina que ha permitido una alternativa para el tratamiento de diferentes patologías que hasta la fecha requerían el uso de tejidos u órganos procedentes de donantes (Gonzalez-Quevedo, Sanchez-Porras *et al.* 2022, Garcia-Garcia, El Soury *et al.* 2023). Siendo uno de los principales problemas de estos tratamientos, la escasez de donantes. Este hecho, constituye un reto evidente en la fabricación de tejidos artificiales, el cual se podría minimizar con el uso de fuentes celulares alternativas, como las células madre de tipo alogénico.

Otro de los grandes retos a los que se enfrenta la IT en la actualidad para lograr una correcta translación clínica de los tejidos artificiales es lograr la conexión vascular del sustituto artificial con el sistema circulatorio del huésped. De este



modo, estudios recientes han demostrado que las señales moleculares son imprescindibles para desarrollar una red vascular en el sustituto artificial generado mediante técnicas de IT. Estas redes vasculares dependen de diferentes rutas metabólicas que se pueden activar con marcadores vasculares como VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , Angiopoietina-1 y 2, etc (Kim, Hou *et al.* 2016, Rouwkema and Khademhosseini 2016, Blanco-Elices, Chato-Astrain *et al.* 2021). Este es un tema de gran importancia que se tratará con mayor profundidad en los siguientes apartados de la presente Tesis Doctoral.

No menos importante, es la optimización de los biomateriales utilizados en el proceso de biofabricación de los tejidos artificiales. Este hecho se constituye como otro importante reto para la translación clínica, ya que mejora las condiciones de manipulación, implantación y biomimeticidad de los tejidos.

En este sentido, la finalidad última de la generación de cualquier nuevo tejido artificial mediante técnicas de IT es lograr su plena integración en la estructura deseada del cuerpo humano (Bryan, Ahswin *et al.* 2014, Blanco-Elices, Morales-Alvarez *et al.* 2023). Para ello se requiere una intervención quirúrgica, así como la posterior aceptación biológica del nuevo tejido en el cuerpo del receptor (Sipe 2002).

La búsqueda de una translación clínica de los tejidos artificiales segura, sumado a la reciente consideración de los productos de IT como medicamentos, ha generado la necesidad de desarrollar controles de calidad más exhaustivos que permitan examinar cada una de las etapas que conlleva el proceso de biofabricación de estos nuevos tejidos con gran precisión.

Esta reciente consideración como medicamento conlleva una serie de nuevos controles de calidad, de acuerdo con las últimas normativas europeas y de otros países. Los controles de calidad deben de llevarse a cabo no solo para conseguir su aprobación, sino para realizar un seguimiento exhaustivo de cada una de las etapas de su fabricación y así asegurar que todo el proceso se ha llevado a cabo bajo estrictas condiciones de calidad farmacéutica, las cuales son imprescindibles debido a que la finalidad del producto es un uso terapéutico en pacientes humanos (Directiva Europea 2003/63/EC) (Reglamento 1394/2007) (Directiva 2009/120/CE) (Cuende and Izeta 2010, Cuende, Rico *et al.* 2012, Cuende 2013).

### 3. Ingeniería Tisular de la mucosa oral

A pesar de su importante carácter funcional dentro de la cavidad oral humana, la mucosa oral puede verse afectada por un gran número de patologías, entre las que podemos incluir traumatismos, tumores, infecciones o enfermedades autoinmunes, entre otras muchas (Gonzalez-Serrano, Serrano *et al.* 2016). De hecho, los tumores de la cavidad oral, especialmente los carcinomas epidermoides asociados a personas fumadoras, los sarcomas intraorales y los melanomas (Feller, Khammissa *et al.* 2017) son patologías muy prevalentes en la sociedad actual que causan un gran gasto sanitario y un enorme impacto social. Actualmente, el tratamiento de todas estas patologías que afectan a la mucosa oral requiere del uso de injertos y colgajos para la reparación de la lesión, siendo muy frecuente tener que recurrir a tejidos extraorales como son la piel o incluso fragmentos de tubo digestivo del propio paciente, los cuales son poco accesibles y suelen generar numerosos problemas cuando se implantan en la cavidad oral (Alaminos, Garzon *et al.* 2007, Sanchez-Quevedo, Alaminos *et al.* 2007, Wolff, Farre-Guasch *et al.* 2016). Por todo ello, es necesario continuar con la investigación de nuevos tratamientos y fuentes alternativas de mucosa oral que puedan ser utilizadas para la reparación de todas estas lesiones (Garzon, Miyake *et al.* 2013).

En este sentido, dentro del campo de la odontología, la medicina regenerativa ha avanzado en el tratamiento de patologías complejas en las que la mucosa oral y los tejidos dentales se han visto gravemente afectados o incluso se han perdido (Larsson, Decker *et al.* 2016, Fagogeni, Metlerska *et al.* 2019). Una de las áreas más prometedoras de la medicina regenerativa es la IT, cuyas técnicas han permitido la generación de nuevos tejidos artificiales, los cuales tienen una alta aplicación clínica, incluyendo la mucosa oral humana (Garzon, Sanchez-Quevedo *et al.* 2009, Blanco-Elices, Espana-Guerrero *et al.* 2020). Además, la mucosa oral humana generada mediante protocolos de IT podría ser empleada para la reparación de otros tejidos extraorales como son la córnea o la uretra, como se ha demostrado en trabajos previos (Martin-Cano, Garzon *et al.* 2013, Browne and Vanni 2017).

En los últimos 50 años, se han desarrollado diversos tipos de sustitutos de mucosa oral humana mediante distintos protocolos de IT para su uso en pacientes con patologías que afectan la mucosa oral (Bykov 2010, Kinikoglu, Damour *et al.* 2015).

Uno de los primeros modelos de mucosa oral artificial generados fue a partir de la biofabricación de láminas epiteliales, que se desarrolló a partir del cultivo *in vitro* de láminas de células epidérmicas autólogas obtenidas a partir de pequeñas biopsias (Nakamura, Endo *et al.* 2003, Imaizumi, Asahina *et al.* 2004, Kinikoglu, Damour *et al.* 2015). Las láminas de células epidérmicas habían mostrado resultados previos muy prometedores en el tratamiento de defectos cutáneos causados por quemaduras graves, úlceras, etc (Turksen 2018). Sin embargo, los principales defectos de estos sustitutos para el tratamiento de defectos en la mucosa oral humana era su fragilidad, la dificultad en la manipulación y su baja tasa de integración (Feinberg, Aghaloo *et al.* 2005). Para intentar superar estas limitaciones surgieron los sustitutos de mucosa oral que incluían el tejido conectivo, denominados de espesor total.

Los sustitutos de mucosa oral humana de espesor total facilitan la adherencia y maduración del injerto epitelial debido a la presencia de un tejido conectivo, como ha sido demostrado previamente (Wood, Kolybaba *et al.* 2006, Fang, Lineaweaver *et al.* 2014). Esta mucosa oral humana artificial es más fácil de manipular y permite rellenar defectos más profundos. En este sentido, el primer equivalente de mucosa oral humana se generó usando una capa estratificada continua de queratinocitos orales humanos cultivados sobre una matriz dérmica humana cadavérica (Izumi, Takacs *et al.* 1999). Posteriormente, se generaron sustitutos de mucosa oral humana de espesor total con distintas poblaciones celulares, lo que permitió obtener un alto grado de diferenciación y resistencia para la evaluación histológica (Moriyama, Asahina *et al.* 2001, Rouabhia and Deslauriers 2002, Igarashi, Irwin *et al.* 2003). Es importante resaltar que en los últimos años los sustitutos de mucosa oral también han sido utilizados con éxito en la reconstrucción de defectos en la uretra (Selim, Bullock *et al.* 2011, Kinikoglu, Rovere *et al.* 2012, Martin-Cano, Garzon *et al.* 2013).

En este sentido, los equivalentes de la mucosa oral humana han sido utilizados como modelos *in vitro*, para el estudio de patología de la mucosa oral humana

(Kulasekara, Lukandu *et al.* 2009) o en pruebas toxicológicas y farmacológicas de productos para el cuidado bucal (Koschier, Kostrubsky *et al.* 2011) y clínicamente, para el tratamiento de defectos orales (Yoshizawa, Koyama *et al.* 2012). Sin embargo, la mucosa oral humana es un tejido muy vascularizado y la implantación de sustitutos artificiales puede fracasar debido a la falta de vascularización. En este sentido, en los últimos años los nuevos protocolos de IT se han centrado en la generación de sustitutos de mucosa oral humana prevascularizados (Zuk, Zhu *et al.* 2001, Lee, Kim *et al.* 2017, Lee, Shin *et al.* 2018).

Hasta la fecha, diferentes estrategias han sido desarrolladas para inducir y promover la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos artificiales, como es la incorporación de células endoteliales, principalmente células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Perez-Amodio, Tra *et al.* 2011, Frueh, Menger *et al.* 2017). Las técnicas de cocultivo de células endoteliales con células estromales, en la mayoría de los casos células madre mesenquimales, ha sido una de las técnicas más utilizadas para la obtención de redes vasculares (Smirani, Remy *et al.* 2020). Otra estrategia en la que se emplean las células endoteliales para vascularizar mucosa oral humana artificial consiste en inducir un procedimiento de hipoxia en los sustitutos artificiales cultivados *in vitro*, lo que mejoraba la capacidad de proliferación y migración celular de las células endoteliales (Perez-Amodio, Tra *et al.* 2011). Sin embargo, la utilización de condiciones de hipoxia durante un periodo prolongado de tiempo en los cultivos *in vitro* pueden ocasionar efectos opuestos, como la disfunción de los fibroblastos, además de un descenso en la migración y proliferación de los queratinocitos (Masson-Meyers and Tayebi 2021).

La funcionalización de los biomateriales con moléculas de señalización que inducen el proceso de angiogénesis en los tejidos artificiales generados se ha postulado como otra estrategia prometedora para la vascularización de mucosa oral humana artificial (Ilamaran, Sundarapandian *et al.* 2020). En este sentido, para obtener la liberación sostenida de las moléculas proangiogénicas y lograr concentraciones de rango deseado se emplean biomateriales porosos o nanopartículas inmersas en el biomaterial, que permiten una liberación local lenta (Sarker, Chen *et al.* 2015, Boccardo, Gaudiello *et al.* 2016, Gaudiello, Melly

*et al.* 2017). En un estudio de 2014, se desarrolló un gel de fibrina que permitía la liberación controlada de factor de crecimiento endotelial de vena (VEGF), con el que se pudo demostrar que la liberación controlada de VEGF inducía un proceso de angiogénesis estable y funcional (Sacchi, Mittermayr *et al.* 2014).

Es importante poner de relieve que los injertos autólogos de mucosa oral humana, a pesar de ser el criterio de referencia para el tratamiento de muchas patologías, presentan importantes limitaciones en cuanto al proceso de revascularización y morbilidad de las zonas donantes. Con el fin de ofrecer una nueva estrategia, en la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado un modelo mejorado de mucosa oral humana utilizando distintos tipos de MSC, en concreto, ADSC, BMSC y DPSC.

Las MSC han sido usadas con anterioridad en protocolos de IT debido a sus importantes propiedades inmunosupresoras y antiapoptóticas, como ha sido mencionado en apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral. Además, es importante destacar que algunos autores han demostrado que las MSC son capaces de expresar varias moléculas de señalización proangiogénicas, como por ejemplo VEGF, que como se ha sido descrito anteriormente, acelera y facilita la vascularización de los nuevos tejidos artificiales tras su implantación (Kelm, Diaz Sanchez-Bustamante *et al.* 2005, Sun, Abelson *et al.* 2019). Estas propiedades provasculogénicas de las MSC las hacen unas excelentes candidatas para la vascularización de nuevos tejidos artificiales (Egana, Fierro *et al.* 2009, Jang, Kim *et al.* 2020).

Es importante tener en cuenta que, como autores previos han demostrado, los diferentes tipos de MSC del cuerpo humano son muy heterogéneos entre sí (Afra and Matin 2020). Debido a esto, en la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un exhaustivo estudio para determinar el potencial de vascularización *in vitro* de las diferentes fuentes de MSC humanas (ADSC, BMSC, DPSC) utilizadas para la generación de sustitutos mejorados de mucosa oral humana prevascularizados. Además, las MSC han demostrado tener capacidad de diferenciación a linajes vasculares, lo que ha permitido evaluar la posibilidad de inducir una rápida vascularización y biointegración tras su implantación en animales de experimentación *in vivo*. Uno de los mayores intereses de la presente investigación se debe a que el papel provasculogénico de las MSC

humanas no ha sido demostrado previamente en el ámbito de la cirugía oral y maxilofacial. En este sentido, el uso de las células MSC para la generación de sustitutos de la mucosa oral humana con un potencial de vascularización mejorado podría ser un enfoque importante para el tratamiento de pacientes con deficiencias en la mucosa oral, pudiendo mejorar significativamente las estrategias terapéuticas actuales.



## **HIPÓTESIS**

---





El reciente desarrollo durante los últimos años de métodos y técnicas de cultivo celular y de generación de biomateriales, además de nuevos protocolos en el ámbito de la Ingeniería Tisular ha permitido que la generación de tejidos artificiales sea una potencial herramienta con utilidad clínica para su uso como producto de Terapias Avanzadas. En este sentido, el grupo de investigación de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, CTS-115, donde la doctoranda ha desarrollado la presente Tesis Doctoral trabaja en la optimización de nuevos procesos de biofabricación de sustitutos de mucosa oral humana para contribuir a la obtención de nuevos sustitutos funcionalizados cuya composición molecular y bioquímica tenga una mayor analogía a la del tejido nativo que los tejidos artificiales generados hasta el momento.

A pesar de los importantes avances en el desarrollo de modelos artificiales de mucosa oral humana mediante técnicas de Ingeniería Tisular, el desarrollo de un modelo de mucosa oral humana con propiedades biomecánicas óptimas y con un inherente potencial vascular supone un reto para la Ingeniería Tisular de la región oral y maxilofacial.

En este sentido la Ingeniería Tisular, ofrece una alternativa terapéutica prometedora mediante la utilización de células, biomateriales y moléculas de señalización. Los recientes avances en Ingeniería Tisular de la mucosa oral se centran en la optimización de los biomateriales y la generación de mucosa oral humana con potencial vasculogénico. Uno de los principales retos en este campo es aumentar el grado de biomimeticidad de los modelos artificiales con la mucosa oral nativa, así como generar modelos de mucosa oral prevascularizados que incrementen el proceso de biointegración y regeneración de los tejidos.

Por este motivo, la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral artificial humana basados en la utilización de nuevos biomateriales y la incorporación de progenitores vasculares obtenidos a partir de MSC supone un avance en los procesos de biointegración y regeneración de la mucosa oral humana.

La futura aplicación clínica de los modelos mejorados de mucosa oral humana supondría un importante impacto sanitario y por tanto, una mejora en la calidad de vida de los pacientes.



## **OBJETIVOS**

---



## 1. Objetivo general

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es elaborar y evaluar nuevos modelos biomiméticos, estructurales y biomecánicos de distintos tipos de mucosa oral artificial para su posible utilización en la clínica.

## 2. Objetivos específicos

- Mejorar el biomaterial para la optimización de sus propiedades biomecánicas mediante la utilización de nuevos tipos de agarosas.
- Generar nuevos modelos de mucosa oral artificial humana utilizando cultivos de células de la mucosa oral humana y los biomateriales optimizados en el objetivo anterior.
- Funcionalizar la mucosa oral artificial humana mediante la incorporación de progenitores vasculares obtenidos a partir de nuevas fuentes celulares transdiferenciadas hacia la estirpe endotelial para favorecer la vascularización y, por tanto, la biointegración del sustituto de mucosa oral.
- Evaluar *in vitro* e *in vivo* los nuevos modelos de mucosa oral artificial humana generados a partir de los nuevos biomateriales y fuentes celulares con el objeto de identificar los prototipos más biomiméticos de los distintos tipos de mucosa oral humana (de revestimiento y masticatoria).



## **MATERIALES & MÉTODOS**

---





# **1. Optimización de nuevos biomateriales para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana**

## **1.1. Generación de nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana usando nuevos tipos de agarosas**

Con el fin de optimizar las propiedades biomecánicas del biomaterial de fibrina y agarosa previamente desarrollado por el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada CTS-115, se generaron seis grupos experimentales, cinco grupos estaban formados por la combinación de biomateriales fibrina y distintos tipos de agarosas (F-D1LE, F-D2LE, F-LM, F-MS8 y F-D5) y un grupo control elaborado a partir de fibrina (FIB). Todas las agarosas utilizadas en la presente Tesis Doctoral fueron suministradas por la empresa Hispanagar de Burgos, España.

Para la generación de los cinco primeros grupos experimentales (F-D1LE, F-D2LE, F-LM, F-MS8, F-D5) se mezclaron 760  $\mu\text{L}$  de plasma humano, 75  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo *Dulbecco modified Eagle's medium* (DMEM) (Merck Life Science, St. Louis, MO, EE. UU.) enriquecido con  $5 \times 10^3$  fibroblastos humanos, 15  $\mu\text{L}$  de ácido tranexámico (Amchafibrin™ 5 mg/mL, MEDA Pharma SL, Madrid, España), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  al 2% (Merck) y 100  $\mu\text{L}$  de cada tipo de agarosa (D1LE, D2LE, LM, MS8, D5) disueltas en solución salina (Merck) a cuatro concentraciones diferentes (0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,3% p/v).

Finalmente, como grupo control se elaboró un biomaterial a base de fibrina sin agarosa, el cual se denominó grupo FIB. En este caso, se llevó a cabo una mezcla de 760  $\mu\text{L}$  de plasma humano, 75  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo DMEM (Merck Life Science, St. Louis, MO, EE. UU.) enriquecido con  $5 \times 10^3$  fibroblastos humanos, 15  $\mu\text{L}$  de ácido tranexámico, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  al 2% y 100  $\mu\text{L}$  solución salina.

En todos los casos, los diferentes grupos experimentales se mantuvieron en cultivo en placas de seis pocillos (Corning Life Sciences, Corning, NY, EE. UU.) y se incubaron en condiciones de cultivo celular estándar a 37°C para favorecer la polimerización y gelificación de los biomateriales. Posteriormente, todos los

biomateriales optimizados fueron extraídos de las placas de cultivo y sometidos al proceso físico de compresión plástica denominado nanoestructuración. Este proceso consistió en aplicar 200 g de peso de forma individual en cada hidrogel durante 3 minutos con el fin de eliminar gran cantidad del agua y generar nuevos enlaces que mejoren las propiedades mecánicas de los sustitutos (Ionescu, Alaminos *et al.* 2011, Scionti, Moral *et al.* 2014, Carriel, Scionti *et al.* 2017).

## **1.2. Evaluación biomecánica de los nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana usando nuevos tipos de agarosas**

Una vez llevado a cabo el proceso de nanoestructuración, se realizó un corte de 3 cm de longitud y 1 cm de anchura en cada muestra y se fijó a las placas del analizador biomecánico Modelo 5943 (Nowood, MA, EE. UU.). Posteriormente, se analizaron empleando el software *BlueHill 3 Material Testing*. En este proceso, las muestras se sometieron a un esfuerzo de tensión controlado con una velocidad de deformación constante de 5 mm/min hasta la fragmentación del biomaterial. Con esta información se calculó el módulo de Young como el módulo tangente de la porción lineal de la curva tensión-deformación. Por otro lado, la carga a la rotura se midió como la fuerza a la que el material se fragmentó, mientras que la deformación a la fractura se calculó seleccionando el punto de la curva tensión-deformación en el que se produjo esta fractura. Todas las muestras se midieron utilizando exactamente las mismas condiciones, y se analizaron 6 muestras de cada tipo (n=6).

El análisis cuantitativo y estadístico se llevó a cabo mediante la medición de los parámetros biomecánicos de las muestras analizadas. Asimismo, se calculó el valor promedio y la desviación estándar de los grupos globales de las muestras (por ejemplo, todas las muestras que contenían un tipo específico de agarosa, independientemente de la concentración). A continuación, se analizó cada variable mediante la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de cada distribución. Como las distribuciones no cumplían los criterios de normalidad y parametricidad, se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## **2. Obtención de cultivos celulares para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana**

### **2.1. Fibroblastos de mucosa oral humana**

Con el objetivo de generar un tejido conectivo artificial mejorado de mucosa oral humana, se llevó a cabo el aislamiento de fibroblastos de mucosa oral humana (HFOM). Para llevar a cabo este proceso, se obtuvieron pequeñas biopsias de mucosa oral de donantes sanos sometidos a una cirugía oral menor con anestesia local. En primer lugar, las biopsias fueron transportadas al laboratorio en medio de transporte constituido por DMEM suplementado con un 2% de antibióticos y antimicóticos (100 U/mL de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomina y 0,25 mg/mL de anfotericina B) (Merck). Una vez recibidas las biopsias en el laboratorio, se llevaron a cabo tres lavados en solución salina. Posteriormente, se realizó una digestión enzimática del estroma utilizando una solución de 2 mg/mL de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 37°C durante 6 horas con agitación para su posterior centrifugación y cultivo celular. Los cultivos primarios de HFOM se cultivaron en DMEM, el cual fue suplementado al 10% con suero bovino fetal (SBF; Merck) y 1% de antibióticos y antimicóticos. Para el cultivo de estas células se emplearon frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

### **2.2. Células madre mesenquimales humanas**

Para generar modelos mejorados de mucosa oral humana previamente vascularizados, se requirió del uso de MSC. Estas células madre se obtuvieron de pequeñas biopsias humanas de tejido adiposo, médula ósea y pulpa dental. Las biopsias de tejido adiposo provenían de grasa inguinal. Las muestras llegaron al laboratorio en medio de transporte (DMEM suplementado con un 2% de antibióticos y antimicóticos). Tras realizarse tres lavados con solución salina, se realizó una digestión enzimática con colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* a 37°C durante 6 horas con agitación. La suspensión celular resultante se centrifugó y cultivo en DMEM suplementado al 10% con SBF y 1% de antibióticos y antimicóticos (Dori, Petrakis et al. 2017).

Por otro lado, para la obtención de BMSC se extrajo la médula ósea de fragmentos de fémur realizando lavados con DMEM suplementado al 10% con SBF y 1% de antibióticos y antimicóticos. La suspensión resultante se centrifugó y se cultivó en medio DMEM suplementado como ha sido descrito previamente (Cejka, Cejkova et al. 2016).

Por último, las células de la pulpa dental humana se obtuvieron de terceros molares sin patología pulpar o periodontal extraídos por prescripción dental (Garzon, Martin-Piedra *et al.* 2018, Martin-Piedra, Alfonso-Rodriguez *et al.* 2019). Para obtener las DPSC se realizó una digestión enzimática siguiendo los pasos que se ha descrito previamente para los HFOM y las ADSC. Una vez obtenidas las células se cultivaron en DMEM suplementado al 10% con SBF y 1% de antibióticos y antimicóticos

### **2.3. Células endoteliales de la vena umbilical humana**

Con el objetivo de verificar el potencial de vascularización de las MSC, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron utilizadas como control en la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana. Las HUVEC se obtuvieron comercialmente de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.).

Las células HUVEC se cultivaron en medio de cultivo de crecimiento endotelial (Merck), un medio con bajo contenido en suero (2% V/V) previamente optimizado para el cultivo de células endoteliales de grandes vasos sanguíneos.

En todos los casos descritos previamente, las células fueron cultivadas a 37°C en un incubador humificado con un 5% de CO<sub>2</sub>, empleando condiciones de cultivo celular estándar. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y una vez las células alcanzaban el 70% de confluencia, se disociaron empleando una solución de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,25% (Merck).

### **3. Caracterización de las células madre mesenquimales mediante citometría de flujo e histoquímica**

Con el objetivo de determinar el perfil de indiferenciación de las MSC empleadas en la presente Tesis Doctoral, se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo para estudiar los marcadores de superficie presentes en las MSC (ADSC, BMSC y DPSC). Para llevar a cabo la técnica de citometría de flujo se empleó el kit *Human MSC Analysis BD Stemflow™* (BD Biosciences, Lago Franklin, NJ, EE. UU.). En primer lugar, una vez los cultivos de MSC generados previamente alcanzaron una densidad celular superior al 80% fueron tripsinizados empleando tripsina-EDTA al 0,25%. A partir de la suspensión celular se prepararon soluciones con una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/mL en tubos de citometría de flujo de cada tipo celular, ADSC, BMSC y DPSC. A continuación, todas las células se lavaron con 2 mL de solución tamponada (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) y se bloquearon los receptores Fc incubando las células durante 5 minutos con 2 mL de solución salina, la cual contenía 0,1% de proteína de albúmina de suero bovino y 0,1% de SBF. Posteriormente, se llevó a cabo el marcaje de las células con un cóctel positivo de marcadores (APC-CD73, FITC-CD90 y PerCP-Cy-CD105) y un cóctel negativo (PE-CD45, PE-CD34, PE-CD11b, PE-CD19 y PE-HLA-DR). Las células ADSC, BMSC y DPSC fueron incubadas durante 45 minutos a 4°C en oscuridad. Una vez que las células fueron marcadas, se resuspendieron en una solución tamponada para su posterior análisis utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

Por otro lado, para confirmar el perfil de indiferenciación previamente obtenido mediante un ensayo de citometría de flujo, se llevó a cabo una diferenciación hacia linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico de las MSC (ADSC, BMSC y DPSC) y posteriormente un análisis histoquímico. Para llevar a cabo esto, todas las células (ADSC, BMSC y DPSC) fueron cultivadas en cámaras de cultivo celular (Nunc™ Lab-Tek™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una densidad celular de 5882 células/cm<sup>2</sup>, empleando DMEM suplementado durante 24 horas. Una vez las células se adhirieron a la superficie de la cámara de cultivo, el DMEM fue reemplazado por medio de inducción adipogénico, condrogénico y osteogénico, respectivamente. Para la inducción adipogénica, el

medio basal se complementó con 1 mM de dexametasona, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina y 5 mg/mL de insulina-transferrina-selenio (ITS). Por otro lado, para la inducción condrogénica, se añadieron 40 mg/mL de L-prolina, 100 µg/mL de piruvato, 10 ng/mL de TGF-β, 50 µM de ácido L-ascórbico y 5 mg/mL de ITS. Por último, para la inducción osteogénica, el medio basal se suplementó con 100 nM de dexametasona, 10 mM de β-glicerol fosfato y 50 µM de ácido L-ascórbico (todos los productos de Merck). Todas las células (ADSC, BMSC y DPSC) se cultivaron en los diferentes medios inductores durante 20 días (Nieto-Aguilar, Serrato *et al.* 2011).

Una vez concluido el periodo de inducción adipogénico, condrogénico y osteogénico, todas las células se lavaron con solución salina y se fijaron en etanol al 70%. Con el fin de detectar el fenotipo adipogénico, se llevó a cabo la tinción histoquímica de *oil red O* (0,7 mg en 100 mL de propilenglicol durante 5 minutos a 60°C). Por otro lado, la diferenciación condrogénica se confirmó mediante la tinción de mucopolisacáridos de azul alcian (1% de azul alcian y 3% de ácido acético glacial, pH 2,5). Por último, la diferenciación osteoblástica se detectó con la tinción de *alzarin red S* (2% durante 5 minutos a temperatura ambiente) para identificar cualquier signo de mineralización. Como controles técnicos se utilizaron cortes histológicos de tejido adiposo, cartilaginoso y óseo (Nieto-Aguilar, Serrato *et al.* 2011, Garzon, Perez-Kohler *et al.* 2012).

## **4. Diferenciación vascular *in vitro* de células madre mesenquimales**

Con el fin de inducir la diferenciación vascular y, por tanto, generar un modelo mejorado prevascularizado de mucosa oral humana, las ADSC, BMSC y DPSC previamente caracterizadas, se cultivaron durante 21 días en un medio de diferenciación endotelial. El medio de diferenciación endotelial, denominado medio 199 contenía un 20% de SBF, 1,5% de factor de crecimiento endotelial de tejido neural bovino, y 1,5% de antibióticos y antimicóticos (todo de Merck). El medio de diferenciación endotelial se cambió tres veces a la semana y cuando las células (ADSC, BMSC, DPSC) alcanzaron la subconfluencia, se llevó a cabo el proceso de tripsinización empleando una solución de tripsina-EDTA al 0,25%. Las células inducidas hacia estirpe vascular se denominaron células diferenciadas en la presente Tesis Doctoral: dADSC, dBMSC y dDPSC. Por otra parte, a modo de control, se utilizaron células sin diferenciar, que fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con SBF y 1% de antibióticos y antimicóticos. Estos grupos control fueron denominados como células no diferenciadas: ndADSC, ndBMSC, ndDPSC.

### **4.1. Análisis *in vitro* del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimales mediante inmunofluorescencia**

Para identificar la expresión de marcadores de diferenciación vascular relevantes en los tipos celulares ADSC, BMSC y DPSC, se llevó a cabo un análisis del perfil de diferenciación endotelial mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos anti-VEGF, anti-CD31 (PECAM-1), anti-*von Willebrand factor* (vWF) y anti-CD34. Estos análisis se llevaron a cabo tanto en las MSC no diferenciadas (ndADSC, ndBMSC ndDPSC), como en las MSC diferenciadas (dADSC, dBMSC, dDPSC). Como grupo control positivo del presente estudio se emplearon HUVEC y como grupo control negativo HFOM.

En primer lugar, para llevar a cabo el estudio de inmunofluorescencia se cultivaron  $1 \times 10^4$  células (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC, dADSC, dBMSC, dDPSC) en cámaras de cultivo celular. Una vez alcanzada la confluencia del 70% todas las muestras se lavaron con solución salina y se fijaron empleando



etanol al 70%. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de sitios inespecíficos con suero de caballo normal y caseína durante 30 minutos, respectivamente (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 12 horas con los respectivos anticuerpos primarios anti-VEGF, anti-CD31 (PECAM-1), anti-vWF y anti-CD34 (todos los anticuerpos de Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las especificaciones técnicas de cada anticuerpo se resumen en la Tabla 1. Finalmente, todas las muestras se lavaron con solución salina y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando anticuerpos anti-ratón conjugados con FITC (Merck) o anticuerpos anti-conejo conjugados con CY3 (Merck). Todas las muestras del estudio y los controles empleados se contrastaron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories) y se analizaron con un microscopio Eclipse 90i (Nikon Corp. Tokio, Japón).

Los resultados del estudio del perfil de diferenciación endotelial mediante inmunofluorescencia fueron evaluados por tres histólogos independientes utilizando un método semicuantitativo que califica la señal celular como fuertemente positiva (+++), positiva (++) , ligeramente positiva (+), poco positiva (+/-) o negativa (-).

ANTICUERPO	DILUCIÓN	REFERENCIA
Conejo Anti-VEGF	1:100 12h a 4°C	Abcam. Cambridge, Reino Unido. (ref. ab46154)
Ratón Anti-CD31 (PECAM-1)	1:500 12h a 4°C	Abcam. Cambridge, Reino Unido. (ref. ab76533)
Conejo Anti-vWF	1:100 12h a 4°C	Abcam. Cambridge, Reino Unido. (ref. ab6994)
Conejo Anti-CD34	1:2500 12h a 4°C	Abcam. Cambridge, Reino Unido. (ref. ab81289)
Anti-Ratón conjugado con FITC	1:500 1h a TA	Sigma-Aldrich/Merck. Steinheim, Alemania. (Cat. No. F0257)
Anti-Conejo conjugado con CY3	1:500 1h a TA	Sigma-Aldrich/Merck. Steinheim, Alemania. (Cat. No. C2306)

**Tabla 1.** Anticuerpos empleados para el análisis del perfil de diferenciación vascular de MSC mediante inmunofluorescencia *in vitro*. TA: temperatura ambiente.

## **4.2. Análisis *in vitro* del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimales mediante array de proteínas**

Para evaluar la expresión de proteínas que desempeñan un papel en la promoción de la vascularización en cultivos celulares primarios de MSC no diferenciadas (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC) y MSC diferenciadas (dADSC, dBMSC, dDPSC) se empleó un kit de array de angiogénesis humano (R&D Systems Inc., ARY007). Como grupo control positivo se emplearon HUVEC y como grupo control negativo HFOM.

Para llevar a cabo la detección de proteínas vinculadas con el proceso de vascularización se cultivaron  $1 \times 10^6$  células de cada tipo celular (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC, dADSC, dBMSC, dDPSC) en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 70% se tripsinizaron empleando una solución de tripsina-EDTA al 0,25%. La suspensión celular de cada grupo de estudio y de los controles se mezcló con 1 mL de solución de lisis celular MCL1 (Merck), respectivamente. Esta solución se compone de 20% de Tris-EDTA, 20% de NaCl, 20% de SDS (lauril sulfato), 20% de DOC (ácido desoxicólico), 20% de Igepal CA y un 1% de cóctel de inhibidores de proteasa. A continuación, los lisados celulares se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante. Para medir la concentración de proteínas en el producto de lisado obtenido se empleó el ensayo de cuantificación de proteínas Pierce BCA-200 (Thermo Fisher Scientific). El siguiente paso fue bloquear las membranas del array de proteínas y añadir a cada membrana 1 mL del extracto de proteínas correspondiente a cada tipo de muestra (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC, dADSC, dBMSC, dDPSC) con una concentración final de 300 µg/mL en cada caso. A continuación, todas las muestras se trataron con 15 µL de cóctel de anticuerpos de detección reconstituido, se lavaron y se incubaron con 2 mL de Streptavidina-HRP.

Por último, tras lavar las muestras se extendió la solución de detección por todas las membranas y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación, se expuso cada membrana a una película de detección de rayos X durante 10 minutos.

Para completar el análisis, se escanearon todas las películas y se cuantificó la intensidad de la señal en cada punto utilizando el software *Image J* (Wayne Rasband, NIH). Todos los análisis de este estudio se realizaron por triplicado (n=3).

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados de expresión proteica obtenidos con el kit de array de angiogénesis humana, primero se determinó la media del número de veces que aumentó la expresión proteica de las MSC no diferenciadas frente a las MSC diferenciadas del mismo tipo celular (ndADSC vs dADSC, ndBMSC vs dBMSC, ndDPSC vs dDPSC). A continuación, se aplicó la prueba exacta de Mann-Whitney para comparar los resultados obtenidos para las células diferenciadas frente a las células no diferenciadas del mismo tipo celular (por ejemplo, dADSC frente a ndADSC). Se seleccionaron como estadísticamente significativas las proteínas que mostraban en primer lugar, un aumento de la expresión de al menos un 20% tras la diferenciación (número de veces > 1,20) y, en segundo lugar, un valor  $p < 0,05$  en la prueba exacta de Mann-Whitney.

## 5. Generación de modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial de vasculogénico

Con el fin de determinar el potencial de vascularización de cada tipo celular estudiado (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC, dADSC, dBMSC, dDPSC), las células previamente caracterizadas y diferenciadas hacia linaje vascular se utilizaron para generar modelos mejorados de mucosa oral humana empleando protocolos de IT. En concreto, se desarrollaron hidrogeles utilizando los biomateriales de fibrina y agarosa previamente optimizados en la presente Tesis Doctoral. Para desarrollar los biomateriales optimizados se utilizó agarosa tipo VII, químicamente homóloga a la agarosa LM.

Para esto, en primer lugar, se tomaron 15,2 mL de plasma humano y 2,25 mL de medio de cultivo DMEM enriquecido con 10% de SBF y 1% de antibiótico y antimicóticos. El medio de cultivo enriquecido contenía  $2,5 \times 10^5$  fibroblastos de mucosa oral en combinación con  $2,5 \times 10^5$  células de cada uno de los tipos de MSC diferenciadas a estirpes vasculares utilizadas en la presente Tesis Doctoral (dADSC, dBMSC, dDPSC) y sus respectivos controles experimentales no diferenciados (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC). Como control positivo, se realizaron modelos pre-vascularizados de mucosa oral humana enriqueciendo la solución de medio DMEM con  $2,5 \times 10^5$  de HFOM y  $2,5 \times 10^5$  de HUVEC. Asimismo, como control negativo se elaboraron modelos de mucosa oral utilizando  $5 \times 10^5$  HFOM.



**Figura 8.** Esquema del protocolo de generación de modelos mejorados de mucosa oral humana a base de fibrina-agarosa (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

Una vez mezclado el plasma humano y el medio de cultivo que contenía las diferentes poblaciones celulares de estudio, se agregaron 3 mL de  $\text{CaCl}_2$  al 1% y 1 mL de agarosa químicamente homologa a la agarosa LM, previamente optimizada (Figura 8). Finalmente, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de ácido tranexámico y la mezcla fue alicuotada en placas de seis pocillos con soportes permeables Transwell de 24 mm (Corning Life Sciences).

A manera de resumen, a continuación, se exponen los cuatro modelos de mucosa oral humana desarrolladas en la presente Tesis Doctoral (Figura 9).

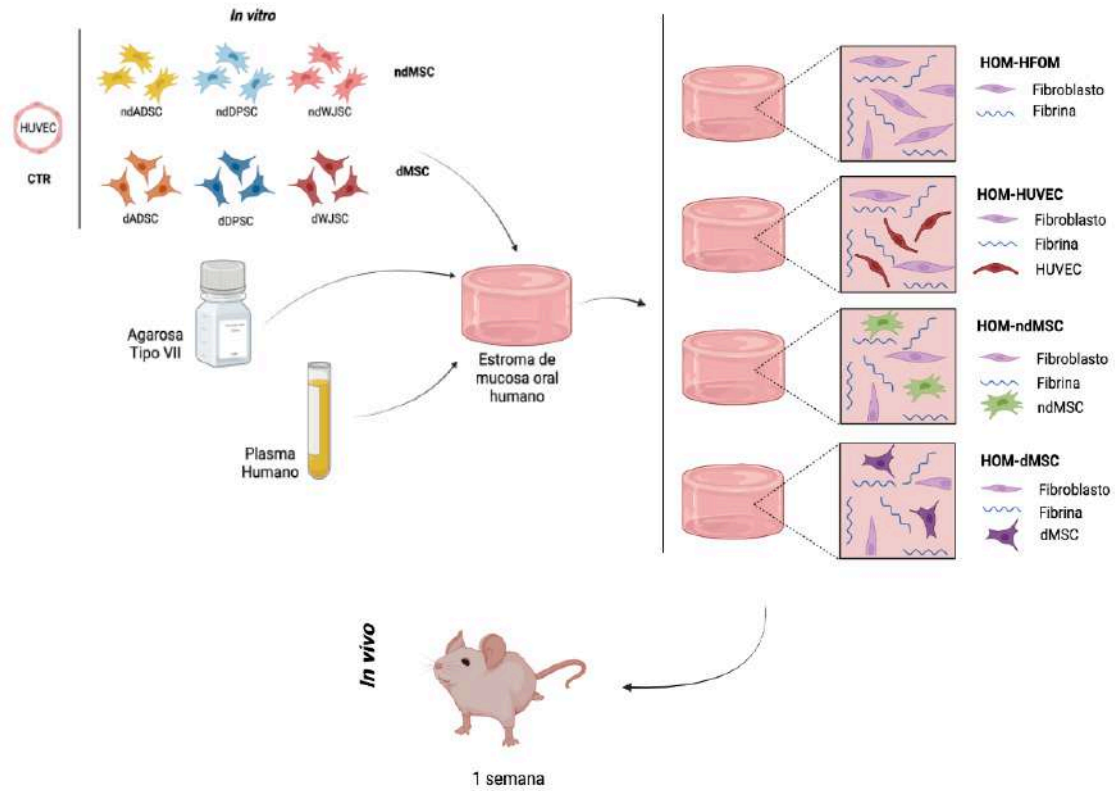
1) Mucosa oral humana artificial que contenía  $5 \times 10^5$  HFOM (HOM-HFOM). Empleado como control negativo del estudio.

2) Mucosa oral humana artificial que contenía  $2,5 \times 10^5$  HFOM y  $2,5 \times 10^5$  HUVEC (HOM-HUVEC). Este sustituto se empleó como control positivo del estudio.

3) Mucosa oral humana artificial que contenía  $2,5 \times 10^5$  HFOM y  $2,5 \times 10^5$  MSC no diferenciadas (HOM-ndADSC, HOM-ndBMSC, HOM-ndDPSC).

4) Mucosa oral humana artificial que contenía  $2,5 \times 10^5$  HFOM y  $2,5 \times 10^5$  MSC diferenciadas (HOM-dADSC, HOM-dBMSC, HOM-dDPSC).

En este contexto, el modelo mejorado de mucosa oral humana se llevó a cabo a partir de dos estrategias de biofabricación. En primer lugar, la optimización previa de los biomateriales de fibrina y agarosa. En segundo lugar, el uso de MSC diferenciadas hacia linaje vascular con el objetivo de mejorar las propiedades funcionales de los modelos de mucosa oral humana previamente desarrollados por el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada.



**Figura 9.** Representación esquemática de los grupos experimentales empleados en la presente Tesis Doctoral para la elaboración de modelos mejorados de mucosa oral humana (elaborado en la aplicación en línea biorender.com).

## **6. Evaluación *in vivo* de los modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial vasculogénico**

Para determinar el potencial de vascularización *in vivo* de cada modelo mejorado de mucosa oral artificial, los sustitutos artificiales se implantaron en ratones atímicos inmunodeficientes Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>. Brevemente, los ratones atímicos fueron anestesiados utilizando una mezcla de 0,001 mg/g del peso corporal de cada animal de acepromazina-Calmo-Neosan™ (Boehringer Ingelheim) y 0,15 mg/g del peso corporal de ketamina-Imalgene 1000 (laboratorios Merial).

A continuación, se extirpó quirúrgicamente un área de piel de 24 mm<sup>2</sup> de la zona escapular de cada animal. Los modelos mejorados de mucosa oral humana mecánicamente optimizados y prevascularizados desarrollados mediante protocolos de IT se tallaron con el mismo diámetro y se implantaron en el lugar de la lesión. Durante el procedimiento quirúrgico se empleó material de sutura absorbible, y un anillo de silicona de 24 mm<sup>2</sup> que se suturó a los bordes para evitar la contracción de los límites de la lesión.

Todos los ratones atímicos fueron eutanasiados una semana después de la implantación de los sustitutos mejorados de mucosa oral para realizar el análisis histológico e inmunohistoquímico correspondiente.

### **6.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico**

Todas las muestras de estudio (dADSC, dBMSC, dDPSC, ndADSC, ndBMSC, ndDPSC) de los modelos mejorados de mucosa oral humana fueron fijadas en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina para poder obtener secciones histológicas de 5 µm de grosor. Posteriormente, las secciones de tejido fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas con hematoxilina-eosina (HE) para su posterior análisis histológico.

Para el análisis inmunohistoquímico se emplearon marcadores vasculares (anti-VEGF, anti-CD31 (PECAM-1), anti-vWF y anti-CD34, todos de Abcam) y el marcador que detecta el antígeno específico presente en las mitocondrias humanas (anti-Mitocondria clon 113-1, de Merck) siguiendo las especificaciones técnicas para cada anticuerpo que se recogen en la tabla 2. En primer lugar, las secciones de tejido se desparafinaron utilizando xilol y se rehidrataron mediante

una serie de lavados en concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 96%, 70%, 50%) para acabar en agua destilada. A continuación, se llevó a cabo el proceso de recuperación antigénica con tampón citrato 0,01 M, pH 6, o tampón EDTA 0,01 M, pH 8, durante 20 minutos a 95°C. En el siguiente paso, las muestras se prehibridaron durante 30 minutos con suero de caballo normal y caseína. Una vez realizado el bloqueo de sitios inespecíficos, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (anti-VEGF, anti-CD31 (PECAM-1), anti-vWF y anti-CD34) a 4°C durante toda la noche con las diluciones indicadas en la tabla 2. Al día siguiente se lavaron con solución salina y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. El complejo epítipo-anticuerpo se detectó utilizando 3,3-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories), y las secciones de tejido se contrastaron durante 20 segundos con el colorante de Hematoxilina de Harris.

En todos los casos, las imágenes se obtuvieron con un escáner Pannoramic® DESK II DW (3D Histotech, Budapest, Hungría).

El análisis cuantitativo se llevó a cabo midiendo el número de células que mostraban una señal positiva en el área celular de los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados para determinar la presencia de células comprometidas con el linaje vascular. Además, se analizó la densidad de microvasos (DMV) cuantificando el número de vasos sanguíneos por mm<sup>2</sup> de superficie tisular en la zona de la interfase vascular entre el huésped y el modelo mejorado de mucosa oral humana.

Por otro lado, para el análisis estadístico de los marcadores vasculares, los resultados de las células que mostraban una señal positiva o la cuantificación de los vasos sanguíneos para cada marcador vascular estudiado se compararon con el control negativo HOM-HFOM y con el control positivo HOM-HUVEC mediante la prueba exacta de Mann-Whitney por parejas, ya que las muestras no cumplían los criterios de normalidad.

Todas las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo utilizando el software *Real Statistics Resource Pack* (Dr. Charles Zaiontz, Purdue University, West Lafayette, IN, EE. UU.) disponible en [www.real-statistics.com](http://www.real-statistics.com).



ANTICUERPO	DILUCIÓN / INCUBACIÓN	RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA	REFERENCIA
Ratón Anti- <i>Mitocondria</i>	1:80 12h a 4°C	EDTA pH 8 20 min a 95°C	Merck Life Science. (MAB1273)
Conejo Anti-VEGF	1:100 12h a 4°C	EDTA pH 8 20 min a 95°C	Abcam (ref. ab46154)
Ratón Anti-CD31 (PECAM-1)	1:500 12h a 4°C	Citrato pH 6 20 min a 95°C	Abcam (ref. ab76533)
Conejo Anti-vWF	1:100 12h a 4°C	Citrato pH 6 20 min a 95°C	Abcam (ref. ab6994)
Conejo Anti-CD34	1:2500 12h a 4°C	Citrato pH 6 20 min a 95°C	Abcam (ref. ab81289)
ImmPRESS® HRP Anti-Conejo IgG (Peroxidasa)	Ready to use. 30 min at TA	-	Vector Laboratories (ref. MP-7401)
ImmPRESS® HRP Anti-Ratón IgG (Peroxidasa)	Ready to use. 30 min at TA	-	Vector Laboratories (ref. MP-7402)

**Tabla 2.** Anticuerpos empleados para la evaluación de los modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial vasculogénico in vivo. TA: temperatura ambiente.

## 6.2. Aprobación del comité de investigación y declaración de ética

Este estudio y la donación de los tejidos humanos utilizados en la presente Tesis Doctoral (mucosa oral, grasa, médula ósea y pulpa dental) fueron aprobados por el Comité de Investigación y Ética de la Investigación Biomédica de Granada (Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica, ref. 0116-N-19, fecha de aprobación 29/05/2019). Todos los donantes de tejidos que han participado en este estudio dieron su consentimiento informado. La experimentación animal fue aprobada por el Comité de Ética y Experimentación Animal de Granada (CEEA) y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía, España, código de protocolo 08/07/2019/123, fecha de aprobación, 10/09/2019.

## **RESULTADOS**

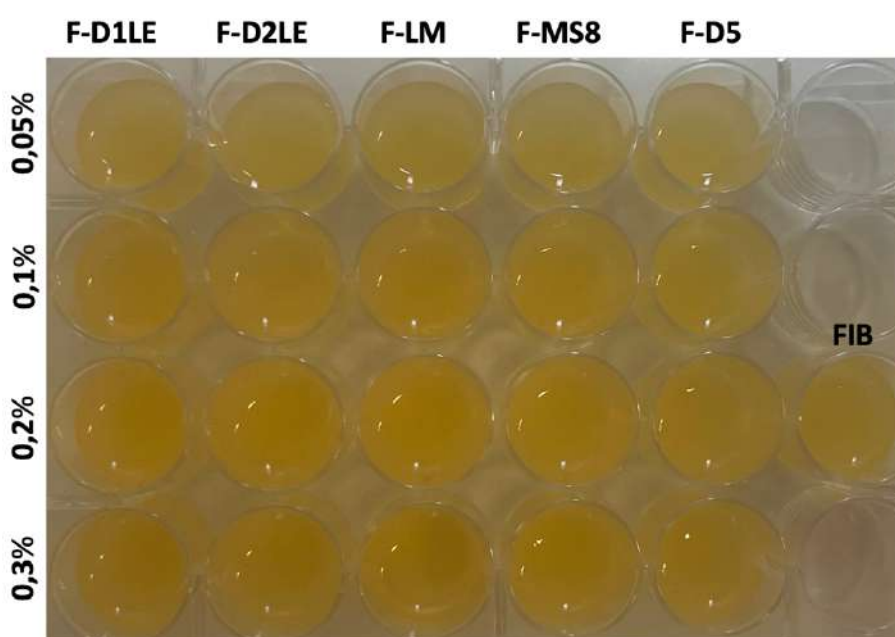
---



# 1. Evaluación del proceso de optimización de nuevos biomateriales para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana

## 1.1. Generación de nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana usando nuevos tipos de agarosas

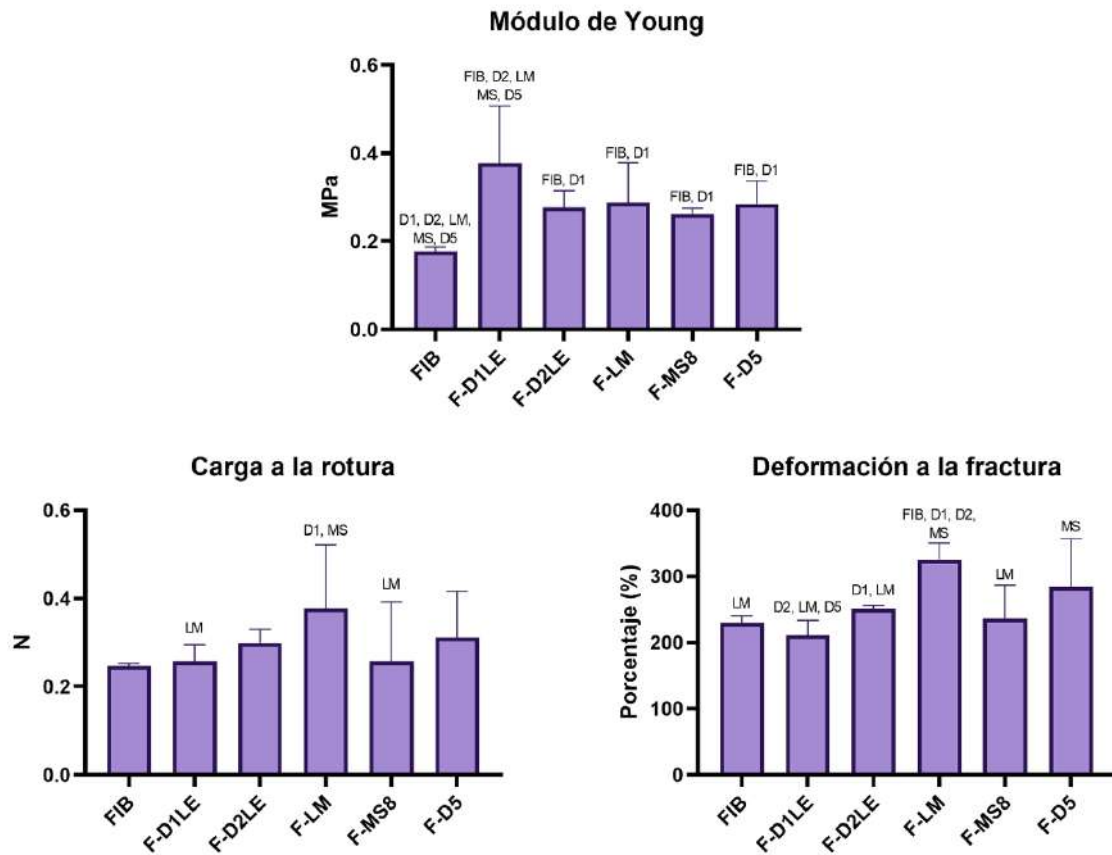
En general, todos los biomateriales generados mediante protocolos de IT empleando los diferentes tipos de agarosas (D1LE, D2LE, LM, MS8, D5 a concentraciones 0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,3% p/v respectivamente) mostraron una coloración y consistencia uniforme, en la que no se identificaron diferencias macroscópicas considerables. En concreto, el grupo compuesto por fibrina y agarosa del grupo D2LE a la concentración del 0,3% gelificó rápidamente, y no pudo combinarse adecuadamente con la fibrina para formar un gel homogéneo que soportase el análisis, motivo por el cual no se realizaron mediciones en este grupo (Figura 10).



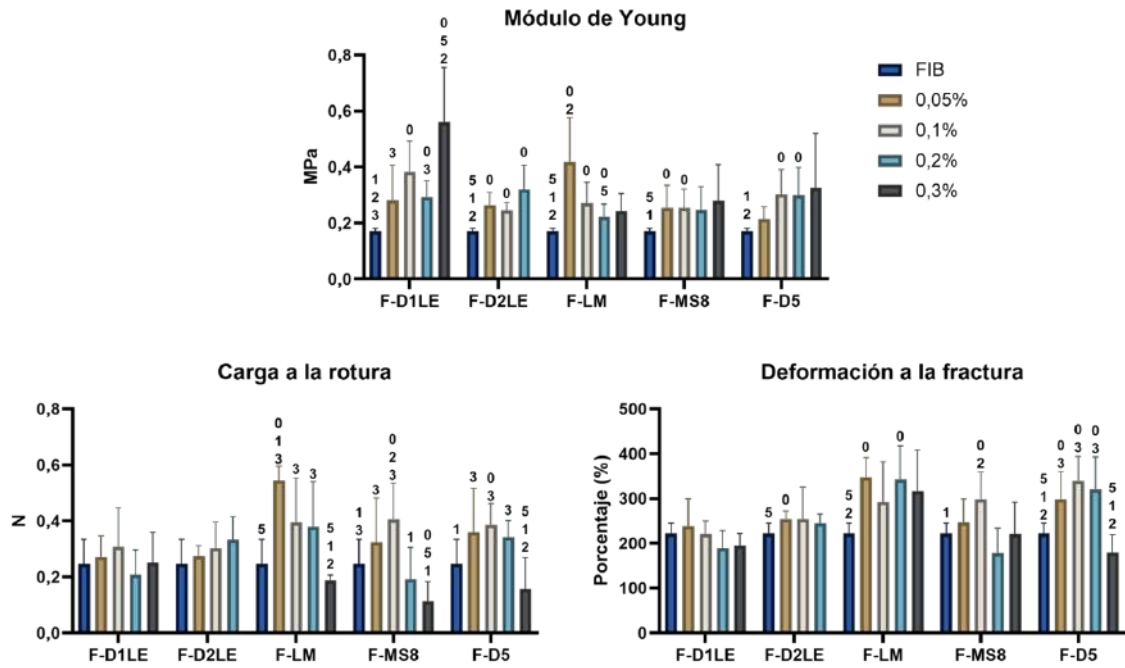
**Figura 10.** Evaluación macroscópica de los nuevos biomateriales desarrollados para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana. FIB: biomateriales de fibrina sin agarosa; F-D1LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D1LE; F-D2LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D2LE; F-LM: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo LM; F-MS8: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo MS8; F-D5: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D5.

## 1.2. Propiedades biomecánicas de los nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana

La evaluación de los principales parámetros biomecánicos en los biomateriales compuestos por fibrina-agarosa permitió demostrar que el tipo y la concentración de agarosa influían en las propiedades biomecánicas de los biomateriales analizados (Figura 11 y 12).



**Figura 11.** Evaluación de las propiedades biomecánicas de los nuevos biomateriales desarrollados para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana. Las gráficas representan los resultados obtenidos para cada grupo global de muestras independientemente de la concentración de agarosa. FIB: biomateriales de fibrina sin agarosa; F-D1LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D1LE; F-D2LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D2LE; F-LM: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo LM; F-MS8: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo MS8; F-D5: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D5. Aquellas muestras que presentan diferencias estadísticamente significativas con alguno de los grupos estudiados han sido etiquetadas como FIB (diferencia con el grupo control FIB), D1 (diferencias con el grupo F-D1LE), D2 (diferencias con el grupo F-D2LE), LM (diferencias con el grupo F-LM), MS (diferencias con el grupo F-MS8) y D5 (diferencias con el grupo F-D5).



**Figura 12.** Comportamiento biomecánico de los nuevos biomateriales desarrollados para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana. Las gráficas representan los resultados obtenidos en cada tipo específico de muestra, con las diferentes concentraciones de agarosa (0%, 0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,3%) representadas en diferentes barras de color. FIB: biomateriales de fibrina sin agarosa; F-D1LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D1LE; F-D2LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D2LE; F-LM: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo LM; F-MS8: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo MS8; F-D5: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D5. Las diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones se etiquetan con 0 (diferencias con el grupo FIB), 5 (diferencias con el grupo 0,05%), 1 (diferencias con el grupo 0,1%), 2 (diferencias con el grupo 0,2%) y 3 (diferencias con el grupo 0,3%).

En el análisis para el módulo de Young, la comparación global entre todos los grupos generados con fibrina-agarosa reveló que los hidrogeles generados usando la agarosa tipo D1LE tenía un valor significativamente mayor a los grupos F-D2LE, F-LM, F-MS8 y F-D5, como se muestra en la figura 11 y tabla 3. Además, el módulo de Young era significativamente mayor en la mayoría de los hidrogeles generados con fibrina-agarosa en comparación con el grupo control (FIB). Las diferencias halladas entre los distintos tipos de agarosas se resumen en la figura 12 y tabla 3.

En cuanto al análisis del parámetro de carga a la rotura se identificaron diferencias significativas entre el grupo F-LM y los grupos F-D1LE y F-MS8

(figura 11 y tabla 3). De este modo, los valores más altos obtenidos en este análisis corresponden a las concentraciones del 0,05% de la agarosa tipo LM, como se representa en la figura 12 y tabla 4.

Por último, el estudio de deformación a la fractura demostró que el hidrogel generado con la agarosa de tipo LM tenía el valor más alto, con diferencias estadísticamente significativas en los grupos FIB, F-D1LE, F-D2LE y F-MS8.

	<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Deformación a la fractura (%)</b>	<b>Carga a la rotura (N)</b>
FIB vs. F-D1LE	<b>0,00022*</b>	0,46221	0,97985
FIB vs. F-D2LE	<b>0,00001*</b>	0,05586	0,27959
FIB vs. F-LM	<b>0,00057*</b>	<b>0,00158*</b>	0,05166
FIB vs. MS8	<b>0,00753*</b>	0,82024	0,97985
FIB vs. F-D5	<b>0,00051*</b>	0,07312	0,25063
F-D1LE vs. F-D2LE	<b>0,04809*</b>	<b>0,00265*</b>	0,13152
F-D1LE vs. F-LM	<b>0,03742*</b>	<b>&lt;0,00001*</b>	<b>0,00539*</b>
F-D1LE vs. MS8	<b>0,00676*</b>	0,26377	0,67527
F-D1LE vs. F-D5	<b>0,04149*</b>	<b>0,00149*</b>	0,13051
F-D2LE vs. F-LM	0,79180	<b>0,00055*</b>	0,10041
F-D2LE vs. F-MS8	0,28339	0,41286	0,13824
F-D2LE vs. F-D5	0,69669	0,11282	0,62375
F-LM vs. F-MS8	0,56008	<b>0,00021*</b>	<b>0,00825*</b>
F-LM vs. F-D5	0,79845	0,09271	0,08433
F-MS8 vs. F-D5	0,66038	<b>0,04828*</b>	0,17186

**Tabla 3.** Valores estadísticos de *p* para la comparación global de las propiedades biomecánicas de los nuevos biomateriales desarrollados para la fabricación de modelos mejorados de mucosa oral humana. Los análisis se realizaron entre tipos de biomaterial (independientemente de la concentración de agarosa). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita y con asteriscos (\*). FIB: biomateriales de fibrina sin agarosa; F-D1LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D1LE; F-D2LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D2LE; F-LM: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo LM; F-MS8: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo MS8; F-D5: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D5.

	0,05% vs FIB	0,01% vs FIB	0,2% vs FIB	0,3% vs FIB	0,05% vs 0,1%	0,05% vs 0,2%	0,05% vs 0,3	0,1% vs 0,2%	0,1% vs 0,3%	0,2% vs 0,3%
<b>Módulo de Young</b>										
<b>F-D1LE</b>	0,06494	<b>0,00866*</b>	<b>0,00216*</b>	<b>0,00216*</b>	0,24026	0,48485	<b>0,02597*</b>	0,06494	0,09307	<b>0,02597*</b>
<b>F-D2LE</b>	<b>0,00216*</b>	<b>0,00216*</b>	<b>0,00216*</b>	-	0,58874	0,24026	-	0,24026	-	-
<b>F-LM</b>	<b>0,00216*</b>	<b>0,00433*</b>	<b>0,02597*</b>	0,06494	0,09307	<b>0,02597*</b>	0,13203	0,17965	0,48485	0,39394
<b>F-MS8</b>	<b>0,02597*</b>	<b>0,00216*</b>	0,06494	0,39394	0,93723	0,58874	0,93723	0,93723	0,58874	0,69913
<b>F-D5</b>	0,06494	<b>0,00216*</b>	<b>0,00866*</b>	0,39394	0,13203	0,24026	0,93723	0,93723	0,93723	0,93723
<b>Deformación a la fractura</b>										
<b>F-D1LE</b>	0,81818	0,81818	0,17965	0,13203	0,58874	0,09307	0,24026	0,17965	0,17965	0,93723
<b>F-D2LE</b>	<b>0,00866*</b>	0,81818	0,09307	-	0,93723	0,93723	-	0,93723	-	-
<b>F-LM</b>	<b>0,00216*</b>	0,13203	<b>0,00216*</b>	0,93723	0,24026	0,93723	0,24026	0,30952	0,58874	0,24026
<b>F-MS8</b>	0,30952	<b>0,04113*</b>	0,09307	0,58874	0,13203	0,06494	0,48485	<b>0,00866*</b>	0,13203	0,17965
<b>F-D5</b>	<b>0,04113*</b>	<b>0,00216*</b>	<b>0,01515*</b>	0,09307	0,39394	0,69913	<b>0,00866*</b>	0,93723	<b>0,00216*</b>	<b>0,00433*</b>
<b>Carga a la rotura</b>										
<b>F-D1LE</b>	0,81818	0,39394	0,39394	0,93723	0,81818	0,30952	0,69913	0,17965	0,58874	0,48485
<b>F-D2LE</b>	0,69913	0,39394	0,24026	-	0,93723	0,17965	-	0,48485	-	-
<b>F-LM</b>	<b>0,00216*</b>	0,06494	0,17965	0,13203	<b>0,01515*</b>	0,06494	<b>0,00216*</b>	0,58874	<b>0,02597*</b>	<b>0,00433*</b>
<b>F-MS8</b>	0,58874	<b>0,02597*</b>	0,48485	<b>0,02597*</b>	0,30952	0,17965	<b>0,00866*</b>	<b>0,01515*</b>	<b>0,00866*</b>	0,30952
<b>F-D5</b>	0,24026	<b>0,02597*</b>	0,06494	0,09307	0,69913	0,81818	<b>0,04113*</b>	0,39394	<b>0,01515*</b>	<b>0,00866*</b>

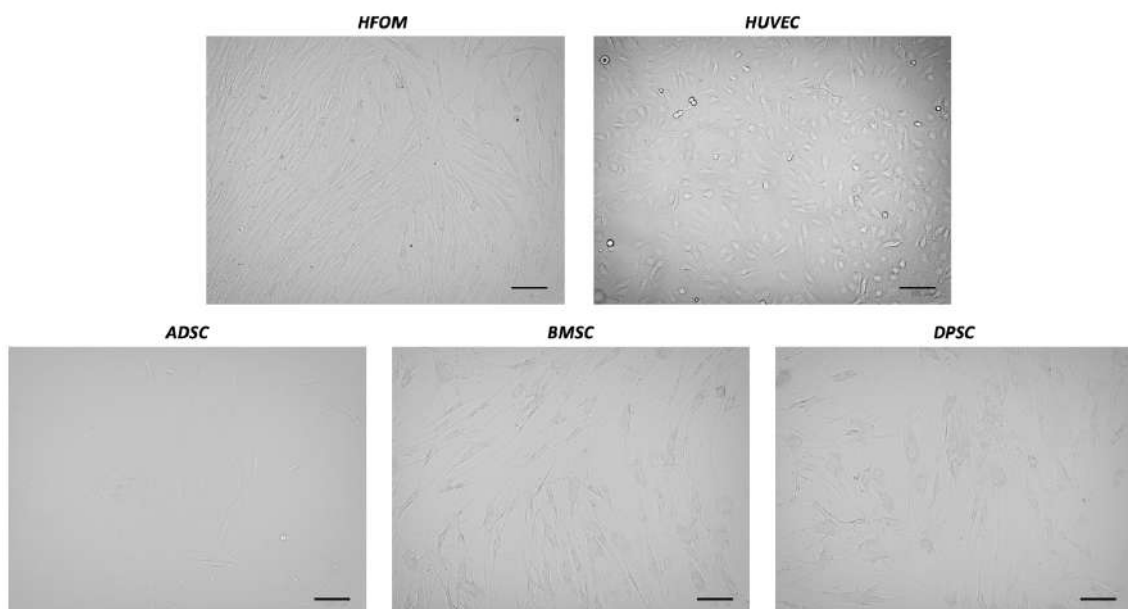
**Tabla 4.** Valores estadísticos de p para la comparación entre los diferentes grupos de agarosas de las propiedades biomecánicas. Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita y con asteriscos (\*). FIB: biomateriales de fibrina sin agarosa; F-D1LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D1LE; F-D2LE: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D2LE; F-LM: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo LM; F-MS8: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo MS8; F-D5: biomateriales de fibrina-agarosa, con agarosa tipo D5.



## 2. Evaluación del proceso de obtención de cultivos celulares para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana

El proceso de obtención de cultivos primarios de fibroblastos de mucosa oral humana (HFOM), células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), células madre mesenquimales derivadas de la grasa (ADSC), células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSC) y células madre mesenquimales de la pulpa dental (DPSC) reveló niveles de confluencia superiores al 80%, especialmente en los grupos HFOM y HUVEC tras 7 días de cultivo *in vitro*. Sin embargo, en el caso de BMSC se observó un nivel inferior al 80%. En el caso de los grupos de ADSC y DPSC se identificó subconfluencia celular. Todas las células mostraron una morfología fusiforme como se observa en la figura 13.

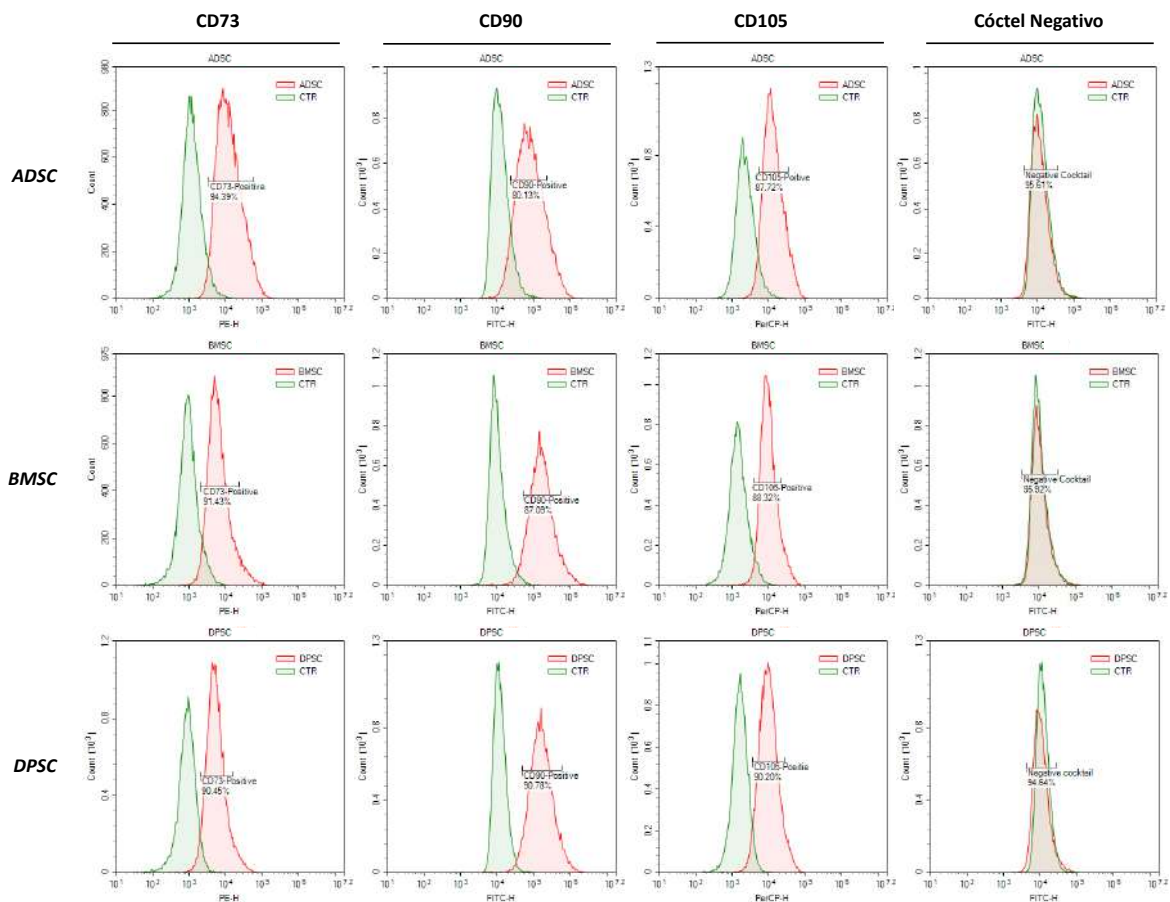
En todos los casos, los métodos de aislamiento celular a partir del uso de técnicas enzimáticas mostraron adecuada degradación de la MEC y liberación celular, lo que permitió el establecimiento de cultivos primarios *in vitro* de HFOM, ADSC, BMSC y DPSC.



**Figura 13.** Imágenes de microscopía de contraste de fases tras el aislamiento y cultivo de los fibroblastos de mucosa oral (HFOM), las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), las células madre mesenquimales derivadas de la grasa (ADSC), las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSC) y las células madre mesenquimales de la pulpa dental (DPSC). Barra de escala: 100 µm.

### 3. Evaluación del proceso de caracterización de las células madre mesenquimales

La evaluación de los cultivos de MSC (ADSC, BMSC y DPSC) confirmó el primer criterio postulado por Dominici en el año 2006 (Dominici, Le Blanc *et al.* 2006). Este primer criterio a seguir en el proceso de caracterización fenotípico de MSC consiste en confirmar la adherencia celular de las MSC a la superficie de cultivo. En este sentido, todas las MSC (ADSC, BMSC, DPSC) empleadas en la presente Tesis Doctoral confirmaron su adherencia a la superficie de cultivo *in vitro* (Figura



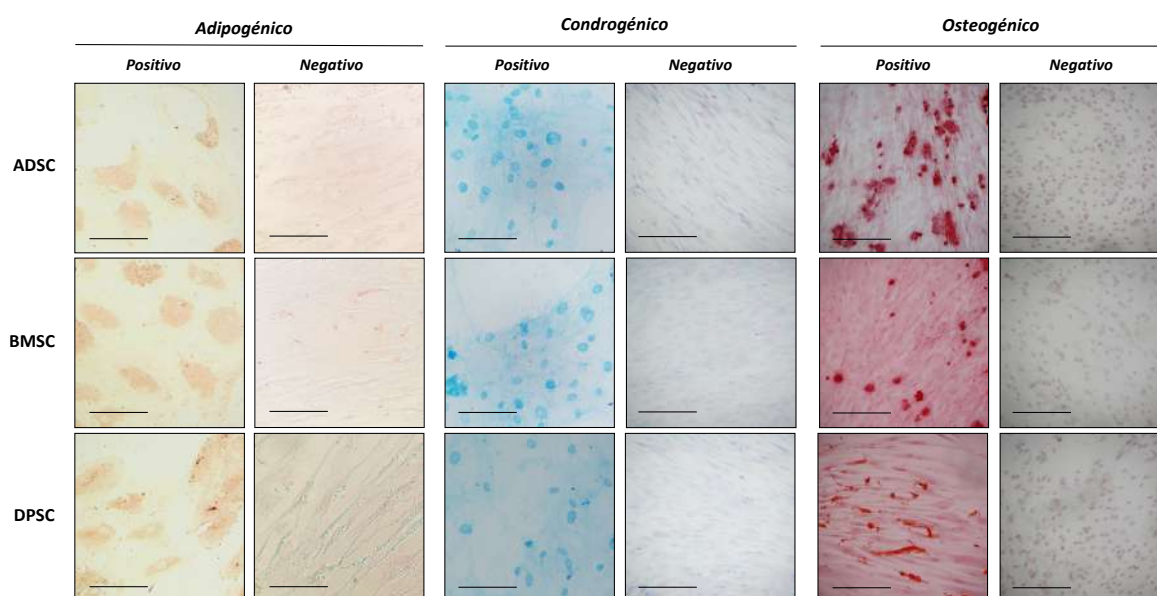
13).

**Figura 14.** Evaluación del perfil de indiferenciación de las MSC mediante la detección de los marcadores de superficie celular CD73, CD90 y CD105 mediante citometría de flujo.

En segundo lugar, se confirmó la morfología fusiforme en todas las poblaciones celulares tal y como se describió previamente en la figura 13. En este contexto, una vez confirmada la adherencia y la morfología de las MSC se analizó su perfil de indiferenciación mediante citometría de flujo. El análisis citométrico demostró que ADSC, BMSC y DPSC eran positivas para los marcadores mesenquimales

CD73, CD90 y CD105. En concreto, el análisis del marcador CD73 mostró un 94,39% de células positivas en las ADSC, un 91,43% en las BMSC y un 90,45% en las DPSC. Por otro lado, el marcador mesenquimal CD90 fue positivo en el 80,13% de las ADSC, el 87,09% de las BMSC y el 90,78% de las DPSC. Por último, el marcador CD105 fue positivo en el 87,72% de las ADSC, el 88,32% de las BMSC y el 90,20% de las DPSC. Los marcadores del cóctel negativo (CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y HLA-DR) estaban ausentes en todos los tipos de células madre mesenquimales analizados (Figura 14).

Por otro lado, el tercer principio descrito por Dominici para garantizar la pureza de las poblaciones celulares de células mesenquimales consiste en comprobar su multipotencialidad a través de procesos de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica, mediante el uso de medios de inducción. En este contexto, las ADSC, BMSC y DPSC empleadas en la presente Tesis Doctoral demostraron ser MSC con carácter multipotencial tras su diferenciación a estirpes de tipo mesodérmico, como son la adipogénica, la condrogénica y la osteogénica (Figura 15).



**Figura 15.** Caracterización de la capacidad de diferenciación a múltiples linajes mesodérmicos de las ADSC, BMSC y DPSC, tras la inducción adipogénica, condrogénica y osteogénica. Barra de error: 100  $\mu$ m.

En el caso de la diferenciación adipogénica de MSC (ADSC, BMSC, DPSC) se observaron depósitos de lípidos neutrales a través de la tinción *oil red O*, como se observa en la figura 15. Además, tras la diferenciación condrogénica todas

las MSC mostraron la presencia extracelular de polisacáridos con la tinción de azul alcian. Finalmente, la diferenciación osteogénica reveló la presencia de depósitos cálcicos en todas las MSC con la tinción *alzarin red S*.

El proceso de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica se realizó en presencia de un control experimental que no fue sometido al cultivo con medios de inducción, el cual resultó ser negativo para los tres tipos de diferenciación celular empleados (adipogénico, condrogénico y osteogénico).

## 4. Evaluación del proceso de diferenciación vascular *in vitro* de las células madre mesenquimales

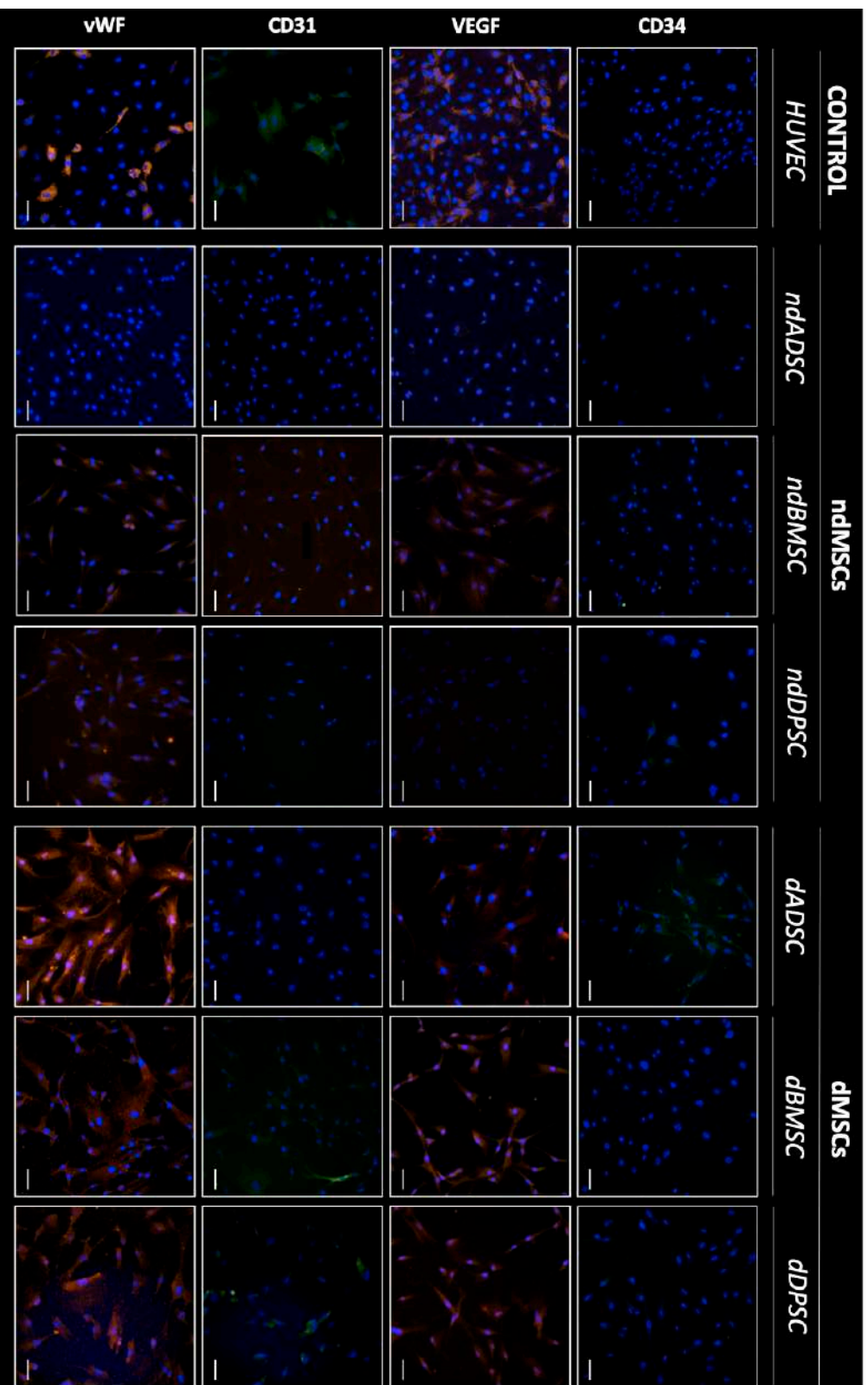
### 4.1. Análisis *in vitro* del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimales mediante inmunofluorescencia

El análisis semicuantitativo del potencial de diferenciación vascular de las MSC reveló que el grupo control HUVEC expresaba los marcadores vasculares VEGF, CD31 y vWF, sin embargo, estas células fueron negativas para el marcador CD34. En el caso de las MSC no diferenciadas, la mayoría de los marcadores vasculares fueron negativos, excepto en el caso del grupo ndBMSC, que presentó una expresión ligeramente positiva de los marcadores VEGF y vWF. Además, el grupo de ndDPSC reveló una expresión ligeramente positiva del marcador vascular vWF.

Por otro lado, cuando las MSC fueron inducidas hacia linaje vascular *in vitro*, se observó un aumento en la expresión de los marcadores VEGF, CD31 y vWF. En el caso del marcador VEGF, se detectó una señal ligeramente positiva en el grupo dADSC y una señal positiva en dBMSC y dDPSC, mientras que la señal de CD31 fue ligeramente positiva en dBMSC y dDPSC. Por otro lado, los resultados del marcador vascular vWF mostraron una señal positiva intensa en dADSC, además, de una señal positiva en dBMSC y dDPSC. Por último, el marcador CD34 fue negativo en todos los tipos celulares analizados (Figura 16; Tabla 5).

	HUVEC	ndADSC	ndBMSC	ndDPSC	dADSC	dBMSC	dDPSC
<b>CD31</b>	+	-	-	-	-	+/-	+/-
<b>CD34</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>VEGF</b>	+	-	+	-	+	++	++
<b>vWF</b>	+++	-	+	+/-	+++	++	++

**Tabla 5.** Análisis semicuantitativo de la expresión de marcadores vasculares relevantes en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), MSC no diferenciadas (ndMSC) y MSCs diferenciadas *in vitro* (dMSCs). La expresión se clasificó como fuertemente positiva (+++), positiva (++), ligeramente positiva (+), poco positiva (+/-) o negativa (-).

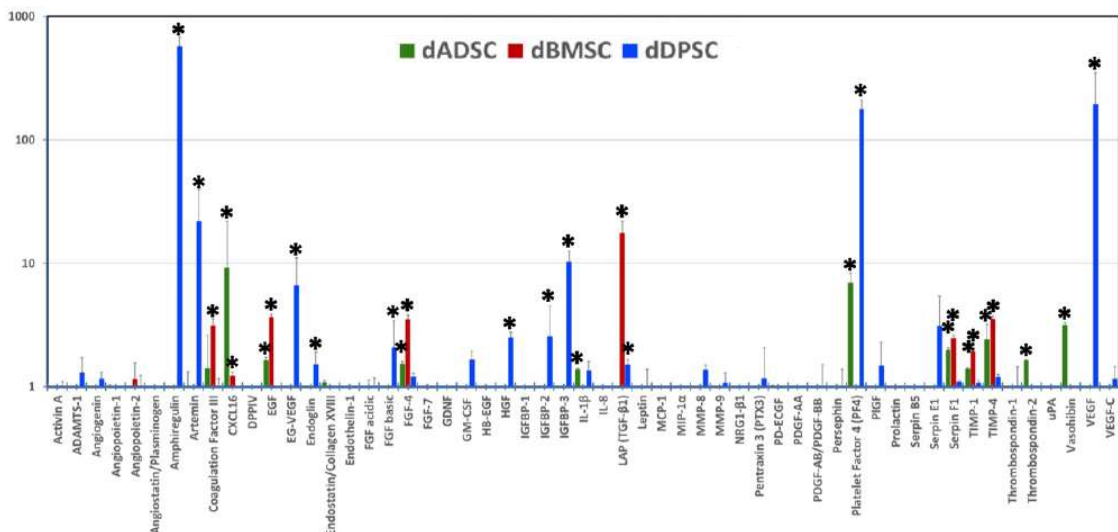


**Figura 16:** Caracterización *in vitro* de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), las MSC no diferenciadas (ndMSC) y las MSC diferenciadas (dMSC) mediante inmunofluorescencia de los marcadores vasculares CD34, Vein Endothelial Growth Factor (VEGF), CD31 y Von Willebrand Factor (vWF). Barras de escala: 50  $\mu$ m.

## 4.2. Análisis *in vitro* del perfil de diferenciación vascular de células madre mesenquimales mediante array de proteínas

Los arrays de proteínas son plataformas proteómicas de gran interés y utilidad en el estudio de los procesos de diferenciación celular. En la presente Tesis Doctoral, un total de 55 proteínas asociadas al proceso de diferenciación vascular fueron analizadas (Figura 17).

En concreto, de las 55 proteínas 11 de ellas (20%) mostraron una expresión elevada en el grupo dDPSC, incluyendo Anfiregulina, Artemina, Endogлина, FGF básico, EG-VEGF, HGF, IGFBP-2, IGFBP-3, LAP (TGF- $\beta$ 1), PF4 y VEGF. Cabe destacar que tres de estas proteínas (Anfiregulina, PF4 y VEGF) mostraron una expresión 100 veces superior tras el proceso de diferenciación vascular. Por otro lado, ocho proteínas (14,5%) fueron significativamente expresadas en el grupo dBMSC, incluyendo CXCL16, Factor de Coagulación III, EGF, FGF-4, LAP (TGF- $\beta$ 1), Serpin F1, TIMP-1 y TIMP-4. Es importante poner de relieve que 6 de las 8 proteínas expresadas en el grupo dBMSC también se expresaron en el grupo dADSC. En concreto, el grupo dADSC reveló la expresión de 10 proteínas (18,2%) entre las que destacaron CXCL16, EGF, FGF-4, IL-1 $\beta$ , PF4, Serpin F1, Trombospondina-2, TIMP-1, TIMP-4 y Vasohibina.



**Figura 17:** Proteínas expresadas en los grupos de estudio dADSC, dBMSC y dDPSC sometidas a diferenciación vascular *in vitro*. Para cada proteína, se muestra la media del número de veces que aumenta la expresión proteica de las MSC no diferenciada frente a las MSC diferenciadas para cada tipo celular estudiado. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre las MSC no diferenciadas y las MSC diferenciadas han sido marcadas con asteriscos (\*).

## **5. Evaluación *in vivo* de los modelos mejorados de mucosa oral humana con potencial vasculogénico**

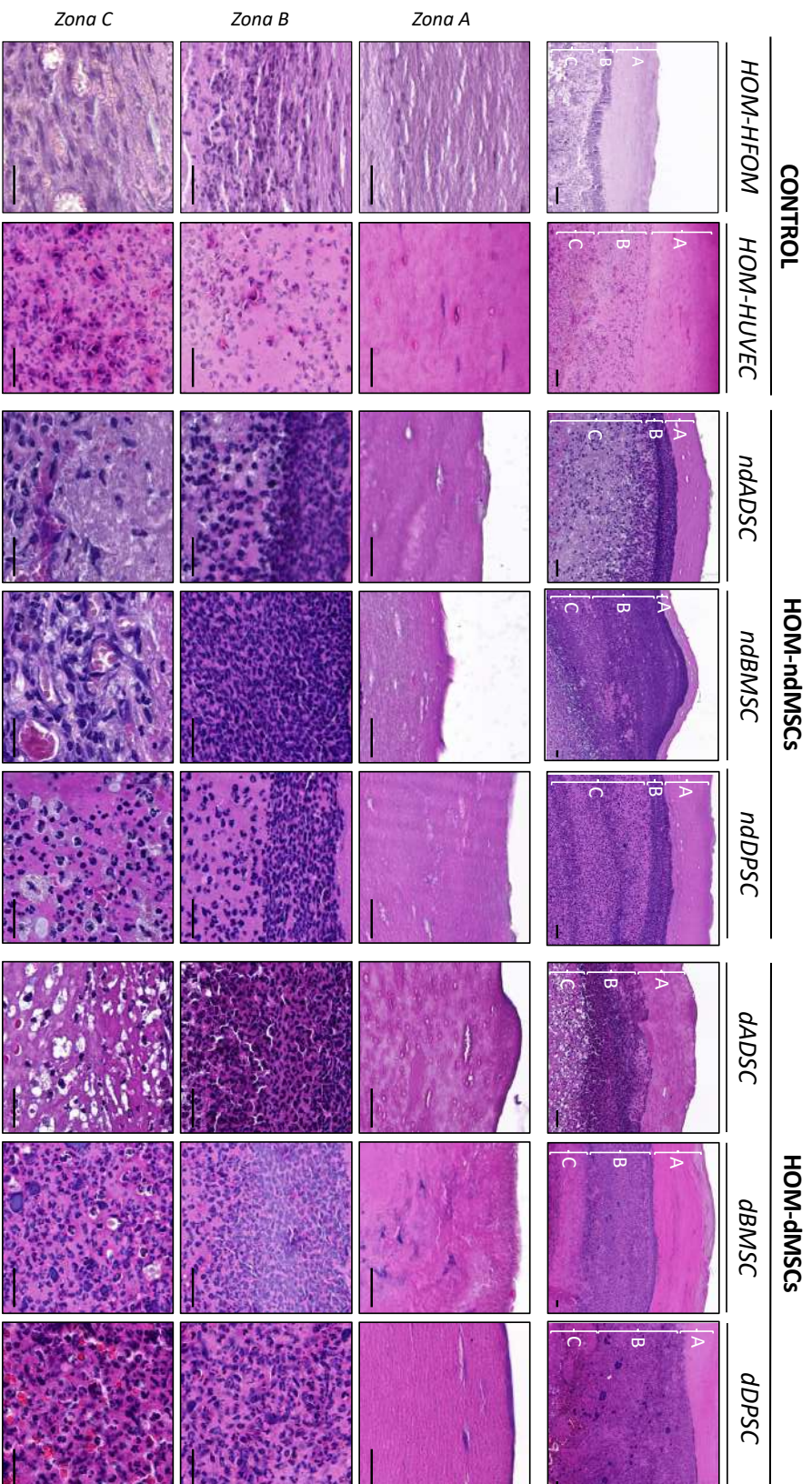
### **5.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico**

Los modelos mejorados de mucosa oral humana generados en la presente Tesis Doctoral incluyeron dos mejoras significativas. En primer lugar, una mejora en la optimización de los biomateriales a partir de nuevas agarosas usando como óptima la agarosa tipo VII, químicamente homóloga a la agarosa LM. En segundo lugar, se incluyeron nuevas fuentes celulares, en concreto, MSC previamente diferenciadas a estirpes vasculares, para generar modelos prevascularizados de mucosa oral humana.

Estos nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana fueron implantados *in vivo* en ratones atímicos durante una semana. Tras la implantación de estos modelos se observó un proceso de biointegración en el huésped. Además, no se detectó ningún signo de hemorragia, tumorigénesis, rechazo, infección u otro efecto secundario relacionado con los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados.

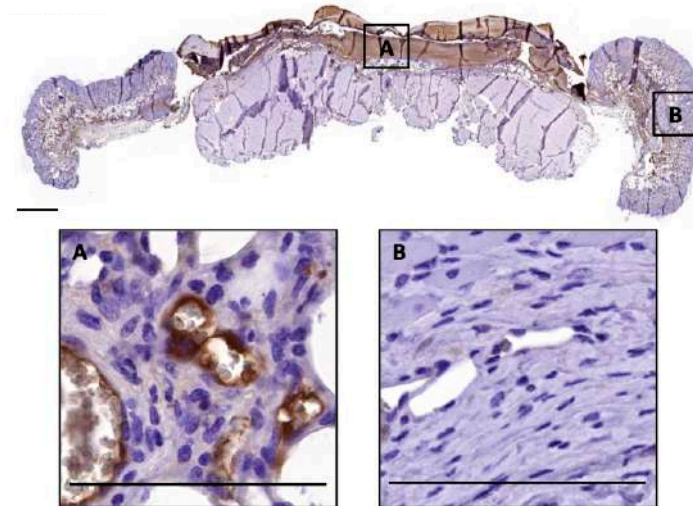
Por otro lado, el análisis histológico de los nuevos modelos de mucosa oral humana implantados *in vivo* reveló la presencia de tres zonas histológicas en el lugar del injerto (las cuales se han nombrado zona A, B y C). En primer lugar, la zona A corresponde al modelo mejorado de mucosa oral humana implantado en los ratones atímicos. Por otro lado, la zona B es la zona del nuevo modelo de mucosa oral humana que presenta una alta densidad celular. Por último, la zona C representa la zona de interfaz entre el tejido nativo del animal receptor y el modelo mejorado de mucosa oral humana que, además contenía numerosos vasos sanguíneos. Cabe destacar que la alta densidad celular se identificó en la zona B, seguida por la zona C, mientras que en la zona A, se detectó una baja densidad celular (Figura 18).





**Figura 18:** Análisis histológico mediante Hematoxilina-Eosina de los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados en ratones atímicos durante una semana. Para cada grupo, se muestran imágenes a bajo aumento en la parte superior, y a continuación, las tres zonas identificadas (A, B y C) a mayor aumento. HOM-HFOM: grupo de control negativo que contiene fibroblastos de la mucosa oral humana; HOM-HUVEC: grupo de control positivo que contiene células endoteliales de la vena umbilical humana y HFOM; HOM-ndMSCs: sustitutos de la mucosa oral humana que contienen MSC no diferenciadas y HFOM. HOM-dMSCs: sustitutos de la mucosa oral humana que contienen MSC diferenciadas y HFOM. Barras de escala: 20  $\mu$ m.

Para confirmar el origen humano de las células inmersas dentro de los biomateriales optimizados de fibrina-agarosa (HFOM, HUVEC, ndMSC y dMSC) implantados en los ratones atímicos, se llevó a cabo la detección del anticuerpo contra el antígeno mitocondrial humano. Los resultados revelaron una expresión positiva en los modelos mejorado de mucosa oral humana, mientras que los tejidos periféricos del huésped (ratón atímico) mostraron una señal negativa, como se representa en la figura 19.



**Figura 19:** Análisis inmunohistoquímico del antígeno mitocondrial humano en los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados en ratones atímicos durante una semana. A) Sustituto mejorado de mucosa oral humana implantado en ratones atímicos. B) Zona periférica del lugar de la lesión correspondientes al tejido del huésped. Se muestran imágenes de mayor aumento en las que se observan las células de origen humano (en marrón) y las células del ratón anfitrión (en azul). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Con el fin de determinar el potencial de vascularización de los nuevos modelos mejorados de mucosa oral humana, se analizó la presencia de marcadores vasculares específicos (VEGF, CD31, vWF, CD34) en cada uno de los grupos de los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados *in vivo* (Figuras 20-23).

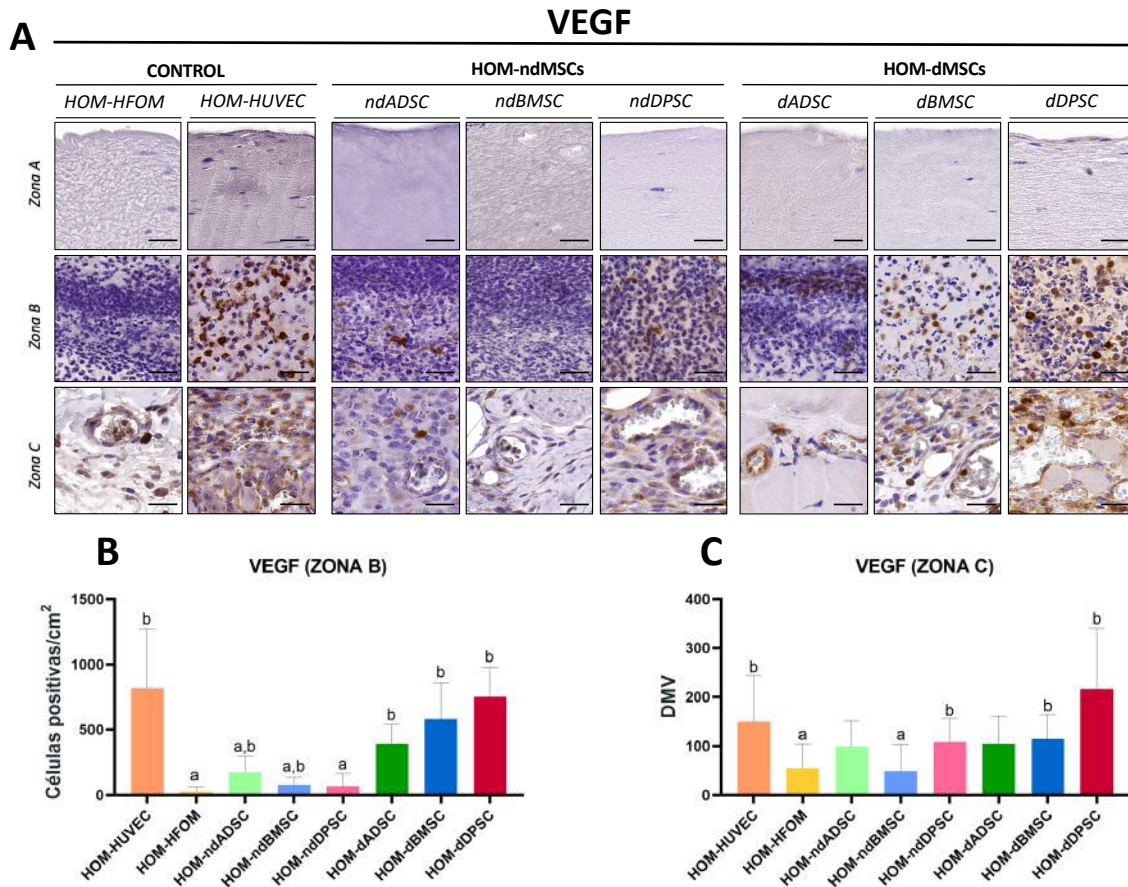
En general, la zona A fue negativa para los marcadores vasculares analizados, mientras que la zona B contenía numerosas células positivas y la zona C mostró un incremento de la concentración de estructuras vasculares que mostraron una señal positiva tras el análisis inmunohistoquímico. Debido a la alta concentración de estructuras vasculares se decidió determinar la densidad de estructuras microvasculares (DMV) en cada uno de los grupos experimentales implantados

*in vivo*. Cabe destacar que el uso de anticuerpos contra el antígeno mitocondrial humano permitió identificar que más de la mitad de las estructuras vasculares presentes eran de origen humano, mientras que el resto de los vasos estaban formados por células de ratón, procedentes del huésped en el que se implantaron los modelos mejorados de mucosa oral humana (Figura 19).

En primer lugar, el análisis de la expresión del marcador vascular VEGF en la zona B reveló la escasa presencia de células positivas en los controles negativos de HOM-HFOM y en el grupo HOM-ndDPSC, mientras que se detectó un número muy elevado de células positivas en los controles positivos de HOM-HUVEC (Figura 20). En este caso las diferencias estadísticas fueron significativas ( $p < 0,0001$  para HOM-HFOM vs HOM-HUVEC y  $p = 0,0001$  para HOM-ndDPSC vs HOM-HUVEC). Los nuevos modelos de mucosa oral humana generados con MSC no diferenciadas mostraron diferencias significativas con los controles positivos HOM-HUVEC ( $p > 0,05$ ). Además, los grupos HOM-ndADSC ( $p = 0,0019$ ) y HOM-ndBMSC ( $p = 0,0142$ ) también fueron significativamente superiores a los valores de los controles negativos (HOM-HFOM). Por último, los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC diferenciadas mostraron diferencias estadísticamente significativas con los controles negativos ( $p < 0,0001$  para HOM-dADSC vs HOM-HFOM y HOM-dDPSC vs HOM-HFOM, y  $p = 0,0019$  para HOM-dBMSC vs HOM-HFOM), pero fueron comparables a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p > 0,05$ ). Además, estos grupos fueron significativamente superiores a los modelos mejorados de mucosa oral humana que contenían MSC no diferenciadas ( $p = 0,0019$  para HOM-ndADSC vs HOM-dADSC y para HOM-ndBMSC vs HOM-dBMSC, y  $p < 0,0001$  para HOM-ndDPSC vs HOM-dDPSC).

Por otro lado, el análisis de la DMV en la zona C utilizando el marcador vascular VEGF mostró que la DMV encontrada en los controles positivos de HOM-HUVEC era significativamente mayor que el de los controles negativos de HOM-HFOM ( $p = 0,0188$ ) (Figura 20). En el caso de los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC no diferenciadas, sólo el grupo de HOM-ndBMSC mostraron una DMV menor que los controles positivos ( $p = 0,0106$ ), mientras que HOM-ndDPSC fue significativamente mayor que los controles negativos HOM-HFOM ( $p = 0,0244$ ). Los grupos HOM-ndADSC, HOM-ndDPSC y todos los

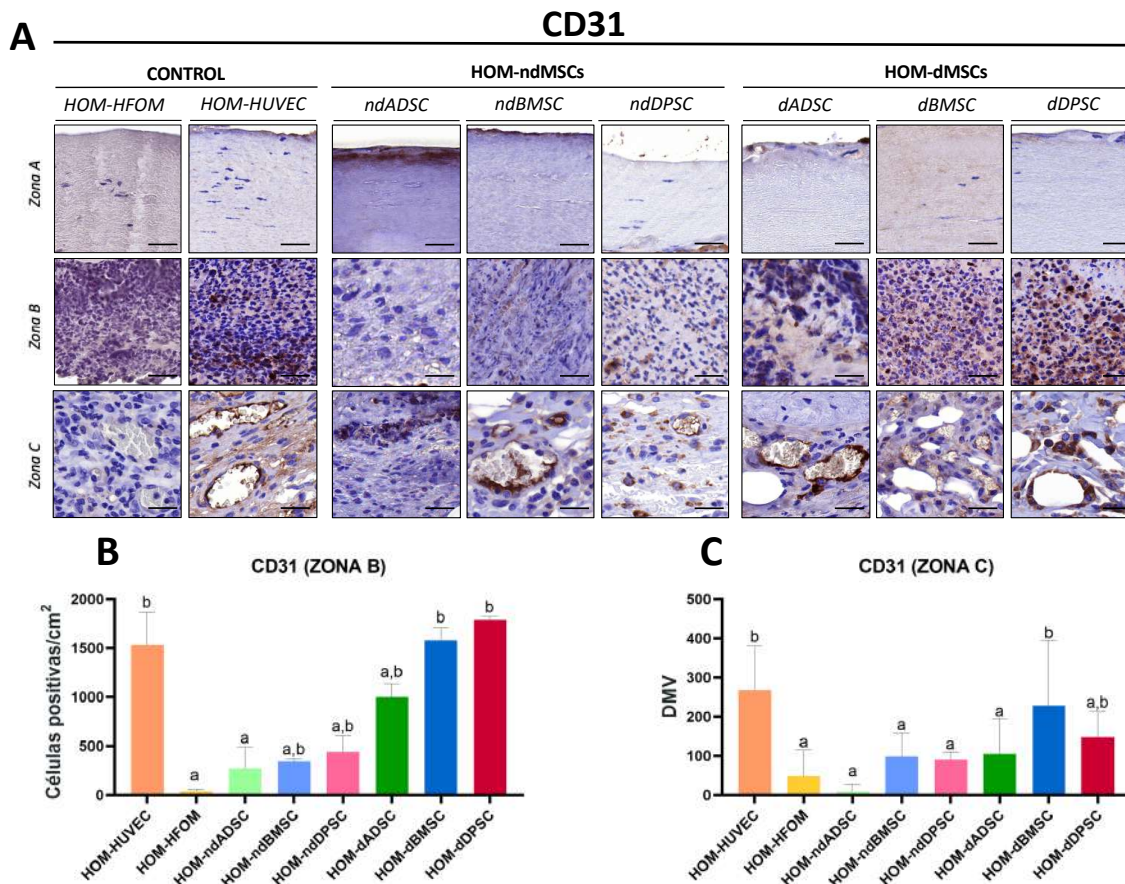
sustitutos de mucosa oral humana artificial generados con células diferenciadas (HOM-dADSC, HOMA-dBMSC y HOM-dDPSC) fueron comparables a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p>0,05$  para todos los grupos experimentales). Llama la atención que la DMV fue significativamente mayor en HOM-dBMSC en comparación con HOM-ndBMSC ( $p=0,0188$ ) y en HOM-dDPSC en comparación con HOM-ndDPSC ( $p=0,0244$ ) (Figura 20C).



**Figura 20:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador VEGF en modelos mejoradas de mucosa oral humana. HOM-HFOM: grupo control negativo que contiene fibroblastos de mucosa oral humana; HOM-HUVEC: grupo control positivo que contiene células endoteliales de la vena umbilical humana y fibroblastos de mucosa oral; HOM-ndMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC no diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral; HOM-dMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral. A) Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador VEGF. Barra de escala: 20  $\mu$ m. B) Cuantificación del número de células que muestran señal positiva por  $\text{cm}^2$ . C) Cuantificación de la densidad de microvasos (DMV) correspondiente al número de vasos positivos encontrados por  $\text{cm}^2$ . Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HUVEC se indican con el superíndice a. Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HFOM se indica con el superíndice b.

En el caso del marcador vascular CD31, encontramos que en la zona B (Figura 21), el número de células positivas para el marcador CD31 fue significativamente mayor en los controles positivos HOM-HUVEC que en los negativos HOM-HFOM ( $p < 0,0001$ ). Los modelos mejorados de mucosa oral humana que contenían MSC no diferenciadas tenían un número de células significativamente menor que los controles positivos ( $p < 0,0001$  para todas las comparaciones estadísticas), aunque los grupos HOM-ndBMSC y HOM-ndDPSC eran significativamente mayores que los controles negativos HOM-HFOM ( $p < 0,0001$ ). En el caso de los modelos mejorados de mucosa oral humana generadas con MSC diferenciadas, se encontró un aumento significativo de células positivas, siendo los valores de los grupos HOM-dBMSC y HOM-dDPSC comparables a los valores encontrados en los controles positivos HOM-HUVEC ( $p > 0,05$ ).

Por otro lado, los valores de DMV en la zona C (Figura 21) eran significativamente menor en los controles negativos HOM-HFOM con respecto a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p = 0,0002$ ) y en los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC no diferenciadas ( $p < 0,0001$  para HOM-ndADSC,  $p = 0,0008$  para HOM-ndBMSC, y  $p = 0,0002$  para HOM-ndDPSC). En el caso de los modelos mejorados de mucosa oral humana correspondientes a los grupos que contenían MSC diferenciadas, los grupos de HOM-dADSC ( $p = 0,0028$ ) y HOM-dDPSC ( $p = 0,0106$ ) contenían un número de vasos significativamente menor que los controles positivos HOM-HUVEC, aunque el grupo HOM-dBMSC fue similar al control positivo HOM-HUVEC ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, los grupos HOM-dBMSC y HOM-dDPSC presentaron valores significativamente mayores que los controles negativos HOM-HFOM ( $p = 0,0106$  y  $p = 0,0142$ , respectivamente). Además, HOM-dADSC y HOM-dDPSC mostraron una DMV significativamente mayor que HOM-ndADSC ( $p = 0,0003$ ) y HOM-ndDPSC ( $p = 0,0188$ ).

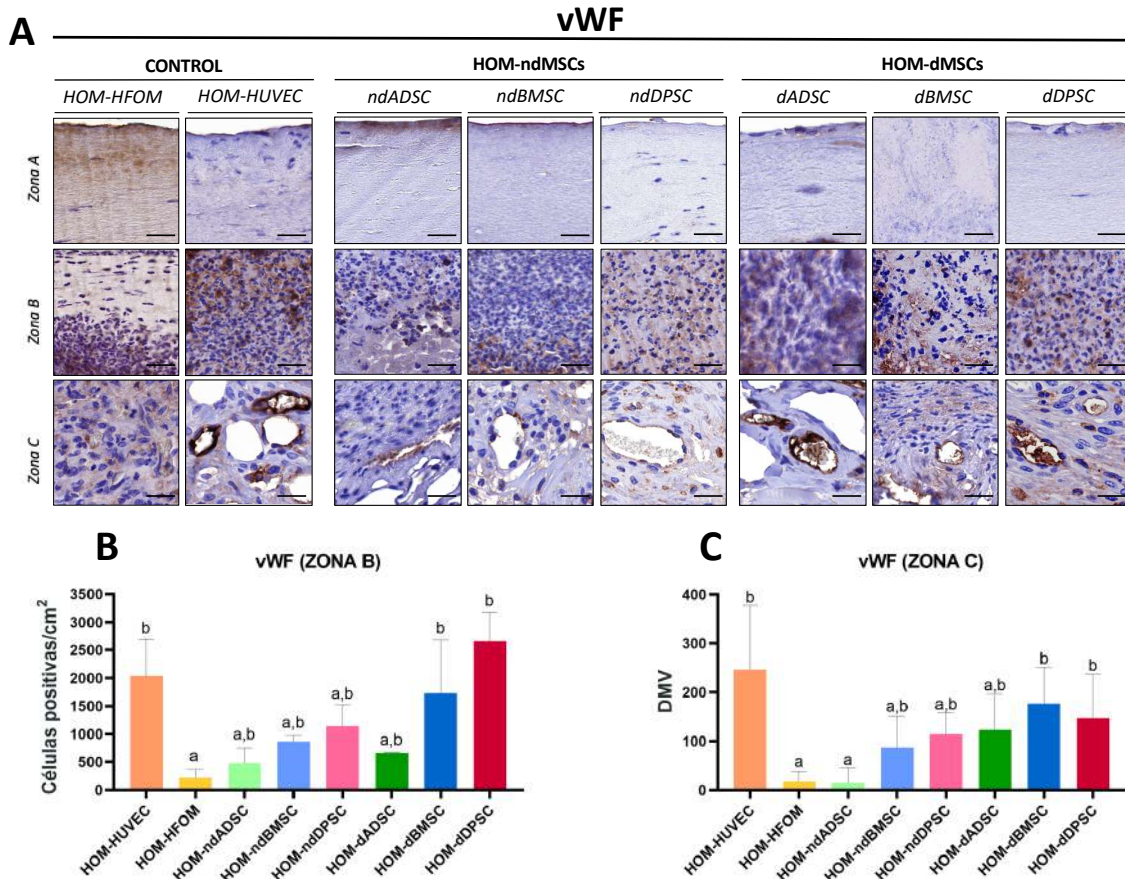


**Figura 21:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador CD31 en modelos mejorados de mucosa oral humana implantados en ratones atímicos durante una semana. HOM-HFOM: grupo control negativo que contiene fibroblastos de mucosa oral humana; HOM-HUVEC: grupo control positivo que contiene células endoteliales de la vena umbilical humana y fibroblastos de mucosa oral; HOM-ndMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC no diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral; HOM-dMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral. A) Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador CD31. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . B) Cuantificación del número de células que muestran una señal positiva por  $\text{cm}^2$ . C) Cuantificación de la densidad de microvasos (DMV) correspondiente al número de vasos positivos encontrados por  $\text{cm}^2$ . Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HUVEC se indican con el superíndice a. Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HFOM se indica con el superíndice b.

El análisis inmunohistoquímico del número de células positivas para el marcador vascular vWF en la zona B (Figura 22) reveló que los controles positivos HOM-HUVEC fueron significativamente mayores que los controles negativos HOM-HFOM ( $p < 0,0001$ ). Los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC no diferenciadas mostraron menor cantidad de células positivas, y

estos resultados fueron estadísticamente significativos con respecto al control positivo HOM-HUVEC ( $p < 0,0001$  para HOM-ndADSC,  $p = 0,0004$  para HOM-ndBMSC y  $p = 0,0048$  para HOM-ndDPSC). Por otro lado, el análisis frente al grupo control negativo HOM-HFOM también reveló diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0004$  para HOM-ndADSC,  $p = 0,0004$  para HOM-ndBMSC  $p = 0,0004$  para HOM-ndDPSC). En el caso de los modelos mejorados de mucosa oral humana que contenían MSC diferenciadas, se encontró un aumento significativo de las células positivas para el marcador vascular vWF en el grupo HOM-dDPSC en comparación con HOM-ndDPSC ( $p = 0,0004$ ), mientras que HOM-dBMSC y HOM-dDPSC presentaron valores muy similares estadísticamente a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p > 0,05$ ) (Figura 22).

En cuanto al análisis de DMV en la zona C para el marcador vascular vWF, las muestras analizadas revelaron al igual que en el análisis anterior que el número de células positivas para el marcador vascular era mayor en los controles positivos HOM-HUVEC en comparación con los controles negativos HOM-HFOM ( $p < 0,0001$ ). Los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC no diferenciadas tenían un número de vasos inferior al de los controles positivos HOM-HUVEC ( $p < 0,0001$  para HOM-ndADSC,  $p = 0,0142$  para HOM-ndBMSC  $p = 0,0315$  para HOM-ndDPSC), y los grupos HOM-ndBMSC y HOM-ndDPSC fueron significativamente superiores a los controles negativos HOM-HFOM ( $p = 0,0244$  y  $p = 0,0001$ , respectivamente). Tras la diferenciación de las MSC, los resultados revelaron un aumento estadísticamente significativo de la DMV en HOM-dADSC ( $p = 0,0005$ ) y HOM-dBMSC ( $p = 0,0244$ ) además, los grupos HOM-dBMSC y HOM-dDPSC llegaron a ser comparables a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p > 0,05$ ) (Figura 22).



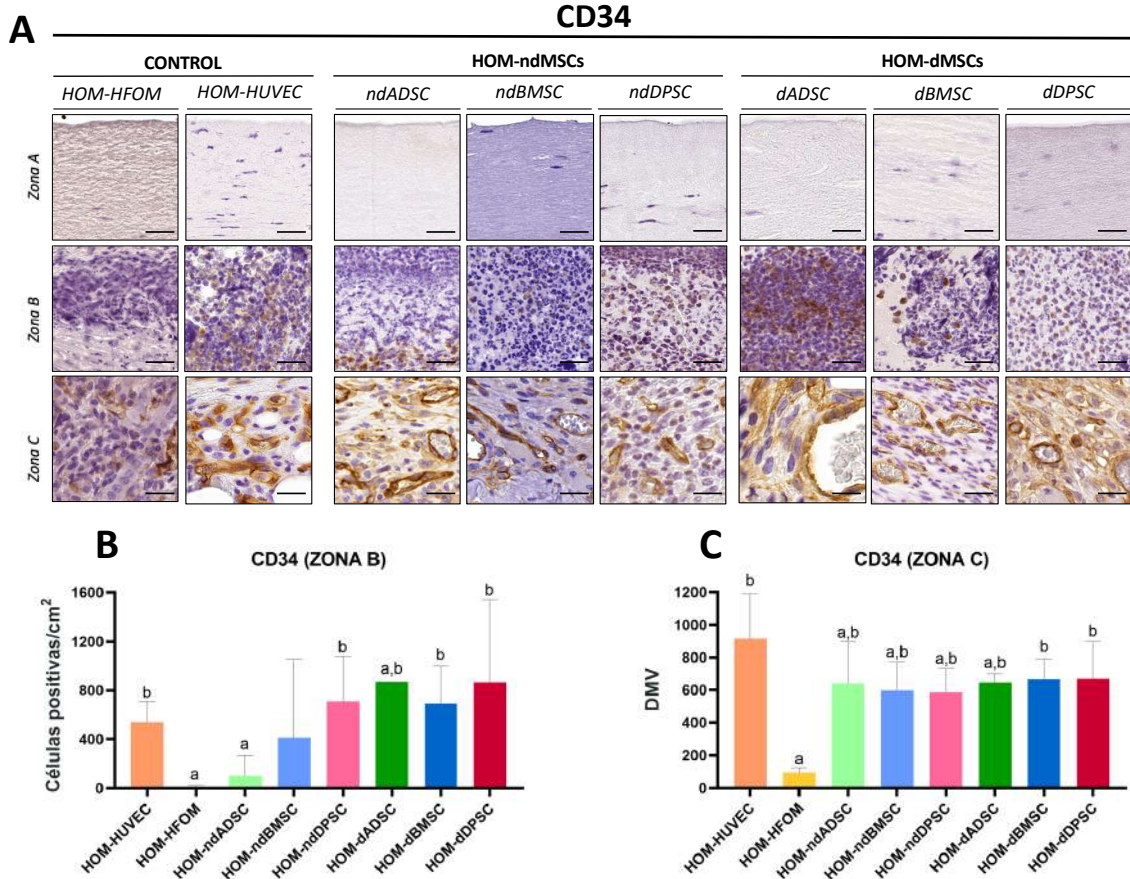
**Figura 22:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador vascular vWF en modelos mejorados de mucosa oral humana implantados en ratones atímicos durante una semana. HOM-HFOM: grupo control negativo que contiene fibroblastos de mucosa oral humana; HOM-HUVEC: grupo control positivo que contiene células endoteliales de la vena umbilical humana y fibroblastos de mucosa oral; HOM-ndMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC no diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral; HOM-dMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral. A) Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador vWF. Barra de escala: 20  $\mu$ m. B) Cuantificación del número de células que muestran una señal positiva por  $\text{cm}^2$ . C) Cuantificación de la densidad de microvasos (DMV) correspondiente al número de vasos positivos encontrados por  $\text{cm}^2$ . Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HUVEC se indican con el superíndice a. Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HFOM se indica con el superíndice b.

Por último, se evaluó cada tipo de muestra utilizando el marcador CD34, como se representa en la figura 23. Los resultados obtenidos revelaron que la zona B de los controles positivos HOM-HUVEC contenía una mayor densidad de células positivas para el marcador CD34 que los controles negativos HOM-HFOM ( $p=0,0004$ ). Sin embargo, cuando se analizaron los modelos mejorados de



mucosa oral humana que contenían MSC no diferenciadas, se encontraron pocas células positivas en el grupo HOM-ndADSC ( $p=0,0008$  frente a los controles positivos HOM-HUVEC), pero el número de células positivas para el marcador vascular CD34 encontradas en los grupos HOM-ndBMSC y HOM-ndDPSC no fue significativamente inferior al de los controles positivos HOM-HUVEC ( $p>0,05$ ). Por otro lado, los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC diferenciadas mostraron una tendencia al aumento del número de células positivas para el marcador vascular CD34 con respecto al control positivo HOM-HUVEC, que alcanzó valores estadísticamente significativos en el caso del grupo HOM-dADSC ( $p=0,0238$ ) (Figura 23).

Además, como se muestra en la figura 23, en la zona C la DMV de las muestras analizadas fue alta en los controles positivos HOM-HUVEC, mientras que se observaron valores bajos en los controles negativos HOM-HFOM ( $p=0,0001$  para la comparación estadística de ambos controles). El número de vasos positivos para el marcador de vasos sanguíneos CD34 encontrado en los modelos mejorados de mucosa oral humana generados mediante técnicas de IT con células MSC no diferenciadas fue estadísticamente significativo con respecto a los controles negativos HOM-HFOM ( $p<0,0001$  para todos los modelos mejorados de mucosa oral humana generados con MSC no diferenciadas HOM-ndADSC, HOM-ndBMSC, HOM-ndDPSC). Sin embargo, este valor fue significativamente menor que en los controles positivos HOM-HUVEC ( $p=0,0152$  para HOM-ndADSC,  $p=0,0055$  para HOM-ndBMSC y  $p=0,0206$  para HOM-ndDPSC). Cuando se emplearon MSC diferenciadas para generar los modelos mejorados de mucosa oral humana, los grupos HOM-dBMSC y HOM-dDPSC revelaron valores similares a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p>0,05$ ), pero el grupo HOM-dADSC fue inferior a los controles positivos HOM-HUVEC ( $p=0,0360$ ).



**Figura 23:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador vascular CD34 en modelos mejorados de mucosa oral humana implantados en ratones atímicos durante una semana. HOM-HFOM: grupo control negativo que contiene fibroblastos de mucosa oral humana; HOM-HUVEC: grupo control positivo que contiene células endoteliales de la vena umbilical humana y fibroblastos de mucosa oral; HOM-ndMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC no diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral; HOM-dMSCs: sustitutos de mucosa oral humana que contienen MSC diferenciadas y fibroblastos de mucosa oral. A) Análisis inmunohistoquímico de la expresión del marcador CD34. Barra de escala: 20  $\mu$ m. B) Cuantificación del número de células que muestran una señal positiva por  $\text{cm}^2$ . C) Cuantificación de la densidad de microvasos (DMV) correspondiente al número de vasos positivos encontrados por  $\text{cm}^2$ . Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HUVEC se indican con el superíndice a. Los valores significativos de la comparación entre todos los grupos de estudio frente a HOM-HFOM se indica con el superíndice b.



## **DISCUSIÓN**

---



Los trastornos de la mucosa oral humana son afecciones muy prevalentes que afectan a más de tres mil millones de personas en todo el mundo, siendo el cáncer oral, los traumatismos y las enfermedades periodontales graves los casos más prevalentes en la actualidad (Disease, Injury *et al.* 2018). En la mayoría de los casos, el tratamiento de estas patologías depende en gran medida de la disponibilidad de mucosa oral humana sana que permita una terapia de sustitución, algo que dificulta su tratamiento debido a la escasez de donantes (Heller, Frerick-Ochs *et al.* 2016). En este sentido, la IT surge como una gran alternativa para el tratamiento de estas patologías, ya que es una rama de la medicina que tiene como objetivo básico la elaboración de tejidos artificiales que permitan la reparación, restauración o incluso la mejora de las funciones de tejidos y órganos dañados (Atala 2012, Lanza, Langer *et al.* 2020). En este sentido, en los últimos años se han desarrollado, optimizado y caracterizado varios modelos de mucosa oral humana artificial generados mediante protocolos de IT (Izumi, Takacs *et al.* 1999, Kinikoglu, Auxenfans *et al.* 2009, Fernandez-Valades-Gamez, Garzon *et al.* 2016), que incluyen desde sustitutos de mucosa oral humana generados empleando solamente una capa estratificada continuada de queratinocitos, hasta modelos de mucosa oral humana de espesor total con distintas poblaciones celulares, destacando el modelo de mucosa oral humana desarrollado en el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada empleando el biomaterial de fibrina-agarosa. Sin embargo, aunque estos modelos de mucosa oral humana artificial han demostrado su potencial utilidad, sus principales limitaciones son las bajas propiedades mecánicas de los biomateriales empleados y la falta de vascularización, lo que dificulta la implantación, la biointegración y la supervivencia de los sustitutos artificiales *in vivo* (Jang, Kim *et al.* 2020).

En este contexto, es imprescindible llevar a cabo mejoras de los modelos actuales de mucosa oral humana que garanticen su translación clínica. Con el fin de alcanzar esta translación clínica, actualmente la IT se encuentra enfocada en el desarrollo y la optimización de nuevos biomateriales, así como la mejora de los protocolos de biofabricación (Irastorza-Lorenzo, Sanchez-Porras *et al.* 2021, Garcia-Garcia, El Soury *et al.* 2023). En concreto, en la presente Tesis Doctoral se han optimizado biomateriales con propiedades fisicoquímicas y

mecánicas similares a la mucosa oral humana. Además, se ha trabajado en el desarrollo de protocolos de IT que han permitido la generación de sustitutos artificiales prevascularizados mediante el uso de células madre mesenquimales con el objetivo de garantizar la biointegración de los tejidos artificiales tras la implantación *in vivo* y explorar nuevas fuentes celulares alternativas para su uso en modelos artificiales prevascularizados (Masson-Meyers and Tayebi 2021). De este modo, los modelos mejorados de mucosa oral humana generados en la presente Tesis Doctoral podrían contribuir al futuro tratamiento clínico de enfermedades complejas que afectan a la cavidad oral humana (Feller, Khammissa *et al.* 2017).

A pesar de los avances técnicos que se han logrado en los protocolos de IT durante los últimos años, la generación de órganos y tejidos humanos complejos, tales como la mucosa oral, sigue siendo un desafío en este campo (Huang, Huang *et al.* 2022). En este sentido, el desarrollo de un biomaterial ideal para su uso en clínica es uno de los principales objetivos de la IT. Los polisacáridos de origen marino, en particular las agarosas, han sido ampliamente explorados durante los últimos años para su uso en protocolos de IT debido a su elevada biocompatibilidad, además de sus prometedoras propiedades biomecánicas (V, Udduttula *et al.* 2022, Samrot, Sathiyasree *et al.* 2023). El grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ha demostrado previamente resultados prometedores con el uso del biomaterial de fibrina-agarosa en la generación de sustitutos artificiales humanos de córnea (Alaminos, Del Carmen Sanchez-Quevedo *et al.* 2006), piel (Carriel, Garzon *et al.* 2012), nervio (Carriel, Scionti *et al.* 2017) o tendón (Gonzalez-Quevedo, Sanchez-Porras *et al.* 2022), entre otros. Sin embargo, las propiedades biomecánicas de este material para su uso en la generación de mucosa oral humana artificial podrían mejorarse para facilitar la funcionalidad en las distintas regiones anatómicas de la cavidad oral. En este contexto, artículos recientes han demostrado que diferentes tipos de agarosas marinas podrían tener propiedades biológicas y biomecánicas específicas (Irastorza-Lorenzo, Sanchez-Porras *et al.* 2021). Este reciente hallazgo sugiere que no todos los polisacáridos de agarosas marinas disponibles actualmente muestran el mismo comportamiento tanto en procesos *in vitro*, como *in vivo*. En la presente Tesis Doctoral, se han evaluado distintas agarosas (D1LE, D2LE,

LM, MS8, D5) a varias concentraciones (0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,3% p/v) para determinar su potencial utilidad para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana.

Una vez generados los modelos mejorados de mucosa oral humana con las distintas agarosas se analizaron las propiedades biomecánicas de cada grupo con el fin de determinar su potencial utilidad en diferentes aplicaciones específicas. Ciertos órganos y tejidos humanos requieren propiedades reológicas definidas, como es el caso de la generación de una mucosa oral masticatoria artificial humana, la cual está sometida a un desgaste continuo debido al proceso de masticación (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han demostrado que todas las agarosas estudiadas eran capaces de mejorar las propiedades biomecánicas del grupo control (FIB), formado por fibrina pura, como había sido demostrado previamente (Ionescu, Alaminos *et al.* 2011, Scionti, Moral *et al.* 2014). Sin embargo, se observó que tanto la concentración como el tipo de agarosa empleado para la generación de los sustitutos de fibrina-agarosa influían en las propiedades biomecánicas de estos hidrogeles. En cuanto al tipo de agarosa empleado, se ha detectado que los grupos de fibrina-agarosa que contenían la agarosa tipo D1LE mostraban una mejora significativa en el valor del módulo de Young en comparación con el grupo FIB y con los hidrogeles combinados del resto de agarosas estudiadas. A pesar de que este módulo es un parámetro complejo, la rigidez de un biomaterial específico puede medirse empleando el módulo de Young (Harris, Lacombe *et al.* 2021), y los valores más altos de este módulo suelen asociarse con los niveles más altos de rigidez del material analizado. De este modo, los resultados obtenidos sugieren que el biomaterial de fibrina-agarosa generado usando la agarosa tipo D1LE podría tener una mayor rigidez que el resto de las agarosas estudiadas en la presente Tesis Doctoral y por tanto, podría ser apta para la fabricación de mucosa oral masticatoria artificial humana. Asimismo, los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran que el tipo de agarosa se asocia con una mejora significativa de los parámetros biomecánicos que están más específicamente relacionados con la elasticidad del tejido, como son la deformación a la fractura y la carga a la rotura (Cioroianu and Storm 2013), como es el caso de la agarosa



tipo LM, químicamente homóloga a la agarosa tipo VII. Dado que estos parámetros representan principalmente la capacidad de deformación del biomaterial en el momento de la fractura (Cioroianu and Storm 2013), los resultados sugieren que la optimización de los procesos de biofabricación de nuevos modelos de mucosa oral humana con la agarosa tipo LM podrían aportar más elasticidad que el resto de hidrogeles sintetizados y que el grupo control con fibrina pura (FIB), y por tanto, serán aptos para la fabricación de mucosa oral de revestimiento artificial humana.

En cuanto a las distintas concentraciones de agarosa estudiadas (0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,3% p/v), también se detectó una relación estrecha entre la concentración y las diferentes propiedades biomecánicas analizadas. En general, se observó que la rigidez del biomaterial de fibrina-agarosa, determinada por el módulo de Young, tendía a aumentar con la concentración de agarosa, excepto en el caso de los hidrogeles que contenían la agarosa tipo LM. En cambio, los parámetros elásticos no cambiaban o tendían a disminuir con la concentración de agarosa. Curiosamente, estudios previos en hidrogeles de agarosa pura detectaron una correlación positiva significativa del módulo de Young con la concentración de agarosa, mientras que la deformación a la fractura tendía a disminuir con la concentración (Irastorza-Lorenzo, Sanchez-Porras *et al.* 2021).

Aunque es necesario continuar investigando en relación a la mejora de los biomateriales empleados en protocolos de IT, los resultados del análisis biomecánico llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral podrían suponer una mejora de las propiedades mecánicas de los biomateriales desarrollados en el grupo de investigación hasta la fecha. El hecho de que diferentes tipos y concentraciones de agarosa den lugar a hidrogeles de fibrina-agarosa con propiedades biomecánicas diferentes abre la puerta a una aplicación clínica especializada. De este modo, cada biomaterial podría ser empleado de forma específica según las propiedades reológicas concretas que requiera cada tejido u órgano artificial que se desee generar. Además, los resultados obtenidos permiten concluir que la generación de aquellos tejidos artificiales que requieran una elevada rigidez una vez sean implantados *in vivo*, como podría ser el caso de la mucosa oral masticatoria, deberían de ser generados empleando

biomateriales que contengan agarosa tipo D1LE, especialmente en las concentraciones más elevadas. Sin embargo, aquellos tejidos que requieren una mayor elasticidad, como es el caso la mucosa oral de revestimiento, podrían generarse preferiblemente usando hidrogeles que contengan agarosa tipo LM, especialmente en las concentraciones más bajas. En este sentido, el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral ha permitido optimizar la concentración y el tipo de agarosa con las propiedades biomecánicas más adecuadas para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana masticatoria y de revestimiento.

Una vez optimizados los biomateriales para la generación de nuevos modelos de mucosa oral humana, se pasó a estudiar otro de los grandes retos de la IT actual, la vascularización de los sustitutos artificiales (Dimitrievska and Niklason 2018, Chandra and Atala 2019). Esta estrategia sigue siendo en la actualidad una de las principales limitaciones de los tejidos artificiales, ya que la formación de vasos sanguíneos es necesaria para que el tejido artificial implantado *in vivo* reciba nutrientes y oxígeno (Nishiyama, Akagi *et al.* 2019). Además, la vascularización es un paso crucial para asegurar la biocompatibilidad y viabilidad del tejido en el nicho receptor, como varios autores han descrito previamente (Kannan, Salacinski *et al.* 2005, Kim, Hou *et al.* 2016).

En este sentido, la formación *in vivo* de vasos sanguíneos puede lograrse mediante dos procesos: la vasculogénesis o la angiogénesis (Flamme, Frolich *et al.* 1997, Heil, Eitenmuller *et al.* 2006). La vasculogénesis se refiere al proceso de diferenciación de las células precursoras en células endoteliales capaces de formar vasos sanguíneos de *novo*, mientras que la angiogénesis es un proceso mediante el cual los vasos sanguíneos preexistentes se extienden por los tejidos mediante brotación (Aronow and McClung 2016).

Hasta la fecha se han descrito numerosos modelos de mucosa oral humana generados mediante protocolos de IT, y algunos de ellos ha logrado demostrar resultados clínicos prometedores en pacientes humanos (Lauer and Schimming 2001, Orzechowska-Wylegala, Dobrowolski *et al.* 2017). Pero aún no se ha logrado un modelo de mucosa oral plenamente funcional, el cual sea capaz de generar una red vascular eficiente una vez es implantado *in vivo*. De este modo, artículos recientes han demostrado la utilidad de las células endoteliales

humanas para facilitar la generación de una mucosa oral humana prevascularizada (Nishiyama, Akagi *et al.* 2019). Estos autores emplearon HUVEC aisladas del cordón umbilical humano en combinación con *nanofilms* de matriz extracelular y demostraron que estas células eran capaces de diferenciarse *in situ* y formar capilares sanguíneos en el estroma de la mucosa oral. Aunque se trata de un método muy prometedor, el uso de células HUVEC se encuentra sujeto a varias limitaciones, como es la baja capacidad de proliferación *in vitro* de estas células o la alta probabilidad de rechazo inmunogénico si las células se emplean de forma alogénica (Naji, Deschaseaux *et al.* 2005, Carey, Poulton *et al.* 2020).

Una posible alternativa al uso de células altamente diferenciadas, como es el caso de las HUVEC, es el uso de MSC debido a su baja inmunogenicidad, alta tasa de proliferación y alto potencial de diferenciación (Martin-Piedra, Alfonso-Rodríguez *et al.* 2019, Suresh and West 2020). Todas estas características han hecho que las MSC hayan sido usadas previamente en estrategias de vascularización de tejidos artificiales (Dominici, Le Blanc *et al.* 2006, Klar, Guven *et al.* 2016, Wu, Helder *et al.* 2019, Guo, Redenski *et al.* 2020). Sin embargo, la mayoría de estos enfoques se centran en la regeneración de órganos y tejidos como la piel, el hueso o la médula espinal. Por lo que no existen pruebas del uso de MSC para la generación de sustitutos prevascularizados de mucosa oral humana. Debido a esto, en la presente Tesis Doctoral se han desarrollado modelos mejorados de mucosa oral humana utilizando tres fuentes celulares diferentes de MSC (ADSC, BMSC, DPSC) con el objetivo de determinar el potencial de vascularización de cada tipo celular y, además, evaluar la posibilidad de inducir una rápida vascularización tras su implantación *in vivo*.

En primer lugar, una vez se aislaron los tres tipos diferentes de MSC (ADSC, BMSC y DPSC) y se observaron niveles de confluencia superiores al 80%, se pasó a determinar la capacidad de diferenciación a linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico empleando medios de inducción de todas las estirpes celulares. Además, se evaluó la expresión de los principales marcadores celulares de indiferenciación asociados a multipotencialidad mediante citometría de flujo, como son el marcador CD73, CD90 y el CD105 (Dominici, Le Blanc *et al.* 2006).

Por otro lado, tras someter los diferentes tipos de MSC a un proceso de diferenciación vascular *in vitro* empleando el medio de diferenciación 199 se evaluó el potencial de diferenciación vascular mediante inmunofluorescencia. Para ello, a parte de los seis grupos de estudio (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC, dADSC, dBMSC y dDPSC) se empleó el grupo HUVEC como control positivo y HFOM como control negativo. Curiosamente, los grupos ndBMSC y ndDPSC mostraron cierta expresión nativa de los marcadores vasculares vWF y VEGF, los cuales también estaban presentes en el control positivo HUVEC. El proceso de inducción a la diferenciación fue capaz de aumentar esta expresión no solo en estos tipos celulares, sino también en las ndADSC, donde también se expresó el marcador vascular CD31. Estos resultados permitieron confirmar el potencial de diferenciación vascular de los tres tipos de MSC estudiados (ADSC, BMSC, DPSC), tal y como había sido demostrado previamente por varios autores (Lu, Xu *et al.* 2019, Xu, Li *et al.* 2019, Suresh and West 2020).

A pesar de que las señales genéticas y moleculares asociadas a la diferenciación vascular de estas células requiere una mayor caracterización en futuros trabajos, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado mediante un array la expresión de proteínas estrechamente implicadas en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Este análisis ha permitido demostrar que varias de estas proteínas han sido sobreexpresadas en los grupos de MSC diferenciadas. Según estos resultados, las DPSC podrían tener el mayor potencial de diferenciación vascular *in vitro*, ya que el grupo de dDPSC sobreexpresó 10 de las 55 proteínas proangiogénicas analizadas, correspondiendo la mayor expresión a Anfiregulina y VEGF. Algunos autores han demostrado previamente que la elevada expresión de Anfiregulina puede actuar como inductor de VEGF (Wang, Huang *et al.* 2017). Además, la expresión del factor antiangiogénico PF4 puede sugerir que el proceso de diferenciación vascular que se llevó a cabo *in vitro* podría estar regulado por una intrincada red de vías de señalización, las cuales se solapan a menudo y en las que intervienen tanto proteínas proangiogénicas como antiangiogénicas (Ramai, Lai *et al.* 2018). De este modo, PF4 podría estar actuando como regulador del proceso de vascularización (Aidoudi and Bikfalvi 2010).

Una vez que se completó la caracterización *in vitro* de las MSC y se evaluó *in vitro* el potencial de vascularización de las MSC, se realizó un modelo tridimensional mejorado de mucosa oral humana previamente optimizado con el uso de biomateriales de fibrina y agarosa LM, químicamente homóloga a la agarosa tipo VII. En el modelo tridimensional mejorado de mucosa oral humana se incluyeron MSC (ndADSC, ndBMSC, ndDPSC, dADSC, dBMSC, dDPSC) en el compartimento estromal y fue implantado en ratones atímicos durante una semana. Se seleccionó este modelo animal de laboratorio debido a que había sido utilizado previamente con éxito por el grupo de investigación de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada para la evaluación *in vivo* de modelos de mucosa oral humana, sin generar rechazo debido a su condición atímica (carente de timo) (Carriel, Garzon *et al.* 2012, Alfonso-Rodriguez, Gonzalez-Andrades *et al.* 2015, Martin-Piedra, Alfonso-Rodriguez *et al.* 2019).

En este sentido, los resultados obtenidos confirmaron que los modelos de mucosa oral humana mejorados con agarosa LM eran totalmente biocompatibles *in vivo*, y que, además los animales a los que se les implantaron los distintos modelos mejorados carecían de complicaciones o efectos secundarios significativos.

La evaluación de los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados *in vivo* se realizó tras un periodo de seguimiento de una semana. Tras esta semana, el análisis histológico mostró la presencia de tres zonas bien diferenciadas (zona A, B, C). En primer lugar, la zona A era la más externa, siendo el modelo mejorado de mucosa oral humana implantado en los ratones atímicos. Por otro lado, la zona B correspondía a la zona del modelo mejorado de mucosa oral humana que presentaba una alta densidad celular, lo que sugiere que puede estar llevándose a cabo de forma activa un proceso de remodelación. Por último, la zona C representa la zona de interfaz entre el tejido nativo del huésped, el ratón atímico, y el modelo mejorado de mucosa oral humana. Cabe destacar, que la zona C contenía numerosos vasos sanguíneos. Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico con el marcador anti-mitocondria reveló que parte de los vasos recién formados contenían células de origen humano (Deluiz, Delcroix *et al.* 2019).

En este sentido, lo más probable es que estas tres áreas bien definidas sólo puedan encontrarse en fases muy tempranas del seguimiento *in vivo*, ya que trabajos anteriores han demostrado que los sustitutos de mucosa oral humana implantados en ratones atímicos durante periodos de tiempo más largos se integran completamente (Garzon, Sanchez-Quevedo *et al.* 2009). Es importante destacar que el hecho de que la zona A revelase la presencia de muy pocas células podría deberse al contacto directo con el aire, lo que podría ocasionar una migración de las células a zonas más profundas, como ha sido demostrado por autores previamente (Vermeulen, Gasparini *et al.* 1996).

Con el fin de determinar la capacidad de inducir la formación de vasos sanguíneos en los modelos mejorados de mucosa oral humana generados en la presente Tesis Doctoral, se analizó el área de células positivas encontradas en la zona B, la zona de remodelación *in vivo* de los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados, para los cuatro marcadores vasculares estudiados (VEGF, CD31, vWF y CD34). La selección de diferentes marcadores vasculares se debió a que las células endoteliales son muy heterogéneas, y actualmente se carece de un marcador endotelial totalmente sensible y específico (Vermeulen, Gasparini *et al.* 1996, Poncelet, Madelenat *et al.* 2002). Aunque todos estos marcadores vasculares son capaces de identificar vasos sanguíneos, trabajos previos han demostrado que la mayor expresión del marcador CD34 se encuentra en capilares pequeños, ya que actúa como marcador de células progenitoras endoteliales implicadas en el desarrollo de vasos sanguíneos pequeños (Pusztaszeri, Seelentag *et al.* 2006). Sin embargo, el marcador vWF expresa una señal positiva en vasos de mayor calibre, siendo negativo o débilmente positivo en capilares (Pusztaszeri, Seelentag *et al.* 2006). Por otro lado, el marcador vascular CD31, también conocido como PECAM-1, que es una glicoproteína transmembrana miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en las células endoteliales vasculares tempranas y maduras, por lo que puede utilizarse para identificar todo tipo de vasos sanguíneos. Sin embargo, este marcador se ha caracterizado especialmente en las venas (Kawanami, Jin *et al.* 2000, Rakocevic, Orlic *et al.* 2017). Por último, se considera que el marcador VEGF funciona como un marcador panendotelial celular, aunque se expresa preferentemente en la diferenciación arterial en asociación

con la vía de señalización Notch (Boyer-Di Ponio, El-Ayoubi *et al.* 2014). Además, el marcador VEGF tiene un efecto directo sobre la proliferación y migración endotelial (Broll, Erdmann *et al.* 2001), y su sobreexpresión está asociada a la diferenciación vascular (Yan, Wang *et al.* 2011).

En este contexto, se determinó que no existían vasos sanguíneos en la zona B, lo cual no es sorprendente debido al breve periodo de seguimiento empleado para este análisis, solamente una semana. Sin embargo, como se ha descrito previamente los modelos de mucosa oral humana implantados *in vivo* en ratones atímicos durante 4 semanas son capaces de desarrollar abundantes vasos sanguíneos (Sanchez-Quevedo, Alaminos *et al.* 2007). En este sentido, el análisis inmunohistoquímico reveló que las células encontradas en la zona B eran capaces de expresar señal positiva para los marcadores vasculares estudiados, lo que sugiere que estas células podrían encontrarse en una fase temprana de diferenciación vascular. Como era de esperar, las células encontradas en el grupo HOM-HFOM fueron prácticamente negativas para todos los marcadores analizados. Sin embargo, las células de las muestras del grupo control positivo HOM-HUVEC expresaban cantidades elevadas de los marcadores vasculares VEGF, CD31, vWF y CD34, lo que concuerda con el fenotipo de diferenciación vascular de las células HUVEC. En este sentido, los grupos HOM-dBMSC y HOM-dDPSC mostraron cantidades muy elevadas de células positivas para los cuatro marcadores analizados (VEGF, CD31, vWF y CD34), sin diferencias significativas con el grupo control positivo HOM-HUVEC. Por otro lado, los grupos HOM-dADSC, HOM-ndADSC, HOM-ndBMSC y HOM-ndDPSC mostraron una tendencia a mejorar los resultados encontrados en el control negativo HOM-HFOM, pero sólo fueron comparables o incluso superiores a HOM-HUVEC en el grupo HOM-dADSC para el marcador VEGF y en los grupos HOM-ndBMSC, HOM-ndDPSC y HOM-dADSC para el marcador vascular CD34. Los resultados obtenidos sugieren que el uso de MSC para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana puede estar relacionado con un proceso activo de diferenciación celular hacia linajes vasculares. Este proceso podría facilitar la generación de vasos sanguíneos maduros en una fase más avanzada de diferenciación, la cual podría alcanzarse con mayores tiempos implantación *in vivo* en animales de experimentación. Otra

hipótesis que se podría plantear para explicar estos resultados es que las MSC diferenciadas empleadas para la generación de los modelos mejorados de mucosa oral podrían estar migrando hacia la zona C, la zona de interfaz entre el tejido nativo del huésped y el modelo mejorado de mucosa oral humana, lo que contribuiría a la formación de vasos sanguíneos en esta zona.

Por otro lado, la alta densidad celular observada en la zona B podría favorecer el proceso de diferenciación vascular de las células. De este modo, trabajos previos han demostrado que las MSC sometidas a diferenciación vascular tienden a migrar y formar agrupaciones celulares densas, ya que se requiere de una estrecha interacción célula-célula para formar redes vasculares bien definidas (Hirschi, Li *et al.* 2014, Takebe, Enomura *et al.* 2015, Rouwkema and Khademhosseini 2016).

Tras analizar la zona de remodelación correspondiente a la zona B, se pasará a evaluar la zona C, zona de interfase con un alto contenido vascular entre el tejido nativo del huésped, el ratón atímico, y los modelos mejorados de mucosa oral humana implantados. Con el fin de determinar la capacidad de inducir la formación de vasos sanguíneos de los seis grupos de los modelos mejorados de mucosa oral humana (HOM-ndADSC, HOM-ndBMSC, HOM-ndDPSC, HOM-dADSC, HOM-dBMSC, HOM-dDPSC) generados en la presente Tesis Doctoral, se realizó un análisis de la densidad de microvasos (DMV) en la zona C de cada muestra. En este sentido, para realizar el análisis de DMV se emplearon los cuatro marcadores vasculares descritos previamente (VEGF, CD31, vWF y CD34), lo que permitió evaluar la presencia de vasos sanguíneos en cada muestra de forma independiente (Poncelet, Madelenat *et al.* 2002). Mediante un análisis combinado de estos cuatro marcadores vasculares, se pudo evaluar el número de vasos sanguíneos que se formaron en la zona C de los modelos mejorados de mucosa oral humana y, además contribuir a la caracterización del tipo de vaso que se ha desarrollado en cada grupo estudiado en la presente Tesis Doctoral.

En este contexto, los resultados de este análisis mostraron que el uso de HUVEC en el grupo control positivo aumentaba significativamente la DMV en la zona C, confirmando trabajos anteriores en los que se demostraba el potencial de vascularización de estas células (Nishiyama, Akagi *et al.* 2019). En este sentido,



los resultados de la presente Tesis Doctoral sugieren que la mayoría de los vasos sanguíneos detectados en la zona C de los modelos mejorados de mucosa oral humana correspondían a capilares, ya fueron positivos para el marcador vascular CD34, con un número menor de vasos positivos cuando se analizaban los marcadores vasculares vWF, CD31 y VEGF. Estos resultados son plausibles, ya que se espera que en primer lugar se formen vasos sanguíneos de bajo tamaño, seguidos de vasos de mayor calibre como arterias y venas. Cabe destacar que el uso de MSC en los modelos mejorados de mucosa oral humana ha permitido un aumento de la DMV en comparación con el grupo control negativo generado con fibroblastos de mucosa oral exclusivamente HOM-HFOM. Este resultado destaca especialmente en el caso de los grupos HOM-dBMSC y HOM-dDPSC, que mostraron un número de vasos sanguíneos muy similar al del control positivo HOM-HUVEC. Sin embargo, deberían de realizarse estudios futuros con periodos de implantación *in vivo* más largos, lo que permitiría determinar si se produce la formación de vasos de mayor calibre.

Otro de los hallazgos interesantes que se produjeron en este análisis es que las MSC no diferenciadas también mostraron cierta capacidad para inducir la formación de vasos sanguíneos, aunque a un nivel inferior que las MSC diferenciadas. Cabe destacar que todos estos resultados concuerdan con el estudio *in vitro* que se realizó previamente, en el que las MSC no diferenciadas expresaron algunos de los marcadores vasculares, lo que puede deberse a la capacidad pluripotencial de estas células (Machado, Passos *et al.* 2016, Sevari, Shahnazi *et al.* 2020).

Una cuestión que queda sin resolver tras el análisis realizado en la presente Tesis Doctoral es el mecanismo mediante el cual las células son capaces de aumentar la DMV en los modelos mejorados de mucosa oral humana. Este proceso puede deberse a que la mayoría de los vasos sanguíneos que se encuentran en la zona C han sido formados por un proceso de angiogénesis a partir de los vasos del huésped, el ratón atímico, mientras que las células que han experimentado una diferenciación vascular en la zona B podrían corresponder a células humanas que migran y se unen a la red vascular del huésped en la zona C. Pero otra posible explicación sería que el mayor número de vasos encontrado en la zona C de ciertos grupos (especialmente, HOM-

dBMSC y HOM-dDPSC) sea consecuencia de un proceso de vasculogénesis en el cual las MSC humanas implantadas han originado la formación de redes vasculares de *novo* que se interconectan e integran con los vasos del huésped. Teniendo en cuenta estas dos hipótesis, lo más probable es que en realidad se haya producido un mecanismo combinado de ambas, el cual incluya un proceso activo tanto de angiogénesis como de vasculogénesis. Esta tercera hipótesis concordaría con los resultados hallados en la presente Tesis Doctoral para la detección inmunológica de células humanas mediante el anticuerpo anti-mitocondria, demostrando la presencia en el lugar del injerto de vasos compuestos por células humanas junto con vasos compuestos por células del huésped. En este sentido, trabajos previos han demostrado que el anticuerpo anti-mitocondria empleado para este análisis, es específico para células humanas. De este modo, se ha podido identificar de forma específica la localización de las células humanas injertadas en los ratones atímicos en los que se realizó la implantación de los modelos mejorados de mucosa oral humana (Zhang, Ahluwalia *et al.* 2010, Huang, Liu *et al.* 2017).

En resumen, los resultados de la presente Tesis Doctoral sugieren que el uso de ciertos tipos de MSC (ADSC, BMSC, DPSC) para la generación de modelos mejorados de mucosa oral humana, especialmente HOM-dBMSC y HOM-dDPSC, se asocia con un aumento significativo de la formación de vasos sanguíneos tras su implantación *in vivo* en ratones atímicos. Estos hallazgos abren la puerta al uso futuro de MSC prediferenciadas para inducir la rápida formación de una red vascular tras la implantación de modelos de mucosa oral humana en pacientes. Además, deberían de realizarse estudios futuros para determinar si los resultados obtenidos para los modelos mejorados de mucosa oral humana son también aplicables a la generación de otros tipos de tejidos y órganos humanos, que requieran complejas redes vasculares, mediante protocolos de IT con mayor potencial de vascularización, como es el caso de la piel o el paladar humano.

La optimización de los modelos de mucosa oral humana previamente desarrollados por el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada en la presente Tesis Doctoral ha consistido fundamentalmente en dos mejoras, En primer lugar, la optimización de nuevos biomateriales con el objetivo de

mejorar las propiedades biomecánicas de los sustitutos artificiales de mucosa oral humana, y en segundo lugar, la mejora de los procesos de biointegración a partir de la incorporación de MSC con capacidad de vascularización en el estoma de los sustitutos artificiales de mucosa oral humana, para así generar modelos de mucosa oral humana prevascularizados.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral ponen de relieve que las dos mejoras planteadas representan un importante avance para el futuro proceso de translación clínica de la mucosa oral humana artificial generada mediante protocolos de IT. Esta potencial translación clínica tendría una gran importancia en la sanidad actual, ya que permitiría el tratamiento de patologías graves que afectan a la cavidad oral como son los traumatismos, las enfermedades periodontales graves o el cáncer oral.

## **CONCLUSIONES**

---



1. La metodología utilizada en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha permitido la obtención de nuevos modelos de estroma artificial funcionalizados aplicables a la generación por Ingeniería Tisular de distintas variedades de mucosa oral. La funcionalización alcanzada se sustenta en la optimización de las propiedades biomecánicas del biomaterial de fibrina y agarosa utilizado, y en la incorporación de componentes celulares vasculo-nutricionales derivados de células madre mesenquimales de distinta naturaleza.
2. La utilización en el proceso de biofabricación del biomaterial polimérico de fibrina y agarosa que conforma el estroma artificial de cinco tipos de agarosa y cuatro niveles de concentración permite la generación de distintos modelos de estroma artificial funcionalizados con propiedades biomecánicas diferentes para cada uno de ellos. Estos resultados ponen de relieve, en tal sentido, que la utilización de la agarosa tipo LM en los protocolos de biofabricación de estroma artificial es compatible con las propiedades biomecánicas que caracterizan a la mucosa oral de revestimiento, mientras que la utilización de la agarosa tipo D1LE en los protocolos de biofabricación de estroma artificial, es compatible con las propiedades biomecánicas que caracterizan a la mucosa oral masticatoria.
3. La utilización de distintos tipos de células madre mesenquimales; células madre mesenquimales del tejido adiposo, células madre mesenquimales de la pulpa dental y células madre mesenquimales de la médula ósea, diferenciadas hacia células endoteliales y, con posterioridad, incorporadas al estroma artificial oral de fibrina y agarosa optimizado biomecánicamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, pone de relieve, en el seno de dicho estroma, la existencia de patrones vasculo-nutricionales significativamente desarrollados cuando, en su proceso de biofabricación, se utilizan células madre mesenquimales de la médula ósea y de la pulpa dental.
4. La biofabricación de nuevos modelos mejorados de estroma artificial de mucosa oral, funcionalizados en sus propiedades biomecánicas y en sus patrones vasculares, permiten la generación por Ingeniería Tisular de distintas variedades histológicas biomiméticas de mucosa oral, susceptibles

de translación a la clínica para su posible uso en protocolos terapéuticos de odontología y cirugía maxilofacial.

## **CONCLUSIONS**

---





1. The methodology used in the development of this Doctoral Thesis has allowed obtaining new models of functionalized artificial stroma applicable to the generation by Tissue Engineering of different varieties of oral mucosa. The functionalization achieved is based on the optimization of the biomechanical properties of the fibrin and agarose biomaterial used, and on the incorporation of vasculonutritional cellular components derived from mesenchymal stem cells of different nature.
2. The use in the biofabrication process of the fibrin-agarose polymeric biomaterial that forms the artificial stroma in five types of agaroses and four levels of concentration allows the generation of different models of functionalized artificial stroma with different biomechanical properties for each of them. Our results show that the use of LM agarose in the artificial stroma biofabrication protocols is compatible with the biomechanical properties that characterize the lining oral mucosa, while the use of D1LE agarose in the artificial stroma biofabrication protocols is compatible with the biomechanical properties that characterize the masticatory oral mucosa.
3. The use of different types of mesenchymal stem cells (fat-derived mesenchymal stem cells, dental pulp mesenchymal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells) differentiated into endothelial cells and subsequently incorporated into biomechanically optimized fibrin-agarose oral artificial stroma, both in vitro and in vivo, highlights significantly developed vasculonutritional patterns within the stroma when bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells are used.
4. The biofabrication of new improved models of artificial oral mucosal stroma, functionalized in their biomechanical properties and vascular patterns, allow the generation by Tissue Engineering of different biomimetic histological varieties of oral mucosa, susceptible of translation to the clinic for their possible use in therapeutic protocols in dentistry and maxillofacial surgery.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



ADAMS, D. (1976). "Keratinization of the oral epithelium." *Ann R Coll Surg Engl* 58(5): 351-358.

AFRA, S. AND M. M. MATIN (2020). "Potential of mesenchymal stem cells for bioengineered blood vessels in comparison with other eligible cell sources." *Cell Tissue Res* 380(1): 1-13.

AIDOUDI, S. AND A. BIKFALVI (2010). "Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis." *Thromb Haemost* 104(5): 941-948.

ALAMINOS, M. AND A. CAMPOS (2023). "The origin of human epithelial tissue." *Histol Histopathol* 38(2): 127-138.

ALAMINOS, M., M. DEL CARMEN SANCHEZ-QUEVEDO, J. I. MUNOZ-AVILA, D. SERRANO, S. MEDIALDEA, I. CARRERAS AND A. CAMPOS (2006). "Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(8): 3311-3317.

ALAMINOS, M., I. GARZON, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, G. MOREU, M. GONZALEZ-ANDRADES, A. FERNANDEZ-MONTOYA AND A. CAMPOS (2007). "Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa." *J Tissue Eng Regen Med* 1(5): 350-359.

ALAMINOS, M., B. PEREZ-KOHLER, I. GARZON, N. GARCIA-HONDUVILLA, B. ROMERO, A. CAMPOS AND J. BUJAN (2010). "Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells." *J Cell Physiol* 223(3): 640-647.

ALFONSO-RODRIGUEZ, C. A., E. GONZALEZ-ANDRADES, B. D. JAIMES-PARRA, R. FERNANDEZ-VALADES, A. CAMPOS, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, M. ALAMINOS AND I. GARZON (2015). "Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes." *Histol Histopathol* 30(11): 1321-1332.

ANISIMOV, A., D. TVOROGOV, A. ALITALO, V. M. LEPPANEN, Y. AN, E. C. HAN, F. ORSENIGO, E. I. GAAL, T. HOLOPAINEN, Y. J. KOH, T. TAMMELA, P. KORPISALO, S. KESKITALO, M. JELTSCH, S. YLA-HERTTUALA, E. DEJANA, G. Y. KOH, C. CHOI, P. SAHARINEN AND K. ALITALO (2013). "Vascular endothelial growth factor-angiopoietin chimera with improved properties for therapeutic angiogenesis." *Circulation* 127(4): 424-434.

ARONOW, W. S. AND J. A. MCCLUNG (2016). *Translational research in coronary artery disease : pathophysiology to treatment*. Amsterdam ; Boston, Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.

ARVIDSON, K., R. C. GRAFSTROM AND A. PEMER (1988). "Scanning electron microscopy of oral mucosa in vivo and in vitro: a review." *Scanning Microsc* 2(1): 385-396.

ATALA, A. (2012). "Regenerative medicine strategies." *J Pediatr Surg* 47(1): 17-28.

BAERGEN, R. N. (2005). *Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta*, Springer New York.

BAJADA, S., I. MAZAKOVA, J. B. RICHARDSON AND N. ASHAMMAKHI (2008). "Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine." *J Tissue Eng Regen Med* 2(4): 169-183.

BARBON, S., E. STOCCO, V. MACCHI, M. CONTRAN, F. GRANDI, A. BOREAN, P. P. PARNIGOTTO, A. PORZIONATO AND R. DE CARO (2019). "Platelet-Rich Fibrin Scaffolds for Cartilage and Tendon Regenerative Medicine: From Bench to Bedside." *Int J Mol Sci* 20(7).

BIANCO, P. AND P. G. ROBEY (2001). "Stem cells in tissue engineering." *Nature* 414(6859): 118-121.

BINYAMIN, G., B. M. SHAFI AND C. M. MERY (2006). "Biomaterials: a primer for surgeons." *Semin Pediatr Surg* 15(4): 276-283.

BLANCO-ELICES, C., J. CHATO-ASTRAIN, S. OYONARTE, F. BERMEJO-CASARES, A. ESPANA-LOPEZ, R. FERNANDEZ-VALADES, M. D. C. SANCHEZ-QUEVEDO, M. ALAMINOS, M. A. MARTIN-PIEDRA AND I. GARZON (2021). "Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential." *J Periodontal Res* 56(6): 1116-1131.

BLANCO-ELICES, C., E. ESPANA-GUERRERO, M. MATEU-SANZ, D. SANCHEZ-PORRAS, O. D. GARCIA-GARCIA, M. D. C. SANCHEZ-QUEVEDO, R. FERNANDEZ-VALADES, M. ALAMINOS, M. A. MARTIN-PIEDRA AND I. GARZON (2020). "In Vitro Generation of Novel Functionalized Biomaterials for Use in Oral and Dental Regenerative Medicine Applications. Running Title: Fibrin-Agarose Functionalized Scaffolds." *Materials (Basel)* 13(7).

BLANCO-ELICES, C., C. MORALES-ALVAREZ, J. CHATO-ASTRAIN, C. GONZALEZ-GALLARDO, P. AVILA-FERNANDEZ, F. CAMPOS, R. CARMONA, M. A. MARTIN-PIEDRA, I. GARZON AND M. ALAMINOS (2023). "Development of stromal differentiation patterns in heterotypical models of artificial corneas generated by tissue engineering." *Front Bioeng Biotechnol* 11: 1124995.

BOCCARDO, S., E. GAUDIELLO, L. MELLY, G. CERINO, D. RICCI, I. MARTIN, F. ECKSTEIN, A. BANFI AND A. MARSANO (2016). "Engineered mesenchymal cell-based patches as controlled VEGF delivery systems to induce extrinsic angiogenesis." *Acta Biomater* 42: 127-135.

BONASSAR, L. J. AND C. A. VACANTI (1998). "Tissue engineering: the first decade and beyond." *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 297-303.

BONHOME-ESPINOSA, A. B., F. CAMPOS, D. DURAND-HERRERA, J. D. SANCHEZ-LOPEZ, S. SCHAUB, J. D. G. DURAN, M. T. LOPEZ-LOPEZ AND V. CARRIEL (2020). "In vitro characterization of a novel magnetic fibrin-agarose hydrogel for cartilage tissue engineering." *J Mech Behav Biomed Mater* 104: 103619.

BONHOME-ESPINOSA, A. B., F. CAMPOS, I. A. RODRIGUEZ, V. CARRIEL, J. A. MARINS, A. ZUBAREV, J. D. G. DURAN AND M. T. LOPEZ-LOPEZ (2017). "Effect of particle

concentration on the microstructural and macromechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels." *Soft Matter* 13(16): 2928-2941.

BOYER-DI PONIO, J., F. EL-AYOUBI, F. GLACIAL, K. GANESHAMOORTHY, C. DRIANCOURT, M. GODET, N. PERRIERE, O. GUILLEVIC, P. O. COURAUD AND G. UZAN (2014). "Instruction of circulating endothelial progenitors in vitro towards specialized blood-brain barrier and arterial phenotypes." *PLoS One* 9(1): e84179.

BRASSOLATTI, P., P. S. BOSSINI, A. L. M. ANDRADE, G. L. F. LUNA, J. V. D. SILVA, L. ALMEIDA-LOPES, M. A. NAPOLITANO, L. AVO, A. M. O. LEAL AND F. F. ANIBAL (2021). "Comparison of two different biomaterials in the bone regeneration (15, 30 and 60 days) of critical defects in rats." *Acta Cir Bras* 36(6): e360605.

BRAYFIELD, C., K. MARRA AND J. P. RUBIN (2010). "Adipose stem cells for soft tissue regeneration." *Handchir Mikrochir Plast Chir* 42(2): 124-128.

BREEN, A., T. O'BRIEN AND A. PANDIT (2009). "Fibrin as a delivery system for therapeutic drugs and biomolecules." *Tissue Eng Part B Rev* 15(2): 201-214.

BROLL, R., H. ERDMANN, M. DUCHROW, E. OEVERMANN, O. SCHWANDNER, U. MARKERT, H. P. BRUCH AND U. WINDHOVEL (2001). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer?" *Eur J Surg Oncol* 27(1): 37-42.

BROWNE, B. M. AND A. J. VANNI (2017). "Use of Alternative Techniques and Grafts in Urethroplasty." *Urol Clin North Am* 44(1): 127-140.

BRYAN, N., H. AHSWIN, N. SMART, Y. BAYON, S. WOHLERT AND J. A. HUNT (2014). "The in vivo evaluation of tissue-based biomaterials in a rat full-thickness abdominal wall defect model." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102(4): 709-720.

BYKOV, V. L. (2010). "[Tissue engineering of the oral mucosa]." *Morfologija* 137(1): 62-70.

CAMPOS, A. (2004). *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de Ingreso Real Academia Nacional de Medicina.*

CAMPOS, A. (2023). *La historia médica. Su ser y su tiempo. Discurso leído en la solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2023.*

CAMPOS, F., A. B. BONHOME-ESPINOSA, G. VIZCAINO, I. A. RODRIGUEZ, D. DURAN-HERRERA, M. T. LOPEZ-LOPEZ, I. SANCHEZ-MONTESINOS, M. ALAMINOS, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO AND V. CARRIEL (2018). "Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications." *Biomed Mater* 13(2): 025021.

CAPLAN, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." *J Orthop Res* 9(5): 641-650.



CAREY, B. S., K. V. POULTON AND A. POLES (2020). "HLA expression levels of unstimulated and cytokine stimulated human umbilical vein endothelial cells." *HLA* 95(6): 505-515.

CARLETTI, E., A. MOTTA AND C. MIGLIARESI (2011). "Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture." *Methods Mol Biol* 695: 17-39.

CARRIEL, V. (2017). Preclinical Evaluation of Bio-artificial Conduits Developed by Tissue Engineering for Peripheral Nerve Regeneration PhD, Ghent University. Faculty of Medicine and Health Sciences; University of Granada. Faculty of Medicine.

CARRIEL, V., M. ALAMINOS, I. GARZON, A. CAMPOS AND M. CORNELISSEN (2014). "Tissue engineering of the peripheral nervous system." *Expert Rev Neurother* 14(3): 301-318.

CARRIEL, V., I. GARZON, J. M. JIMENEZ, A. C. OLIVEIRA, S. ARIAS-SANTIAGO, A. CAMPOS, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO AND M. ALAMINOS (2012). "Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials." *Cells Tissues Organs* 196(1): 1-12.

CARRIEL, V., S. GEUNA AND M. ALAMINOS (2018). "Ex Vivo and In Vivo Stem Cells-Based Tissue Engineering Strategies for Their Use in Regenerative Medicine." *Stem Cells Int* 2018: 7143930.

CARRIEL, V., G. SCIONTI, F. CAMPOS, O. RODA, B. CASTRO, M. CORNELISSEN, I. GARZON AND M. ALAMINOS (2017). "In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute." *J Tissue Eng Regen Med* 11(5): 1412-1426.

CASSARO, C. V., L. A. JUSTULIN, JR., P. R. DE LIMA, M. A. GOLIM, N. P. BISCOLA, M. V. DE CASTRO, A. L. R. DE OLIVEIRA, D. P. DOICHE, E. J. PEREIRA, R. S. FERREIRA, JR. AND B. BARRAVIERA (2019). "Fibrin biopolymer as scaffold candidate to treat bone defects in rats." *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 25: e20190027.

CELTIKCI, B., G. K. ERKMEN AND Z. G. DIKMEN (2020). "Regulation And Effect Of Telomerase And Telomeric Length In Stem Cells." *Curr Stem Cell Res Ther*.

CHANDRA, P. AND A. ATALA (2019). "Engineering blood vessels and vascularized tissues: technology trends and potential clinical applications." *Clin Sci (Lond)* 133(9): 1115-1135.

CHANDRA, V., S. G. S. PHADNIS, P. D. NAIR AND R. R. BHONDE (2009). "Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells." *Stem Cells* 27(8): 1941-1953.

CHEN, J., R. AHMAD, W. LI, M. SWAIN AND Q. LI (2015). "Biomechanics of oral mucosa." *J R Soc Interface* 12(109): 20150325.

CHENG, X., T. QU, C. MA, D. XIANG, Q. YU AND X. LIU (2017). "Bioactive mono-dispersed nanospheres with long-term antibacterial effects for endodontic sealing." *J Mater Chem B* 5(6): 1195-1204.

CHIU, L. L. AND M. RADISIC (2010). "Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues." *Biomaterials* 31(2): 226-241.

CIOROIANU, A. R. AND C. STORM (2013). "Normal stresses in elastic networks." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 88(5): 052601.

COLLAS, P. AND A. M. HAKELIEN (2003). "Teaching cells new tricks." *Trends Biotechnol* 21(8): 354-361.

COMMISSION, U. S. N. B. A. (1999). *Ethical Issues in Human Stem Cell Research: Report and recommendations of the National Bioethics Advisory Commission, National Bioethics Advisory Commission.*

CONCONI, M. T., P. BURRA, R. DI LIDDO, C. CALORE, M. TURETTA, S. BELLINI, P. BO, G. G. NUSSDORFER AND P. P. PARNIGOTTO (2006). "CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential." *Int J Mol Med* 18(6): 1089-1096.

CUENDE, N. (2013). "Andalusian initiative for advanced therapies: fostering synergies." *Stem Cells Transl Med* 2(4): 243-245.

CUENDE, N. AND A. IZETA (2010). "Clinical translation of stem cell therapies: a bridgeable gap." *Cell Stem Cell* 6(6): 508-512.

CUENDE, N., L. RICO AND C. HERRERA (2012). "Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation?" *Stem Cells Transl Med* 1(5): 403-408.

DELUIZ, D., G. J. DELCROIX, G. D'IPPOLITO, C. GRAU-MONGE, A. BONNIN-MARQUEZ, T. REINER, E. M. B. TINOCO, T. AMADEU, F. R. PIRES AND P. C. SCHILLER (2019). "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell-Seeded Bone Biomaterial Directs Fast and Superior Mandibular Bone Augmentation in Rats." *Sci Rep* 9(1): 11806.

DIMITRIEVSKA, S. AND L. E. NIKLASON (2018). "Historical Perspective and Future Direction of Blood Vessel Developments." *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(2).

DISEASE, G. B. D., I. INJURY AND C. PREVALENCE (2018). "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017." *Lancet* 392(10159): 1789-1858.

DOMINICI, M., K. LE BLANC, I. MUELLER, I. SLAPER-CORTENBACH, F. MARINI, D. KRAUSE, R. DEANS, A. KEATING, D. PROCKOP AND E. HORWITZ (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4): 315-317.

DURAND-HERRERA, D., F. CAMPOS, B. D. JAIMES-PARRA, J. D. SANCHEZ-LOPEZ, R. FERNANDEZ-VALADES, M. ALAMINOS, A. CAMPOS AND V. CARRIEL (2018). "Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of

microtissues for tissue engineering applications." *Histochem Cell Biol* 150(4): 379-393.

EGANA, J. T., F. A. FIERRO, S. KRUGER, M. BORNHAUSER, R. HUSS, S. LAVANDERO AND H. G. MACHENS (2009). "Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration." *Tissue Eng Part A* 15(5): 1191-1200.

EVANS, M. J. AND M. H. KAUFMAN (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* 292(5819): 154-156.

FAGOGENI, I., J. METLERSKA, M. LIPSKI, T. FALGOWSKI, G. MACIEJ AND A. NOWICKA (2019). "Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration." *J Oral Sci* 61(3): 379-385.

FANG, T., W. C. LINEAWEAVER, F. C. SAILES, C. KISNER AND F. ZHANG (2014). "Clinical application of cultured epithelial autografts on acellular dermal matrices in the treatment of extended burn injuries." *Ann Plast Surg* 73(5): 509-515.

FEINBERG, S. E., T. L. AGHALOO AND L. L. CUNNINGHAM, JR. (2005). "Role of tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction: findings of the 2005 AAOMS Research Summit." *J Oral Maxillofac Surg* 63(10): 1418-1425.

FELLER, L., R. A. G. KHAMMISSA AND J. LEMMER (2017). "A Review of the Aetiopathogenesis and Clinical and Histopathological Features of Oral Mucosal Melanoma." *ScientificWorldJournal* 2017: 9189812.

FERNANDEZ-VALADES-GAMEZ, R., I. GARZON, E. LICERAS-LICERAS, A. ESPANA-LOPEZ, V. CARRIEL, M. A. MARTIN-PIEDRA, M. A. MUNOZ-MIGUELSANZ, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, M. ALAMINOS AND R. FERNANDEZ-VALADES (2016). "Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect." *Biomed Mater* 11(1): 015015.

FIGUEROA, F. E., F. CARRION, S. VILLANUEVA AND M. KHOURY (2012). "Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review." *Biol Res* 45(3): 269-277.

FLAMME, I., T. FROLICH AND W. RISAU (1997). "Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis." *J Cell Physiol* 173(2): 206-210.

FLEISCH, L. AND J. C. AUSTIN (1978). "A histologic study of the response of masticatory and lining mucosa to mechanical loading in the vervet monkey." *J Prosthet Dent* 39(2): 211-216.

FRUEH, F. S., M. D. MENGER, N. LINDENBLATT, P. GIOVANOLI AND M. W. LASCHKE (2017). "Current and emerging vascularization strategies in skin tissue engineering." *Crit Rev Biotechnol* 37(5): 613-625.

GARCIA-GARCIA, O. D., M. EL SOURY, F. CAMPOS, D. SANCHEZ-PORRAS, S. GEUNA, M. ALAMINOS, G. GAMBAROTTA, J. CHATO-ASTRAIN, S. RAIMONDO AND V. CARRIEL (2023). "Comprehensive ex vivo and in vivo preclinical evaluation of novel chemo

enzymatic decellularized peripheral nerve allografts." *Front Bioeng Biotechnol* 11: 1162684.

GARZON, I., V. CARRIEL, A. B. MARIN-FERNANDEZ, A. C. OLIVEIRA, J. GARRIDO-GOMEZ, A. CAMPOS, C. SANCHEZ-QUEVEDO MDEL AND M. ALAMINOS (2012). "A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering." *PLoS One* 7(12): e51961.

GARZON, I., B. D. JAIMES-PARRA, M. PASCUAL-GELER, J. M. COZAR, M. D. C. SANCHEZ-QUEVEDO, M. A. MOSQUERA-PACHECO, I. SANCHEZ-MONTESINOS, R. FERNANDEZ-VALADES, F. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2021). "Biofabrication of a Tubular Model of Human Urothelial Mucosa Using Human Wharton Jelly Mesenchymal Stromal Cells." *Polymers (Basel)* 13(10).

GARZON, I., M. A. MARTIN-PIEDRA, V. CARRIEL, M. ALAMINOS, X. LIU AND R. N. D'SOUZA (2018). "Bioactive injectable aggregates with nanofibrous microspheres and human dental pulp stem cells: A translational strategy in dental endodontics." *J Tissue Eng Regen Med* 12(1): 204-216.

GARZON, I., J. MIYAKE, M. GONZALEZ-ANDRADES, R. CARMONA, C. CARDA, C. SANCHEZ-QUEVEDO MDEL, A. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2013). "Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration." *Stem Cells Transl Med* 2(8): 625-632.

GARZON, I., B. PEREZ-KOHLER, J. GARRIDO-GOMEZ, V. CARRIEL, R. NIETO-AGUILAR, M. A. MARTIN-PIEDRA, N. GARCIA-HONDUVILLA, J. BUJAN, A. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2012). "Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy." *Tissue Eng Part C Methods* 18(6): 408-419.

GARZON, I., M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, G. MOREU, M. GONZALEZ-JARANAY, M. GONZALEZ-ANDRADES, A. MONTALVO, A. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2009). "In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa." *J Periodontal Res* 44(5): 588-597.

GAUDIELLO, E., L. MELLY, G. CERINO, S. BOCCARDO, S. JALILI-FIROOZINEZHAD, L. XU, F. ECKSTEIN, I. MARTIN, B. A. KAUFMANN, A. BANFI AND A. MARSANO (2017). "Scaffold Composition Determines the Angiogenic Outcome of Cell-Based Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Modulating Its Microenvironmental Distribution." *Adv Healthc Mater* 6(24).

GENESER, F. (1993). *Histología*. Buenos Aires ; Madrid, Médica Panamericana.

GERLACH, J. C., Y. C. LIN, C. A. BRAYFIELD, D. M. MINTTEER, H. LI, J. P. RUBIN AND K. G. MARRA (2012). "Adipogenesis of human adipose-derived stem cells within three-dimensional hollow fiber-based bioreactors." *Tissue Eng Part C Methods* 18(1): 54-61.

GÓMEZ DE FERRARIS, M. E. AND A. CAMPOS MUÑOZ (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Madrid, Editorial Médica Panamericana.

GONZALEZ-QUEVEDO, D., D. SANCHEZ-PORRAS, O. D. GARCIA-GARCIA, J. CHATO-ASTRAIN, M. DIAZ-RAMOS, A. CAMPOS, V. CARRIEL AND F. CAMPOS (2022). "Nanostructured fibrin-based hydrogel membranes for use as an augmentation strategy in Achilles tendon surgical repair in rats." *Eur Cell Mater* 43: 162-178.

GONZALEZ-SERRANO, J., J. SERRANO, R. M. LOPEZ-PINTOR, V. M. PAREDES, E. CASANAS AND G. HERNANDEZ (2016). "Prevalence of Oral Mucosal Disorders in Diabetes Mellitus Patients Compared with a Control Group." *J Diabetes Res* 2016: 5048967.

GRIFFITH, L. G. AND G. NAUGHTON (2002). "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities." *Science* 295(5557): 1009-1014.

GRONTHOS, S., M. MANKANI, J. BRAHIM, P. G. ROBEY AND S. SHI (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13625-13630.

GU, X., F. DING AND D. F. WILLIAMS (2014). "Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration." *Biomaterials* 35(24): 6143-6156.

GUO, S., I. REDENSKI, S. LANDAU, A. SZKLANNY, U. MERDLER AND S. LEVENBERG (2020). "Prevascularized Scaffolds Bearing Human Dental Pulp Stem Cells for Treating Complete Spinal Cord Injury." *Adv Healthc Mater* 9(20): e2000974.

HARRIS, A. F., J. LACOMBE AND F. ZENHAUSERN (2021). "The Emerging Role of Decellularized Plant-Based Scaffolds as a New Biomaterial." *Int J Mol Sci* 22(22).

HE, J., X. HU, J. CAO, Y. ZHANG, J. XIAO, L. PENG, D. CHEN, C. XIONG AND L. ZHANG (2021). "Chitosan-coated hydroxyapatite and drug-loaded poly(trimethylene carbonate)/polylactic acid scaffold for enhancing bone regeneration." *Carbohydr Polym* 253: 117198.

HEANEY, J. L. J., S. FAUSTINI, L. EVANS, A. RAPSON, E. COLLMAN, A. EMERY, J. P. CAMPBELL, S. MOORE, M. GOODALL, Z. AFZAL, I. L. CHAPPLE, G. PRATT AND M. T. DRAYSON (2022). "Investigating the utility of saliva immunoglobulins for the detection of myeloma and using myeloma proteins to clarify partition between oral and systemic immunity." *Eur J Haematol* 108(6): 493-502.

HEIL, M., I. EITENMULLER, T. SCHMITZ-RIXEN AND W. SCHAPER (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." *J Cell Mol Med* 10(1): 45-55.

HELLER, M., E. V. FRERICK-OCHS, H. K. BAUER, E. SCHIEGNITZ, D. FLESCH, J. BRIEGER, R. STEIN, B. AL-NAWAS, C. BROCHHAUSEN, J. W. THUROFF, R. E. UNGER AND W. BRENNER (2016). "Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts." *Biomaterials* 77: 207-215.

HERBERT, S. P. AND D. Y. STAINIER (2011). "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(9): 551-564.

- HIRSCHI, K. K., S. LI AND K. ROY (2014). "Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine." *Annu Rev Biomed Eng* 16: 277-294.
- HIYAMA, E. AND K. HIYAMA (2007). "Telomere and telomerase in stem cells." *Br J Cancer* 96(7): 1020-1024.
- HUANG, L., Y. LIU, J. LU, B. CERQUEIRA, V. MISRA AND T. Q. DUONG (2017). "Intraarterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in hyperacute stroke improves vascular function." *Stem Cell Res Ther* 8(1): 74.
- HUANG, M., Y. HUANG, H. LIU, Z. TANG, Y. CHEN, Z. HUANG, S. XU, J. DU AND B. JIA (2022). "Hydrogels for the treatment of oral and maxillofacial diseases: current research, challenges, and future directions." *Biomater Sci* 10(22): 6413-6446.
- HUTMACHER, D. W., J. C. GOH AND S. H. TEOH (2001). "An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications." *Ann Acad Med Singapore* 30(2): 183-191.
- IBRAHIM, A. M., M. A. MOSS, Z. GRAY, M. D. ROJO, C. M. BURKE, K. L. SCHWERTFEGER, C. O. DOS SANTOS AND H. L. MACHADO (2020). "Diverse Macrophage Populations Contribute to the Inflammatory Microenvironment in Premalignant Lesions During Localized Invasion." *Front Oncol* 10: 569985.
- IGARASHI, M., C. R. IRWIN, M. LOCKE AND I. C. MACKENZIE (2003). "Construction of large area organotypical cultures of oral mucosa and skin." *J Oral Pathol Med* 32(7): 422-430.
- ILAMARAN, M., A. SUNDARAPANDIAN, M. AARTHY, G. SHANMUGAM, G. PONESAKKI, K. N. RAMUDU AND A. NIRAIKULAM (2020). "Growth factor-mimicking 3,4-dihydroxyphenylalanine-encoded bioartificial extracellular matrix like protein promotes wound closure and angiogenesis." *Biomater Sci* 8(23): 6773-6785.
- IMAIZUMI, F., I. ASAHINA, T. MORIYAMA, M. ISHII AND K. OMURA (2004). "Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane." *Tissue Eng* 10(5-6): 657-664.
- IONESCU, A. M., M. ALAMINOS, J. DE LA CRUZ CARDONA, J. DE DIOS GARCIA-LOPEZ DURAN, M. GONZALEZ-ANDRADES, R. GHINEA, A. CAMPOS, E. HITA AND M. DEL MAR PEREZ (2011). "Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties." *J Mech Behav Biomed Mater* 4(8): 1963-1973.
- IRASTORZA-LORENZO, A., D. SANCHEZ-PORRAS, O. ORTIZ-ARRABAL, M. J. DE FRUTOS, E. ESTEBAN, J. FERNANDEZ, A. JANER, A. CAMPOS, F. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2021). "Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications." *Int J Mol Sci* 22(4).
- IZUMI, K., G. TAKACS, H. TERASHI AND S. E. FEINBERG (1999). "Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent." *J Oral Maxillofac Surg* 57(5): 571-577; discussion 577-578.

JANG, E. H., J. H. KIM, J. H. LEE, D. H. KIM AND Y. N. YOUN (2020). "Enhanced Biocompatibility of Multi-Layered, 3D Bio-Printed Artificial Vessels Composed of Autologous Mesenchymal Stem Cells." *Polymers (Basel)* 12(3).

JIN, M., J. SHI, W. ZHU, H. YAO AND D. A. WANG (2021). "Polysaccharide-Based Biomaterials in Tissue Engineering: A Review." *Tissue Eng Part B Rev* 27(6): 604-626.

JOHARI, N., A. KHODAEI, A. SAMADIKUCHAKSARAEI, R. L. REIS, S. C. KUNDU AND L. MORONI (2022). "Ancient fibrous biomaterials from silkworm protein fibroin and spider silk blends: Biomechanical patterns." *Acta Biomater* 153: 38-67.

JORGENSEN, A. M., J. J. YOO AND A. ATALA (2020). "Solid Organ Bioprinting: Strategies to Achieve Organ Function." *Chem Rev* 120(19): 11093-11127.

KAJIYAMA, H., T. S. HAMAZAKI, M. TOKUHARA, S. MASUI, K. OKABAYASHI, K. OHNUMA, S. YABE, K. YASUDA, S. ISHIURA, H. OKOCHI AND M. ASASHIMA (2010). "Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice." *Int J Dev Biol* 54(4): 699-705.

KANNAN, R. Y., H. J. SALACINSKI, K. SALES, P. BUTLER AND A. M. SEIFALIAN (2005). "The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of microvascular networks: a review." *Biomaterials* 26(14): 1857-1875.

KAWANAMI, O., E. JIN, M. GHAZIZADEH, M. FUJIWARA, L. JIANG, M. NAGASHIMA, H. SHIMIZU, T. TAKEMURA, Y. OHAKI, S. ARAI, M. GOMIBUCHI, K. TAKEDA, Z. X. YU AND V. J. FERRANS (2000). "Heterogeneous distribution of thrombomodulin and von Willebrand factor in endothelial cells in the human pulmonary microvessels." *J Nippon Med Sch* 67(2): 118-125.

KELM, J. M., C. DIAZ SANCHEZ-BUSTAMANTE, E. EHLER, S. P. HOERSTRUP, V. DJONOV, L. ITTNER AND M. FUSSENEGGER (2005). "VEGF profiling and angiogenesis in human microtissues." *J Biotechnol* 118(2): 213-229.

KIERSZENBAUM, A. L. AND L. L. TRES (2015). *Histología y biología celular : introducción a la anatomía patológica*. Barcelona, Elsevier.

KIM, J. J., L. HOU AND N. F. HUANG (2016). "Vascularization of three-dimensional engineered tissues for regenerative medicine applications." *Acta Biomater* 41: 17-26.

KIM, K. AND G. EVANS "Tissue engineering: the future of stem cells."

KIM, W., V. L. FERGUSON, M. BORDEN AND C. P. NEU (2016). "Application of Elastography for the Noninvasive Assessment of Biomechanics in Engineered Biomaterials and Tissues." *Ann Biomed Eng* 44(3): 705-724.

KINIKOGLU, B., C. AUXENFANS, P. PIERRILLAS, V. JUSTIN, P. BRETON, C. BURILLON, V. HASIRCI AND O. DAMOUR (2009). "Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent." *Biomaterials* 30(32): 6418-6425.

KINIKOGLU, B., O. DAMOUR AND V. HASIRCI (2015). "Tissue engineering of oral mucosa: a shared concept with skin." *J Artif Organs* 18(1): 8-19.

KINIKOGLU, B., M. R. ROVERE, M. HAFTEK, V. HASIRCI AND O. DAMOUR (2012). "Influence of the mesenchymal cell source on oral epithelial development." *J Tissue Eng Regen Med* 6(3): 245-252.

KJELL, J., J. FISCHER-STERNJAK, A. J. THOMPSON, C. FRIESS, M. J. STICCO, F. SALINAS, J. COX, D. C. MARTINELLI, J. NINKOVIC, K. FRANZE, H. B. SCHILLER AND M. GOTZ (2020). "Defining the Adult Neural Stem Cell Niche Proteome Identifies Key Regulators of Adult Neurogenesis." *Cell Stem Cell* 26(2): 277-293 e278.

KLAR, A. S., S. GUVEN, J. ZIMOCZ, N. A. ZAPIORKOWSKA, T. BIEDERMANN, S. BOTTCHER-HABERZETH, C. MEULI-SIMMEN, I. MARTIN, A. SCHERBERICH, E. REICHMANN AND M. MEULI (2016). "Characterization of vasculogenic potential of human adipose-derived endothelial cells in a three-dimensional vascularized skin substitute." *Pediatr Surg Int* 32(1): 17-27.

KOBAYASHI, S., N. KANAI, T. OHKI, R. TAKAGI, N. YAMAGUCHI, H. ISOMOTO, Y. KASAI, T. HOSOI, K. NAKAO, S. EGUCHI, M. YAMAMOTO, M. YAMATO AND T. OKANO (2014). "Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection." *World J Gastroenterol* 20(41): 15098-15109.

KOSCHIER, F., V. KOSTRUBSKY, C. TOOLE AND M. A. GALLO (2011). "In vitro effects of ethanol and mouthrinse on permeability in an oral buccal mucosal tissue construct." *Food Chem Toxicol* 49(10): 2524-2529.

KULASEKARA, K. K., O. M. LUKANDU, E. NEPPELBERG, O. K. VINTERMYR, A. C. JOHANNESSEN AND D. E. COSTEA (2009). "Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer." *Arch Oral Biol* 54(10): 924-931.

LANGER, R. AND J. P. VACANTI (1993). "Tissue engineering." *Science* 260(5110): 920-926.

LANZA, R. P., J. B. CIBELLI, F. DIAZ, C. T. MORAES, P. W. FARIN, C. E. FARIN, C. J. HAMMER, M. D. WEST AND P. DAMIANI (2000). "Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer." *Cloning* 2(2): 79-90.

LANZA, R. P., R. S. LANGER AND J. VACANTI (2007). *Principles of tissue engineering*. Amsterdam ; Boston, Elsevier / Academic Press.

LANZA, R. P., R. S. LANGER, J. VACANTI AND A. ATALA (2020). *Principles of tissue engineering*. London, Academic Press, an imprint of Elsevier.

LARSSON, L., A. M. DECKER, L. NIBALI, S. P. PILIPCHUK, T. BERGLUNDH AND W. V. GIANNOBILE (2016). "Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases." *J Dent Res* 95(3): 255-266.

LAUER, G. AND R. SCHIMMING (2001). "Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and



immunohistologic study." *J Oral Maxillofac Surg* 59(2): 169-175; discussion 175-167.

LEE, D. Y., H. B. KIM, I. K. SHIM, N. KANAI, T. OKANO AND S. K. KWON (2017). "Treatment of chemically induced oral ulcer using adipose-derived mesenchymal stem cell sheet." *J Oral Pathol Med* 46(7): 520-527.

LEE, J., E. H. KIM, D. SHIN AND J. L. ROH (2017). "Accelerated oral wound healing using a pre-vascularized mucosal cell sheet." *Sci Rep* 7(1): 10667.

LEE, J., D. SHIN AND J. L. ROH (2018). "Use of a pre-vascularised oral mucosal cell sheet for promoting cutaneous burn wound healing." *Theranostics* 8(20): 5703-5712.

LIAU, L. L., B. H. I. RUSZYMAH, M. H. NG AND J. X. LAW (2020). "Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells." *Curr Res Transl Med* 68(1): 5-16.

LIU, H., S. GRONTHOS AND S. SHI (2006). "Dental pulp stem cells." *Methods Enzymol* 419: 99-113.

LU, L. L., Y. J. LIU, S. G. YANG, Q. J. ZHAO, X. WANG, W. GONG, Z. B. HAN, Z. S. XU, Y. X. LU, D. LIU, Z. Z. CHEN AND Z. C. HAN (2006). "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials." *Haematologica* 91(8): 1017-1026.

LU, W., W. XU, J. LI, Y. CHEN, Y. PAN AND B. WU (2019). "Effects of vascular endothelial growth factor and insulin growth factor1 on proliferation, migration, osteogenesis and vascularization of human carious dental pulp stem cells." *Mol Med Rep* 20(4): 3924-3932.

LUND, R. J., M. LOYTOMAKI, T. NAUMANEN, C. DIXON, Z. CHEN, H. AHLFORS, S. TUOMELA, J. TAHVANAINEN, J. SCHEININ, T. HENTTINEN, O. RASOOL AND R. LAHESMAA (2007). "Genome-wide identification of novel genes involved in early Th1 and Th2 cell differentiation." *J Immunol* 178(6): 3648-3660.

MACHADO, C. V., S. T. PASSOS, T. M. CAMPOS, L. BERNARDI, D. S. VILAS-BOAS, J. E. NOR, P. D. TELLES AND I. L. NASCIMENTO (2016). "The dental pulp stem cell niche based on aldehyde dehydrogenase 1 expression." *Int Endod J* 49(8): 755-763.

MARTIN-CANO, F., I. GARZON, C. MARANES, E. LICERAS, M. A. MARTIN-PIEDRA, A. M. RUIZ-MONTES, M. ALAMINOS AND R. FERNANDEZ-VALADES (2013). "Histological and immunohistochemical changes in the rat oral mucosa used as an autologous urethral graft." *J Pediatr Surg* 48(7): 1557-1564.

MARTIN-PIEDRA, M. A., C. A. ALFONSO-RODRIGUEZ, A. ZAPATER, D. DURAND-HERRERA, J. CHATO-ASTRAIN, F. CAMPOS, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, M. ALAMINOS AND I. GARZON (2019). "Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering." *Eur Cell Mater* 37: 233-249.

MARTIN-PIEDRA, M. A., I. GARZON, A. C. OLIVEIRA, C. A. ALFONSO-RODRIGUEZ, V. CARRIEL, G. SCIONTI AND M. ALAMINOS (2014). "Cell viability and proliferation

capability of long-term human dental pulp stem cell cultures." *Cytotherapy* 16(2): 266-277.

MARTIN-PIEDRA, M. A., A. SANTISTEBAN-ESPEJO, J. A. MORAL-MUNOZ, F. CAMPOS, J. CHATO-ASTRAIN, O. D. GARCIA-GARCIA, D. SANCHEZ-PORRAS AND A. CAMPOS (2020). "An Evolutive and Scientometric Research on Tissue Engineering Reviews." *Tissue Eng Part A* 26(9-10): 569-577.

MASSON-MEYERS, D. S. AND L. TAYEBI (2021). "Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair." *J Tissue Eng Regen Med* 15(9): 747-762.

MILLS, S. E. (2012). *Histology for pathologists* / editor: Stacey E. Mills. Philadelphia, Pa., Lippincott Williams & Wilkins.

MINTEER, D., K. G. MARRA AND J. P. RUBIN (2013). "Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 129: 59-71.

MORIYAMA, T., I. ASAHINA, M. ISHII, M. ODA, Y. ISHII AND S. ENOMOTO (2001). "Development of composite cultured oral mucosa utilizing collagen sponge matrix and contracted collagen gel: a preliminary study for clinical applications." *Tissue Eng* 7(4): 415-427.

MORRISON, S. J. AND D. T. SCADDEN (2014). "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells." *Nature* 505(7483): 327-334.

MOSESSON, M. W. (2005). "Fibrinogen and fibrin structure and functions." *J Thromb Haemost* 3(8): 1894-1904.

NAJI, A., F. DESCHASEAUX, E. RACADOT, C. FERRAND, E. JUSTRABO, F. GUIGNIER, C. MOUSSON AND G. RIFLE (2005). "Induction of tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by cell-specific HLA class I antibody: preliminary data." *Transplant Proc* 37(6): 2892-2893.

NAKAMURA, T., K. ENDO, L. J. COOPER, N. J. FULLWOOD, N. TANIFUJI, M. TSUZUKI, N. KOIZUMI, T. INATOMI, Y. SANO AND S. KINOSHITA (2003). "The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1): 106-116.

NIETO-AGUILAR, R., D. SERRATO, I. GARZON, A. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2011). "Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold." *J Biomater Appl* 25(7): 743-768.

NIKODIJEVIC, S., V. BLAGOJEVIC, I. CURUVIJA, D. KOSANOVIC, T. DJUKIC, B. DJORDJEVIC, V. ILIC AND R. MINIC (2022). "Selectivity of polyclonal repertoire of anti-microbial IgA and its subclasses in saliva and serum in humans." *Scand J Immunol* 96(6): e13223.

NISHIYAMA, K., T. AKAGI, S. IWAI AND M. AKASHI (2019). "Construction of Vascularized Oral Mucosa Equivalents Using a Layer-by-Layer Cell Coating Technology." *Tissue Eng Part C Methods* 25(5): 262-275.

NOORI, A., S. J. ASHRAFI, R. VAEZ-GHAEMI, A. HATAMIAN-ZAREMI AND T. J. WEBSTER (2017). "A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering." *Int J Nanomedicine* 12: 4937-4961.

ORZECZOWSKA-WYLEGALA, B., D. DOBROWOLSKI, D. PUZZOLO, B. WOWRA, W. NIEMIEC, A. WYLEGALA AND K. SZCZUBIALKA (2017). "Use of autologous epithelium transplantation on various scaffolds to cover tissue loss in oral cavity: long-term observation." *J Appl Biomater Funct Mater* 15(1): e25-e30.

PAWLINA, W. AND M. H. ROSS (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, Lippincott Williams & Wilkins.

PEREZ-AMODIO, S., W. M. TRA, H. A. RAKHORST, S. E. HOVIUS AND J. W. VAN NECK (2011). "Hypoxia preconditioning of tissue-engineered mucosa enhances its angiogenic capacity in vitro." *Tissue Eng Part A* 17(11-12): 1583-1593.

PINHO, S. AND P. S. FRENETTE (2019). "Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche." *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(5): 303-320.

PONCELET, C., P. MADELENAT, G. FELDMANN, F. WALKER AND E. DARAI (2002). "Expression of von Willebrand's factor, CD34, CD31, and vascular endothelial growth factor in uterine leiomyomas." *Fertil Steril* 78(3): 581-586.

PONTIKOGLOU, C., F. DESCHASEAUX, L. SENSEBE AND H. A. PAPADAKI (2011). "Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation." *Stem Cell Rev Rep* 7(3): 569-589.

PUSZTASZERI, M. P., W. SEELENTAG AND F. T. BOSMAN (2006). "Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues." *J Histochem Cytochem* 54(4): 385-395.

RAKOCEVIC, J., D. ORLIC, O. MITROVIC-AJTIC, M. TOMASEVIC, M. DOBRIC, N. ZLATIC, D. MILASINOVIC, G. STANKOVIC, M. OSTOJIC AND M. LABUDOVIC-BOROVIC (2017). "Endothelial cell markers from clinician's perspective." *Exp Mol Pathol* 102(2): 303-313.

RAMAI, D., J. LAI, C. MONZIDELIS AND S. REDDY (2018). "Coronary Artery Development: Origin, Malformations, and Translational Vascular Reparative Therapy." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 23(4): 292-300.

RODRIGUEZ-MORATA, A., I. GARZON, M. ALAMINOS, N. GARCIA-HONDUVILLA, M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, J. BUJAN AND A. CAMPOS (2008). "Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells." *Ann Vasc Surg* 22(3): 440-448.

ROJAS-MURILLO, J. A., M. A. SIMENTAL-MENDIA, N. K. MONCADA-SAUCEDO, P. DELGADO-GONZALEZ, J. F. ISLAS, J. A. ROACHO-PEREZ AND E. N. GARZA-TREVINO (2022). "Physical, Mechanical, and Biological Properties of Fibrin Scaffolds for Cartilage Repair." *Int J Mol Sci* 23(17).

ROUABHIA, M. AND N. DESLAURIERS (2002). "Production and characterization of an in vitro engineered human oral mucosa." *Biochem Cell Biol* 80(2): 189-195.

ROUWKEMA, J. AND A. KHADEMHOSEINI (2016). "Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks." *Trends Biotechnol* 34(9): 733-745.

SACCHI, V., R. MITTERMAYR, J. HARTINGER, M. M. MARTINO, K. M. LORENTZ, S. WOLBANK, A. HOFMANN, R. A. LARGO, J. S. MARSCHALL, E. GROPPA, R. GIANNI-BARRERA, M. EHRBAR, J. A. HUBBELL, H. REDL AND A. BANFI (2014). "Long-lasting fibrin matrices ensure stable and functional angiogenesis by highly tunable, sustained delivery of recombinant VEGF164." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(19): 6952-6957.

SALATI, M. A., J. KHAZAI, A. M. TAHMURI, A. SAMADI, A. TAGHIZADEH, M. TAGHIZADEH, P. ZARRINTAJ, J. D. RAMSEY, S. HABIBZADEH, F. SEIDI, M. R. SAEB AND M. MOZAFARI (2020). "Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering." *Polymers (Basel)* 12(5).

SAMROT, A. V., M. SATHIYASREE, S. B. A. RAHIM, R. E. RENITTA, K. KASIPANDIAN, S. KRITHIKA SHREE, D. RAJALAKSHMI, N. SHOBANA, S. DHIVA, S. ABIRAMI, S. VISVANATHAN, B. K. MOHANTY, G. S. SABESAN AND S. V. CHINNI (2023). "Scaffold Using Chitosan, Agarose, Cellulose, Dextran and Protein for Tissue Engineering-A Review." *Polymers (Basel)* 15(6).

SANCHEZ-PORRAS, D., M. CARO-MAGDALENO, C. GONZALEZ-GALLARDO, O. D. GARCIA-GARCIA, I. GARZON, V. CARRIEL, F. CAMPOS AND M. ALAMINOS (2021). "Generation of a Biomimetic Substitute of the Corneal Limbus Using Decellularized Scaffolds." *Pharmaceutics* 13(10).

SANCHEZ-QUEVEDO, M. C., M. ALAMINOS, L. M. CAPITAN, G. MOREU, I. GARZON, P. V. CRESPO AND A. CAMPOS (2007). "Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering." *Histol Histopathol* 22(6): 631-640.

SANTISTEBAN-ESPEJO, A., M. A. MARTIN-PIEDRA, A. CAMPOS, J. MORAN-SANCHEZ, M. J. COBO, A. I. PACHECO-SERRANO AND J. A. MORAL-MUNOZ (2021). "Information and Scientific Impact of Advanced Therapies in the Age of Mass Media: Altmetrics-Based Analysis of Tissue Engineering." *J Med Internet Res* 23(11): e25394.

SARKER, M., X. B. CHEN AND D. J. SCHREYER (2015). "Experimental approaches to vascularisation within tissue engineering constructs." *J Biomater Sci Polym Ed* 26(12): 683-734.

SARUGASER, R., D. LICKORISH, D. BAKSH, M. M. HOSEINI AND J. E. DAVIES (2005). "Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors." *Stem Cells* 23(2): 220-229.

SAWADA, A., N. WAKABAYASHI, M. ONA AND T. SUZUKI (2011). "Viscoelasticity of human oral mucosa: implications for masticatory biomechanics." *J Dent Res* 90(5): 590-595.

SCIONTI, G., M. MORAL, M. TOLEDANO, R. OSORIO, J. D. DURAN, M. ALAMINOS, A. CAMPOS AND M. T. LOPEZ-LOPEZ (2014). "Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model." *J Biomed Mater Res A* 102(8): 2573-2582.

SELIM, M., A. J. BULLOCK, K. A. BLACKWOOD, C. R. CHAPPLE AND S. MACNEIL (2011). "Developing biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra." *BJU Int* 107(2): 296-302.

SEO, B. M., M. MIURA, S. GRONTHOS, P. M. BARTOLD, S. BATOULI, J. BRAHIM, M. YOUNG, P. G. ROBEY, C. Y. WANG AND S. SHI (2004). "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament." *Lancet* 364(9429): 149-155.

SEVARI, S. P., F. SHAHNAZI, C. CHEN, J. C. MITCHELL, S. ANSARI AND A. MOSHAVERINIA (2020). "Bioactive glass-containing hydrogel delivery system for osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells." *J Biomed Mater Res A* 108(3): 557-564.

SHAO, Z., C. LYU, L. TENG, X. XIE, J. SUN, D. ZOU AND J. LU (2021). "An Injectable Fibrin Scaffold Rich in Growth Factors for Skin Repair." *Biomed Res Int* 2021: 8094932.

SHEN, Y. Q., A. GUERRA-LIBRERO, B. I. FERNANDEZ-GIL, J. FLORIDO, S. GARCIA-LOPEZ, L. MARTINEZ-RUIZ, M. MENDIVIL-PEREZ, V. SOTO-MERCADO, D. ACUNA-CASTROVIEJO, H. ORTEGA-ARELLANO, V. CARRIEL, M. E. DIAZ-CASADO, R. J. REITER, I. RUSANOVA, A. NIETO, L. C. LOPEZ AND G. ESCAMES (2018). "Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation." *J Pineal Res* 64(3).

SHIRURE, V. S. AND S. C. GEORGE (2017). "Design considerations to minimize the impact of drug absorption in polymer-based organ-on-a-chip platforms." *Lab Chip* 17(4): 681-690.

SIPE, J. D. (2002). "Tissue engineering and reparative medicine." *Ann N Y Acad Sci* 961: 1-9.

SMIRANI, R., M. REMY, R. DEVILLARD AND A. NAVEAU (2020). "Engineered Prevascularization for Oral Tissue Grafting: A Systematic Review." *Tissue Eng Part B Rev* 26(4): 383-398.

STEFANSKA, K., K. OZEGOWSKA, G. HUTCHINGS, M. POPIS, L. MONCRIEFF, C. DOMPE, K. JANOWICZ, W. PIENKOWSKI, P. GUTAJ, J. A. SHIBLI, W. M. PRADO, H. PIOTROWSKA-KEMPISTY, P. MOZDZIAK, M. BRUSKA, M. ZABEL, B. KEMPISTY AND M. NOWICKI (2020). "Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials." *J Clin Med* 9(4).

STOCUM, D. L. (2004). "Tissue restoration through regenerative biology and medicine." *Adv Anat Embryol Cell Biol* 176: III-VIII, 1-101, back cover.

STOCUM, D. L. (2012). *Regenerative Biology and Medicine*, Elsevier Science.

SUN, D. Z., B. ABELSON, P. BABBAR AND M. S. DAMASER (2019). "Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for regenerative urology." *Nat Rev Urol* 16(6): 363-375.

SUN, Y., X. MA AND H. HU (2021). "Marine Polysaccharides as a Versatile Biomass for the Construction of Nano Drug Delivery Systems." *Mar Drugs* 19(6).

SURANI, M. A. (2001). "Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance." *Nature* 414(6859): 122-128.

SURESH, V. AND J. L. WEST (2020). "3D Culture Facilitates VEGF-Stimulated Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells." *Ann Biomed Eng* 48(3): 1034-1044.

TAKEBE, T., M. ENOMURA, E. YOSHIZAWA, M. KIMURA, H. KOIKE, Y. UENO, T. MATSUZAKI, T. YAMAZAKI, T. TOYOHARA, K. OSAFUNE, H. NAKAUCHI, H. Y. YOSHIKAWA AND H. TANIGUCHI (2015). "Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation." *Cell Stem Cell* 16(5): 556-565.

TAYBOS, G. (2003). "Oral changes associated with tobacco use." *Am J Med Sci* 326(4): 179-182.

TSONIS, P. A. (2002). "Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration." *Differentiation* 70(8): 397-409.

TURKSEN, K. (2018). *Cell biology and translational medicine*. Cham, Switzerland, Springer.

V, K. A., A. UDDUTTULA AND A. K. JAISWAL (2022). "Unveiling the secrets of marine-derived fucoidan for bone tissue engineering-A review." *Front Bioeng Biotechnol* 10: 1100164.

VACANTI, C. A. (2006). "The history of tissue engineering." *J Cell Mol Med* 10(3): 569-576.

VACANTI, J. (2010). "Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art." *J Pediatr Surg* 45(2): 291-294.

VERMEULEN, P. B., G. GASPARINI, S. B. FOX, M. TOI, L. MARTIN, P. MCCULLOCH, F. PEZZELLA, G. VIALE, N. WEIDNER, A. L. HARRIS AND L. Y. DIRIX (1996). "Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation." *Eur J Cancer* 32A(14): 2474-2484.

VIJAYAVENKATARAMAN, S., N. VIALLI, J. Y. H. FUH AND W. F. LU (2019). "Conductive collagen/polypyrrole-b-polycaprolactone hydrogel for bioprinting of neural tissue constructs." *Int J Bioprint* 5(2.1): 229.

VINUELA-PRieto, J. M., M. C. SANCHEZ-QUEVEDO, C. A. ALFONSO-RODRIGUEZ, A. C. OLIVEIRA, G. SCIONTI, M. A. MARTIN-PIEDRA, G. MOREU, A. CAMPOS, M. ALAMINOS AND I. GARZON (2015). "Sequential keratinocytic differentiation and maturation in

a three-dimensional model of human artificial oral mucosa." *J Periodontal Res* 50(5): 658-665.

WAGERS, A. J. (2012). "The stem cell niche in regenerative medicine." *Cell Stem Cell* 10(4): 362-369.

WANG, C. Q., Y. W. HUANG, S. W. WANG, Y. L. HUANG, C. H. TSAI, Y. M. ZHAO, B. F. HUANG, G. H. XU, Y. C. FONG AND C. H. TANG (2017). "Amphiregulin enhances VEGF-A production in human chondrosarcoma cells and promotes angiogenesis by inhibiting miR-206 via FAK/c-Src/PKCdelta pathway." *Cancer Lett* 385: 261-270.

WANG, M., Q. YUAN AND L. XIE (2018). "Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application." *Stem Cells Int* 2018: 3057624.

WANG, S. S., Y. L. TANG, X. PANG, M. ZHENG, Y. J. TANG AND X. H. LIANG (2019). "The maintenance of an oral epithelial barrier." *Life Sci* 227: 129-136.

WILLIAMS, D. F. (2008). "On the mechanisms of biocompatibility." *Biomaterials* 29(20): 2941-2953.

WILLIAMS, D. F. (2019). "Specifications for Innovative, Enabling Biomaterials Based on the Principles of Biocompatibility Mechanisms." *Front Bioeng Biotechnol* 7: 255.

WILSON, A. AND A. TRUMPP (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." *Nat Rev Immunol* 6(2): 93-106.

WOLFF, J., E. FARRE-GUASCH, G. K. SANDOR, S. GIBBS, D. J. JAGER AND T. FOROUZANFAR (2016). "Soft Tissue Augmentation Techniques and Materials Used in the Oral Cavity: An Overview." *Implant Dent* 25(3): 427-434.

WOOD, F. M., M. L. KOLYBABA AND P. ALLEN (2006). "The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: eleven years of clinical experience." *Burns* 32(5): 538-544.

WU, V., M. N. HELDER, N. BRAVENBOER, C. M. TEN BRUGGENKATE, J. JIN, J. KLEIN-NULEND AND E. SCHULTEN (2019). "Bone Tissue Regeneration in the Oral and Maxillofacial Region: A Review on the Application of Stem Cells and New Strategies to Improve Vascularization." *Stem Cells Int* 2019: 6279721.

XIONG, X., Y. SUN AND X. WANG (2020). "HIF1A/miR-20a-5p/TGFbeta1 axis modulates adipose-derived stem cells in a paracrine manner to affect the angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells." *J Cell Physiol* 235(3): 2091-2101.

XU, M., J. LI, X. LIU, S. LONG, Y. SHEN, Q. LI, L. REN AND D. MA (2019). "Fabrication of vascularized and scaffold-free bone tissue using endothelial and osteogenic cells differentiated from bone marrow derived mesenchymal stem cells." *Tissue Cell* 61: 21-29.

YAMANAKA, S. (2020). "Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges." *Cell Stem Cell* 27(4): 523-531.

YAN, D., X. WANG, D. LI, Z. QU AND Q. RUAN (2011). "Macrophages overexpressing VEGF, transdifferentiate into endothelial-like cells in vitro and in vivo." *Biotechnol Lett* 33(9): 1751-1758.

YANG, Y., A. CAMPBELL RITCHIE AND N. M. EVERITT (2021). "Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 121: 111846.

YOSHIZAWA, M., T. KOYAMA, T. KOJIMA, H. KATO, Y. ONO AND C. SAITO (2012). "Keratinocytes of tissue-engineered human oral mucosa promote re-epithelialization after intraoral grafting in athymic mice." *J Oral Maxillofac Surg* 70(5): 1199-1214.

ZHANG, W., I. P. AHLUWALIA AND P. C. YELICK (2010). "Three dimensional dental epithelial-mesenchymal constructs of predetermined size and shape for tooth regeneration." *Biomaterials* 31(31): 7995-8003.

ZHANG, X., J. L. CHEN, F. XING AND X. DUAN (2022). "Three-dimensional printed polylactic acid and hydroxyapatite composite scaffold with urine-derived stem cells as a treatment for bone defects." *J Mater Sci Mater Med* 33(10): 71.

ZHAO, Y., X. SHEN, R. MA, Y. HOU, Y. QIAN AND C. FAN (2021). "Biological and biocompatible characteristics of fullerene nanomaterials for tissue engineering." *Histol Histopathol* 36(7): 725-731.

ZUK, P. A., M. ZHU, H. MIZUNO, J. HUANG, J. W. FUTRELL, A. J. KATZ, P. BENHAIM, H. P. LORENZ AND M. H. HEDRICK (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng* 7(2): 211-228.



