

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA EN PACIENTES TRATADOS
CON SUSTITUTOS CUTÁNEOS QUE INCORPORAN
CÉLULAS HUMANAS, COMO MEDICAMENTOS DE
INGENIERÍA TISULAR, EN UNA MATRIZ DE FIBRINA-
AGAROSA NANOESTRUCTURADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



Tesis doctoral de:

Gloria Carmona Sánchez

Realizado bajo la dirección de:

Dr. Miguel Alaminos Mingorance

Dra. Natividad Cuende Melero

2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gloria Carmona Sánchez
ISBN: 978-84-1195-145-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/89457>

Esta **Tesis Doctoral** ha sido realizada en la Red Andaluza de diseño y traslación de Terapias Avanzadas de la Fundación Progreso y Salud M.P., así como en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y ha estado financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- Transversal tissue engineering and nanomedicine approach towards an improved chronic wound therapy (AC17/00013, NanoGSkin). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Ciencia e Innovación y por la Unión Europea, programa EuroNanoMed.
- Generación de nuevos modelos de piel medicalizada a partir de la piel artificial de fibrina-agarosa ensayada clínicamente en grandes quemados. Funcionalización con fármacos y nuevos procesos de biofabricación (PE-0395-2019). Consejería de Salud y Consumo, Junta de Andalucía (Proyectos Estratégicos I+D+i con Incorporación de Capital Humano).
- Generación de nuevos modelos de piel artificial humana funcionalizada con propiedades físicas biomiméticas de la piel humana nativa (B-CTS-450-UGR20). Universidad de Granada y Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades (proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020).
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), programa "Una manera de hacer Europa".

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

Histological assessment of nanostructured fibrin-agarose skin substitutes grafted in burnt patients. A time-course study. Martin-Piedra MA, Carmona G, Campos F, Carriel V, Fernández-González A, Campos A, Cuende N, Garzon I, Gacto P, Alaminos M. Bioeng Transl Med. 2023; e10572. doi:10.1002/btm2.10572. Factor de Impacto: 7.400; Percentil: 8 (primer decil).

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de la Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla que me habéis acompañado en múltiples ocasiones a la Unidad de Quemados y que tanto apoyo me habéis dado para que esta tesis sea hoy una realidad. Gracias equipo.

A los compañeros de la Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por hacer posible con vuestra labor el tratamiento de estos pacientes que tienen una situación tan compleja alrededor.

A Puri Gacto porque tu trabajo diario y el del resto de compañeros de la Unidad de Quemados es lo que hace posible que estos pacientes puedan mejorar su compleja situación. Sois grandes profesionales al frente de una situación verdaderamente compleja. Gracias por vuestra labor diaria.

A Marta Reboredo por ayudarme en la última etapa a avanzar y no decaer en conseguir que la tesis sea una realidad. Gracias de verdad.

A mis directores, Nati Cuende y Miguel Alaminos por su dirección y tutorización de la tesis hasta el último momento y de quien tanto he aprendido.

Al Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, por su ayuda en el desarrollo de los análisis histológicos.

A mi familia y en especial a mis Padres. Por haberme inculcado el valor del trabajo y el esfuerzo diario. Valores que me han llevado hasta aquí. Sois mi referente y un ejemplo de fortaleza.

A José Luis, mi compañero de camino, por ser como eres y por tu apoyo ahora y siempre en mi desarrollo profesional. Gracias por estar siempre ahí y por ser mi otra mitad cada día. Y como no a nuestros hijos, Christian y Adam, que han venido a complementar nuestra vida como nunca hubiésemos imaginado.

Por último, y no menos importante, agradecer también a los pacientes, ya que sin ellos no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

INDICE

ACRÓNIMOS.....	8
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	52
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIONES.....	118
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

ACRÓNIMOS

- AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
- DMEM: siglas del inglés "*Dulbecco's modified Eagle medium*", medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
- EGF: siglas del inglés "*epidermal growth factor*", factor de crecimiento epidérmico
- GMP: siglas en inglés de "*good manufacturing practices*", normas de correcta fabricación
- RAdytTA: Red Andaluza de diseño y traslación de Terapias Avanzadas
- SBF: suero bovino fetal
- UE: Unión Europea
- UGRSKIN: modelo basado en biomateriales de fibrina-agarosa previamente generado en la Universidad de Granada y posteriormente transferido como medicamento de terapias avanzadas para su uso clínico
- U.I.: unidades de intensidad
- UPCIT HUVN Granada: Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

RESUMEN

Hasta el momento, se han descrito diferentes modelos de piel artificial humana generada mediante ingeniería tisular. Uno de estos modelos, el denominado UGRSKIN, está basado en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurada, y contiene un sustituto dérmico con fibroblastos y un epitelio con queratinocitos de la propia piel. Aunque el modelo UGRSKIN demostró utilidad clínica potencial en pacientes afectos de graves quemaduras, las modificaciones histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas que ocurren tras su implante clínico, aún no han podido caracterizarse.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo un completo estudio histológico que incluye análisis estructurales, ultraestructurales e histofuncionales para caracterizar la piel artificial generada en laboratorio y mantenida en cultivo *ex vivo* y la piel implantada en pacientes durante 30, 60 y 90 días de evolución *in vivo*, comparándola con piel humana nativa utilizada como control.

Los resultados muestran que la piel artificial mantenida en cultivo presenta escasos niveles de diferenciación. Una vez injertada en pacientes, la piel artificial muestra signos de biointegración desde el día 30, mostrando un epitelio proliferativo con abundantes signos de maduración y diferenciación, que expresa diferentes citoqueratinas, proteínas de unión intercelular, filagrina e involucrina. Asimismo, presenta algunos melanocitos y células de Langerhans, aunque en niveles inferiores a la piel control. Respecto a la unión dermo-epidérmica, la piel artificial carece de las crestas y papilas que confieren una morfología festoneada a la piel control, y muestra una membrana basal bien formada desde el día 30 de evolución. En cuanto a la dermis, los resultados confirman la adecuada biointegración de la piel artificial, aunque, en este caso, existe una interfase entre la dermis superficial y la dermis profunda que es claramente evidenciable en el día 30. Los estudios evolutivos demuestran la progresiva síntesis de fibras de colágeno, que se organizan progresivamente en los días 60 y 90, colágeno V, fibras elásticas, proteoglicanos y decorina, alcanzando los niveles del control al día 60 ó 90, sugiriendo que la maduración de la dermis podría requerir periodos más largos de tiempo que la epidermis. Estos resultados se confirmaron con estudios clasificatorios de tipo *cluster* que revelan la similitud de las muestras *ex vivo* con la piel injertada durante 30 días y

de la piel nativa control con la piel injertada durante 60 y 90 días de evolución *in vivo*. Por otro lado, se confirmó la presencia de numerosos vasos sanguíneos de pequeño calibre y de vasos sanguíneos con pared muscular, así como de vasos linfáticos, desde el día 30 de evolución.

Estos resultados contribuyen a determinar los parámetros histológicos que se asocian al efecto terapéutico positivo y a la biocompatibilidad del modelo de piel artificial UGRSKIN injertado en pacientes grandes quemados y demuestran que la piel artificial es capaz de madurar y diferenciarse rápidamente, una vez implantada en pacientes.

INTRODUCCIÓN

1. La piel humana

La piel humana constituye el órgano de mayor extensión del cuerpo, y su peso aproximado supone un 15% del peso total de un ser humano adulto (Leider M, 1949; Vig et al., 2017). Su función principal es proporcionar protección y actuar como barrera frente a agentes externos físicos, químicos y biológicos y ejerce un papel esencial en la termorregulación del organismo (Vig et al., 2017).

Histológicamente, la piel se compone de tres capas principales (Kanitakis, 2002; Vig et al., 2017), que se muestran en la Figura 1:

- La epidermis, que constituye la capa más externa de la piel. Debido a la presencia de un gran número de uniones intercelulares, la epidermis es la encargada principal de formar la barrera protectora de la piel, protegiendo al organismo frente a agentes externos físicos, químicos y biológicos, y evitando la pérdida de agua y electrolitos (Ross y Pawlina, 2007; Welsch, 2008). La epidermis está constituida, fundamentalmente, por células denominadas queratinocitos, aunque también existen, en menor cantidad, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y otros tipos celulares (Gómez de Ferraris y Campos, 2019).

Las células de la epidermis se organizan en los siguientes estratos (Urmacher, 1990) (Figura 2):

- Estrato basal, que contiene las células madre progenitoras del epitelio de la piel que presentan capacidad proliferativa y, mediante división asimétrica, dan lugar a los queratinocitos de los demás estratos.
- Estrato espinoso, que está constituido por numerosas capas de queratinocitos unidos por abundantes uniones intercelulares que forman espinas entre las distintas células.
- Estrato granuloso, en el que los queratinocitos muestran abundantes signos de diferenciación y presentan acúmulos de proteínas que forman gránulos de queratohialina.

- Estrato córneo, constituido por células que han perdido el núcleo celular y muestran morfología elongada, en forma de escama, y que tienden a descamarse en la superficie de la epidermis.

La epidermis está separada de la siguiente capa, la dermis, por una delgada estructura denominada membrana basal. Esta membrana basal está constituida por una estructura electrodensa (la lámina densa), una estructura electrolúcida (la lámina lúcida) y una región fibrilar que contiene abundantes fibras de anclaje (la lámina reticular) (Yurchenco y O'Rear, 1994; Aumailley, 1995). Su función es fundamental para mantener la epidermis firmemente anclada a los tejidos subyacentes, y sus alteraciones se asocian a graves patologías en las que la epidermis tiende a desprenderse (Kowalewski et al., 2005; Woźniak y Kowalewski, 2005).

- La dermis, que presenta mayor espesor que la epidermis y se encuentra separada de la epidermis por la membrana basal, formando entrantes y salientes de morfología festoneada denominados crestas y papilas, cuya función es aumentar la superficie de anclaje entre dermis y epidermis (Xiong et al., 2013; Shen et al., 2023). La dermis está formada por tejido conectivo que posee una densa matriz extracelular, en la que se disponen abundantes células, especialmente, fibroblastos. Contiene abundantes vasos sanguíneos y linfáticos, y en ella encontramos algunos anexos de la piel como los folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas (Ross y Pawlina, 2007). La presencia de gruesos haces de colágeno maduro, sintetizado por los fibroblastos, confiere resistencia mecánica a la dermis, mientras que las fibras elásticas son las encargadas fundamentales de la elasticidad y resiliencia de la dermis humana (Daly, 1982).
- La hipodermis o tejido celular subcutáneo, que se compone, fundamentalmente, de tejido adiposo. Aporta a la piel aislamiento térmico y funciona como mecanismo de amortiguación de fuerzas mecánicas que pudieran afectar a la piel. Asimismo, juega un papel fundamental como almacén de energía (Ross and Pawlina, 2007).

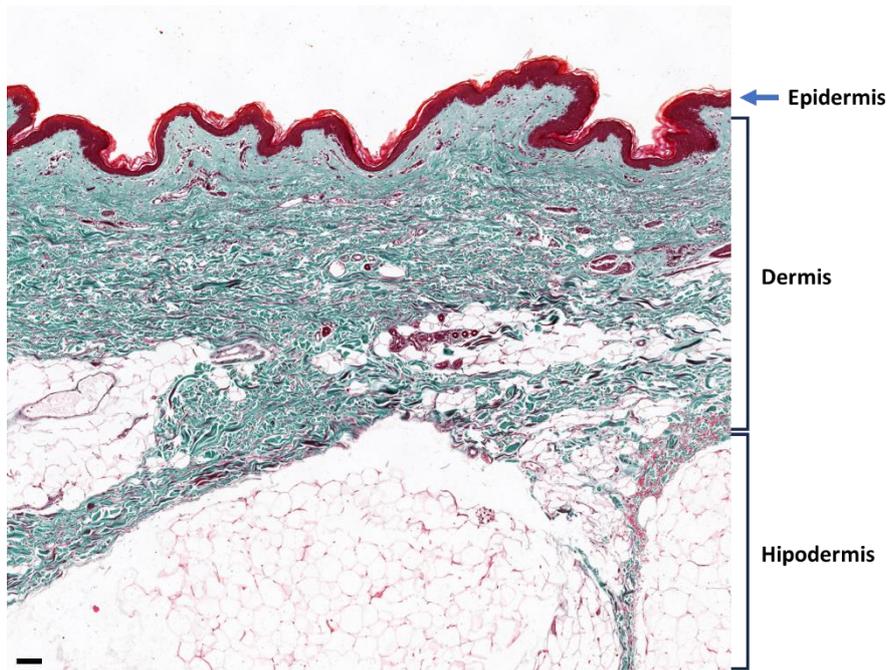


Figura 1. Imagen histológica de la piel humana normal, en la que se muestra la epidermis, la dermis y la hipodermis, así como la morfología festoneada de la unión dermo-epidérmica. Tinción tricrómica de Masson. Escala: 100 μ m.

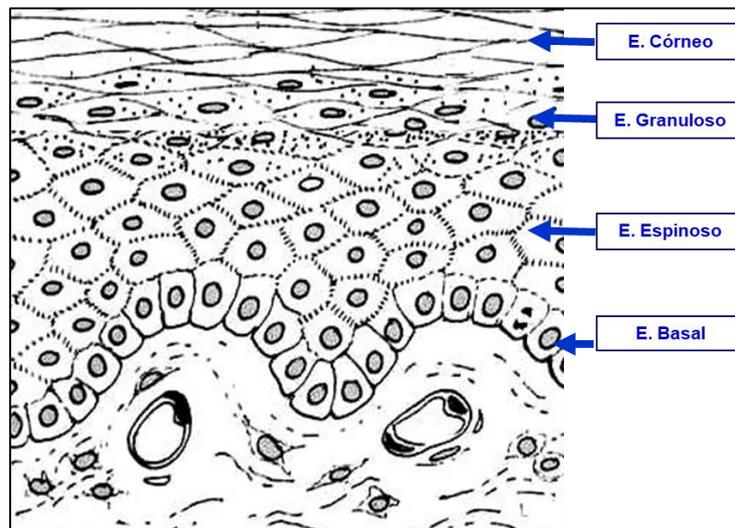


Figura 2. Estructura histológica de los distintos estratos de la epidermis humana. Modificado de Gómez de Ferraris y Campos (Gómez de Ferraris y Campos, 2019).

2. Las quemaduras de la piel y su tratamiento

Las quemaduras profundas suponen un prevalente problema de salud pública de gran importancia por la frecuente necesidad de asistencia médica especializada (Rowan et al., 2015). De hecho, las quemaduras graves constituyen, junto a los accidentes de tráfico, las caídas y la violencia física, una de las principales emergencias sanitarias en los servicios de urgencia a nivel mundial (Greenhalgh, 2019).

La etiología de las quemaduras es muy variada, e incluye diversos agentes tales como calor, electricidad, sustancias químicas o radiación (Hettiaratchy y Dziewulski, 2004). La quemadura se considera de mayor o menor gravedad en función de la extensión de la misma y la profundidad de la lesión, pero también del lugar en el que ésta se localiza, de la edad del paciente y de cualquier otra enfermedad sistémica subyacente que se pueda presentar (Burgess et al., 2022).

En función de su profundidad, las quemaduras se pueden clasificar en cuatro grados (Palmieri y Greenhalgh, 2002; Markiewicz-Gospodarek et al., 2022; Warby y Maani, 2023) (Figuras 3, 4 y 5). Las quemaduras de grado I se consideran como superficiales y autolimitadas, y únicamente provocan un enrojecimiento y eritema local. Las de grado II son quemaduras superficiales, pero generan la aparición de ampollas, pudiendo ser de II grado superficial o profundo. Las quemaduras de grado III son graves y profundas, y generan la destrucción de la dermis y la epidermis. Finalmente, las quemaduras de grado IV afectan no sólo a la piel, sino, además, al músculo, el hueso y a otros tejidos profundos, generando, en muchos casos, un estado de calcinación.

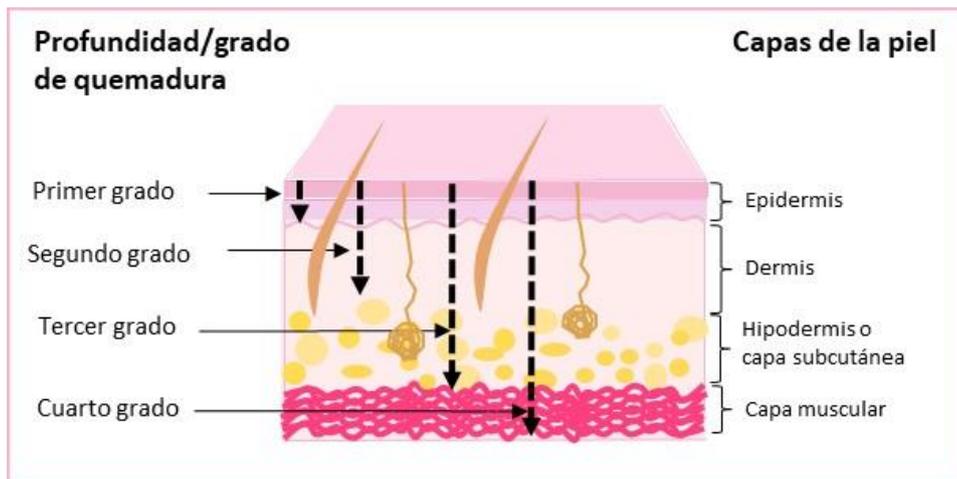


Figura 3. Clasificación de las quemaduras de la piel en función de la profundidad afectada por la misma. Modificado de Markiewicz-Gospodarek y cols. (Markiewicz-Gospodarek et al., 2022).



Figura 4. Ejemplos de quemaduras cutáneas de varios grados de profundidad. Modificado de Rangel-Olvera y cols. (Rangel-Olvera y Rosas-Romero, 2021).

CLASIFICACIÓN DE LAS QUEMADURAS		
GRADO I O QUEMADURAS SUPERFICIALES	GRADO II O QUEMADURA SUPERFICIAL DE ESPESOR PARCIAL - Epidermis y capas superficiales de la dermis dañadas	
<ul style="list-style-type: none"> - Eritemas en la epidermis que conllevan enrojecimiento, leve dolor e hinchazón que remite de 48 a 72h - Tras 5-10 días la epidermis dañada se desprende - No se se observa cicatriz visible tras este tipo de quemadura 	<p>Tipo II A. Quemadura de segundo grado superficial.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Epidermis y capas superficiales de la dermis degradadas - Dolor y ampollas debido a la delaminación de la membrana basal de la epidermis. - La herida cicatriza tras 14 a 21 días y no suele dejar cicatriz 	<p>Tipo II B. Quemadura de segundo grado profundo.</p> <ul style="list-style-type: none"> - tanto la dermis como la epidermis se degradan a diferentes profundidades - No incluye parte de los islotes de la epidermis de las glándulas sudoríparas ni de los folículos pilosos. - Piel enrojecida, húmeda y dolorosa - Cicatrices que pueden quedar presentes y que tardan entre 21 y 35 días - Se terminan formando ampollas que se encuentran llenas de líquido y que de forma general se terminan rompiendo - Se hace necesario escisión quirúrgica de la zona quemada y trasplante de piel
GRADO III. Quemaduras profundas de espesor total (subdérmicas superficiales)		GRADO IV. Espesor completo, incluidos los tejidos más profundos (subdérmicas profundas)
<ul style="list-style-type: none"> - Espesor completo degradado - La piel está seca y dura - La coloración de la piel es marrón, bronce o rojo - Presenta ausencia de dolor - Requiere tratamiento quirúrgico, trasplante o tratamiento reconstructivo 		<ul style="list-style-type: none"> - Quemadura mixta - Combina las características de quemaduras de segundo y tercer grado - Han penetrado desde la epidermis hasta el tejido subcutáneo y en algunos casos pueden haberse visto afectado el músculo o los huesos dando lugar a necrosis local - Se suelen tratar de forma conservadora y quirúrgica.

Figura 5. Características clínicas de los diferentes grados de quemaduras de la piel humana. Modificado de Markiewicz-Gospodarek y cols. (Markiewicz-Gospodarek et al., 2022).

Cuando son suficientemente extensas, las quemaduras profundas de la piel generan una destrucción tisular masiva, que se asocia a dramáticos efectos fisiopatológicos en el paciente quemado. Junto al problema local, generado por la destrucción de las células madre queratinocíticas (Amini-Nik et al., 2018), la quemadura genera una respuesta inflamatoria grave y alargada en el tiempo que puede provocar importantes consecuencias sistémicas en el paciente, tales como daños a nivel cardiaco, pulmonar, renal y vascular (Burgess et al., 2022). En estos casos, el tratamiento convencional no suele ser suficiente, debido al estado crítico en el que se encuentra el paciente, siendo necesario tratar al paciente de forma integral en una unidad específica para quemados, denominada Unidad de Quemados Críticos. Según queda descrito en los Criterios acordados por el Consejo Interterritorial (<https://www.sanidad.gob.es/profesionales/CentrosDeReferencia/docs/Fesp/Fesp1.pdf>), las unidades de quemados críticos se corresponden con unidades de alta especialización que se encuentran integradas en un centro hospitalario y que se están

dotadas de recursos tanto humanos como materiales para la atención sanitaria de los pacientes. Son criterios de ingreso en una Unidad de Quemados Críticos:

- ✓ Quemaduras de segundo o tercer grado > 20% de superficie total quemada a cualquier edad.
- ✓ Quemaduras de segundo o tercer grado > 10% de superficie total quemada en menores de 10 años y mayores de 50.
- ✓ Quemaduras químicas y eléctricas.
- ✓ Quemaduras en zonas críticas.
- ✓ Quemaduras con lesiones asociadas (inhalación de humos, traumatismos, etc.).
- ✓ Quemaduras con riesgos asociados (antecedentes clínicos del paciente como diabetes, inmunodepresión, etc.).

Se entiende como paciente gran quemado, aquél que presenta lesiones debidas a daño térmico que justifican, al menos, tres días de tratamiento de cuidados intensivos. En el año 2000, Gueugniaud y colaboradores describieron los criterios actualmente utilizados para clasificar al paciente gran quemado (Gueugniaud et al., 2000).

El tratamiento del gran quemado es muy complejo y supone un gran reto terapéutico (Palmieri y Greenhalgh, 2002; Greenhalgh, 2019; Markiewicz-Gospodarek et al., 2022). En general, es fundamental mantener la homeostasis del paciente, evitando la pérdida de líquidos y electrolitos, así como la entrada de bacterias patógenas y otros microorganismos que pudiesen poner en riesgo la vida del paciente. El tratamiento debe ser multidisciplinar y debe enfocarse hacia lograr un pronto restablecimiento de la barrera protectora de la piel, controlando la pérdida de sangre, la inflamación y otros factores que pudiesen concurrir en el paciente (Fabia y Groner, 2009; Greenhalgh, 2019). Además, las quemaduras profundas pueden desembocar en la generación de diferentes patologías cutáneas, como las cicatrices hipertróficas o los queloides. Por ello, resulta de interés desarrollar nuevos productos que puedan así evitar la cicatrización fibróticas de las heridas cutáneas (Karppinen et al., 2019).

. En general, los pacientes ingresados en las unidades de quemados son tratados mediante técnicas de escarectomía y desbridamiento, cuyo objetivo es eliminar todo el tejido necrótico, seguidas de la cobertura de la zona cruenta con injertos de piel de espesor total o de espesor parcial tomadas del propio paciente (Coruh y Yontar, 2012) de zonas de la piel no afectadas por la quemadura (Gacto-Sanchez, 2017; Warby y Maani, 2023). Sin embargo, aquellos pacientes en los que la quemadura supone un alto porcentaje de superficie corporal, así como ciertos pacientes especialmente vulnerables, no pueden ser tratados de forma totalmente eficaz mediante el uso de autoinjertos, siendo necesario buscar alternativas terapéuticas capaces de superar los resultados del tratamiento convencional (Pasierb et al., 2022).

3. Las terapias avanzadas

El reciente desarrollo de las terapias avanzadas ha supuesto una esperanza para un gran número de pacientes para los que, hoy en día, no existe una alternativa terapéutica realmente eficaz, tales como los grandes quemados (Reiss et al., 2011; Martin-Piedra et al., 2019). Estos productos, considerados mayoritariamente medicamentos en la Unión Europea (UE), suponen una nueva arma terapéutica de vanguardia que posibilita, por primera vez, el tratamiento regenerativo de patologías complejas que no disponen de tratamiento eficaz. Su desarrollo ha creado numerosas expectativas que han obligado a sociedades científicas (Ikonomou et al., 2023) y a las autoridades regulatorias de la Unión Europea a elaborar numerosas guías y páginas informativas relacionadas con la efectividad de estas terapias y sus posibles usos fraudulentos y efectos adversos (Figura 6).

Advice for patients considering treatment with a cell-based therapy

If you are offered cell-based therapy, find out from your healthcare professional if it has been authorised by medicines authorities

- ✓ Ask your healthcare professional to **explain the risks and benefits** of the cell-based therapy and provide information in writing
- ✓ Ask your healthcare professional how you should report **side effects** resulting from the treatment
- ✓ Contact your national medicines authority or EMA if you have any questions*
- ✓ If you are considering taking a treatment in a non-EU country, **check the regulations in that country**

*[ema.europa.eu/partners-networks/eu-partners/eu-member-states](https://www.ema.europa.eu/partners-networks/eu-partners/eu-member-states)

Figura 6. Página informativa creada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en relación con el uso de las nuevas terapias avanzadas (se muestra la página original en inglés publicada en <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>).

Según la legislación actual, los medicamentos de terapias avanzadas comprenden los siguientes productos:

- Medicamentos de terapia celular somática.
- Medicamentos de terapia génica.
- Productos de ingeniería tisular.
- Medicamentos de terapia avanzada combinada.

La regulación de este tipo de medicamentos es compleja. En el año 2001, la Directiva 2001/83/CE ya definió lo que se entendía por terapia celular y terapia génica (Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano), mientras que el Reglamento 1394/2007 (Reglamento CE nº 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007) incluyó en la definición de medicamento de terapias avanzadas a los productos de ingeniería tisular y a los medicamentos combinados de terapia avanzada. La enorme complejidad del marco normativo actual, así como las dificultades para fabricar este tipo de productos, hacen que sea realmente complejo desarrollar productos comerciales de terapias avanzadas (Cuende e Izeta, 2010), existiendo, en estos

momentos, muy pocos productos comercializados en Europa (Goula et al., 2020; Izeta y Cuende, 2023).

Según queda descrito en la regulación específica de terapias avanzadas (Reglamento (CE) nº 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007), se considera producto de ingeniería tisular a aquél que cumple los siguientes requisitos:

- Contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y
- Se alega que tiene propiedades, se emplea o se administra a las personas para regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano.

Un producto de ingeniería tisular podrá contener células o tejidos de origen humano, animal, o ambos. Las células o tejidos podrán ser viables o no. Podrá también contener otras sustancias, como productos celulares, biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, soportes o matrices.

Las células o tejidos se considerarán «manipulados por ingeniería» si cumplen al menos una de las condiciones siguientes:

- Las células o tejidos han sido sometidos a manipulación sustancial, de modo que se logren las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para la regeneración, reparación o sustitución pretendidas. Las manipulaciones enumeradas en particular en el anexo I no se consideran sustanciales.
- Las células o tejidos no están destinados a emplearse para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante.

De acuerdo con el mencionado reglamento, los medicamentos de terapia avanzada, una vez que se ha demostrado su calidad, seguridad y eficacia, requieren una autorización de comercialización a nivel centralizado de la UE para ser accesibles a los pacientes. No obstante, existe una excepción a esta norma en el caso de medicamentos de terapias avanzadas fabricados ocasionalmente con el fin de cumplir una prescripción facultativa individual de un producto hecho a medida destinado a un solo paciente, denominada exención hospitalaria (Cuende et al., 2014, 2022). Esta exención permite el uso de estos medicamentos con una autorización

nacional que, en nuestro país se rige por el Real Decreto 477/2014 que regula la autorización de uso hospitalario de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2014).

Desde un punto de vista práctico, el desarrollo de la ingeniería tisular comienza, tras algunas experiencias preliminares, con la publicación de Langer y Vacanti en 1993 (Langer R; Vacanti JP, 1993), en la que se describe la posibilidad de crear nuevos tejidos artificiales utilizando cultivos celulares y diversos tipos de biomateriales. A partir de entonces, esta disciplina ha experimentado un desarrollo exponencial, siendo numerosos los modelos de tejido artificial descritos hasta el momento para uso clínico, diagnóstico o de investigación (Berthiaume François, Maguire Timothy, 2011; Santisteban-Espejo et al., 2018). En el caso de la piel humana, el desarrollo de sustitutos de piel artificial mediante ingeniería tisular supone una posibilidad prometedora en tratamiento regenerativo de pacientes grandes quemados (Oualla-Bachiri et al., 2020; Yoon et al., 2020).

Los productos de ingeniería tisular utilizados como sustitutos de la piel se obtienen, como norma general, a partir de células funcionales, biomateriales, que actúan como matriz o andamiaje, y de una serie de factores de crecimiento y del uso de métodos de biofabricación que permiten el desarrollo de modelos de piel artificial (Chaudhari et al., 2016).

1. **Células.** Las células vivas suponen, probablemente, uno de los componentes más relevantes de los tejidos artificiales y los responsables fundamentales de su efecto terapéutico. En el caso de la piel, se pueden utilizar distintos tipos de células obtenidas de forma ortotípica, de la propia piel, o de forma heterotípica, de fuentes celulares alternativas como las células madre mesenquimales (Martin-Piedra et al., 2019; Garzon et al., 2020; Blanco-Elices et al., 2023). En la mayoría de los casos, sin embargo, los modelos utilizados clínicamente hasta el momento contienen únicamente células obtenidas de forma ortotípica (Meana et al., 1998; Llames et al., 2004; Ruiz-López et al., 2022).
2. **Biomateriales.** Los biomateriales se utilizan, en combinación con las células, para generar sustitutos dérmicos, remedando, de esta forma, la típica estructura del

tejido conectivo compuesto por células y matriz extracelular (Ross y Pawlina, 2007). Hasta ahora, se han descrito numerosos tipos de biomateriales de utilidad potencial en ingeniería tisular de la piel (Simmons et al., 2020; Safina et al., 2022), destacando especialmente, los hidrogeles y los polímeros altamente biocompatibles (da Silva et al., 2019).

Uno de los hidrogeles que han mostrado resultados prometedores en ingeniería tisular es el biomaterial de fibrina-agarosa (Alaminos et al., 2006; Scionti et al., 2014; Ionescu et al., 2020). Basado en una combinación de fibrina humana procedente de donantes (Llames et al., 2004) y agarosa purificada de algas marinas (Irastorza-Lorenzo et al., 2021), el biomaterial de fibrina-agarosa ha demostrado utilidad potencial para la generación de distintos tejidos mediante ingeniería tisular, incluyendo la córnea, que ha demostrado bioseguridad y biocompatibilidad no sólo a nivel preclínico (Alaminos et al., 2006; González-Andrades et al., 2009; Ionescu et al., 2011; Blanco-Elices et al., 2023), sino también, en ensayos clínicos (González-Andrades et al., 2017; González-Gallardo et al., 2023), el nervio (Carriel et al., 2017c; Chato-Astrain et al., 2018), la mucosa oral (Garzon et al., 2009; Garzón et al., 2013; Blanco-Elices et al., 2021), el paladar (Fernández-Valadés-Gámez et al., 2016; Martín-Piedra et al., 2017), y otros tipos de tejidos humanos (Martin-Piedra et al., 2017; Zarrintaj et al., 2018; Carriel et al., 2019; Garzón et al., 2021).

Por un lado, la fibrina es un biomaterial natural, fácil de obtener a partir del fibrinógeno de la sangre humana, que resulta altamente biocompatible en contacto con las células y los tejidos (Barsotti et al., 2011; De la Puente y Ludeña, 2014). A nivel estructural, la fibrina es capaz de formar redes fibrilares tridimensionales compuestas por cadenas insolubles de fibrina entrelazadas entre sí por enlaces disulfuro (Noori et al., 2017). Este biomaterial ha sido utilizado para la generación de un gran número de tejidos artificiales potencialmente útiles, proporcionando una estructura parcialmente similar a la matriz extracelular de los tejidos conectivos, facilitando la adhesión, migración y diferenciación celular (De la Puente y Ludeña, 2014). Sin embargo, este biomaterial presenta pobres propiedades biomecánicas, lo cual limita su utilidad

potencial en ingeniería tisular comparado con otros polímeros como el agar o la poliacrilamida (Oyen, 2014).

Por otro lado, la agarosa (Figura 7) es un biomaterial natural basado en largas cadenas de polisacáridos de D-galactosa y L-galactosa, con un gran número de grupos hidroxilo en su estructura (Graham et al., 2019). Los hidrogeles de agarosa tienen la propiedad de ser termorreversibles, lo cual facilita enormemente los procesos de biofabricación, y han mostrado alta biocompatibilidad tanto en presencia de células como una vez implantados en un organismo vivo (Irastorza-Lorenzo et al., 2021; Jiang et al., 2023). Su aplicación en ingeniería tisular ha permitido la fabricación de diferentes tejidos artificiales, tales como el cartílago (Salati et al., 2020), el nervio (Lewitus et al., 2011) o la propia piel (Su et al., 2021).



Figura 7. Biomaterial de agarosa al 1% generado sobre una placa de Petri para su utilización en ingeniería tisular.

3. **Factores de crecimiento.** Junto a las células y los biomateriales, los factores de crecimiento constituyen componentes necesarios para inducir la proliferación y la diferenciación celular de los tejidos generados mediante ingeniería tisular (Langer R; Vacanti JP, 1993). En tres sus principales propiedades, estos factores son capaces de aumentar la viabilidad del producto, inducir la producción de componentes celulares y extracelulares y, en suma, aumentar la funcionalidad del mismo (Bakhshandeh et al., 2017).

4. **Métodos de biofabricación.** Por su parte, diferentes métodos de biofabricación han permitido mejorar los sistemas actualmente disponibles para la fabricación de piel artificial utilizando bioimpresión 3D, biorreactores y otros métodos de biofabricación avanzada (Gao et al., 2021, 3; Hosseini y Shafiee, 2021; Hosseini et al., 2022). Uno de los métodos de biofabricación que ha demostrado utilidad potencial para incrementar las propiedades de los hidrogeles utilizados en ingeniería tisular de la piel es la nanoestructuración (Figura 8). Basada en métodos de compresión plástica previamente descritos por Brown y cols. (Mudera et al., 2007; Brown, 2013; Cheema y Brown, 2013), la nanoestructuración combina la aplicación de fuerzas de presión con una deshidratación controlada del material, consiguiendo, de este modo, un producto significativamente más elástico y resistente, con menor cantidad de agua, capaz de reproducir las propiedades biomecánicas del tejido nativo (Ionescu et al., 2011, 2020; Scionti et al., 2014; Chato-Astrain et al., 2018, 2018).

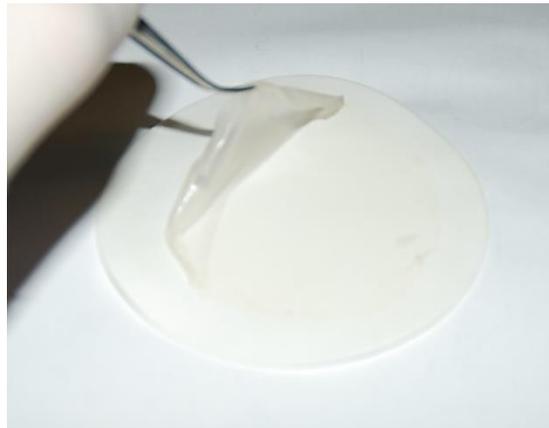


Figura 8. Aspecto macroscópico de un tejido artificial nanoestructurado sobre una membrana porosa de nylon circular. El tejido nanoestructurado ha perdido gran cantidad de agua y muestra una apariencia y consistencia similar a una membrana, posibilitando su manejo con pinzas quirúrgicas.

En los últimos años, se han desarrollado ciertos sustitutos de la piel humana que han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de distintos tipos de defectos cutáneos, aunque son muy pocos los que han logrado llegar a la clínica (Nyame et al., 2015). Algunos de estos sustitutos demostraron utilidad en pacientes con graves alteraciones de la piel, contribuyendo a regenerar la piel tratada, acortando el tiempo de cicatrización (De Francesco et al., 2020) y mejorando la situación del paciente

(Cottone et al., 2021). En nuestro país destacan los resultados obtenidos en grandes quemados tratados con un modelo pionero de piel humana artificial autóloga basada en hidrogeles de plasma humano diseñado por el Dr. Meana y cols. (Meana et al., 1998; Llamas et al., 2004; Gómez et al., 2011).

Uno de los sustitutos de piel humana que ha logrado resultados satisfactorios es el modelo de fibrina-agarosa nanoestructurada diseñado en la Universidad de Granada denominado modelo UGRSKIN (Ruiz-López et al., 2022). Este modelo ortotípico de piel está constituido por un sustituto de la dermis fabricado a partir de fibroblastos de la piel inmersos en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados, y un sustituto de la epidermis, generado en la superficie de este sustituto dérmico utilizando queratinocitos de la piel (Carriel et al., 2012). Para evaluar su utilidad potencial, el modelo UGRSKIN fue sometido a varios controles de calidad preclínicos, tal como establece la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para los productos de terapias avanzadas (Rico-Sánchez et al., 2019). Estos controles de calidad preclínicos demostraron lo siguiente:

1. A nivel físico, el producto UGRSKIN mantenido en cultivo *ex vivo* presentaba adecuadas propiedades biomecánicas adecuadas (fundamentalmente, módulo elástico y módulo viscoso), y que este sustituto, a pesar de no contar con una abundante población de melanocitos mientras se mantuvo en cultivo *ex vivo*, presentaba un adecuado comportamiento óptico, siendo capaz de absorber la luz ultravioleta incidente (Ionescu et al., 2020; Ruiz-López et al., 2022). Estos resultados sugieren que el modelo UGRSKIN podría comportarse, desde el punto de vista físico, de manera similar a los controles de piel nativa una vez implantado *in vivo*.
2. A nivel histológico, el modelo de piel artificial mantenido *ex vivo* reveló un proceso de maduración secuencial dependiente del tiempo en cultivo (Carriel et al., 2012). Mientras los tejidos artificiales presentaron un epitelio pobremente diferenciado durante la primera semana de evolución, el tiempo de cultivo contribuyó a aumentar el número de estratos y el nivel de diferenciación de sus células, logrando encontrar descamación de los estratos más superficiales tras la utilización de sistemas de cultivo aire-líquido (Viñuela-Prieto et al., 2015; Li et al.,

2020) (Figuras 9 y 10). Cuando se analizó la expresión de marcadores y componentes de la piel nativa, se encontró que el modelo UGRSKIN expresaba bajos niveles de citoqueratinas y otros componentes de la epidermis, así como de colágeno, proteoglicanos y otros componentes de la dermis, aunque el tiempo de cultivo logró aumentar parcialmente la presencia de estos componentes (Carriel et al., 2012).

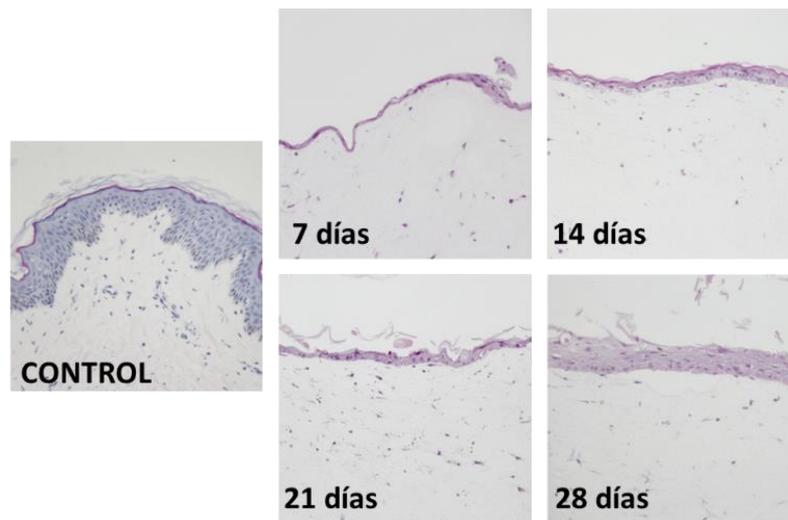


Figura 9. Análisis histológico de la piel humana control y del modelo UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo durante 28 días en el que se aprecia el desarrollo progresivo de la capa epitelial con el tiempo de cultivo. Tinción de hematoxilina-eosina. Modificado de Carriel y cols. (Carriel et al., 2012).

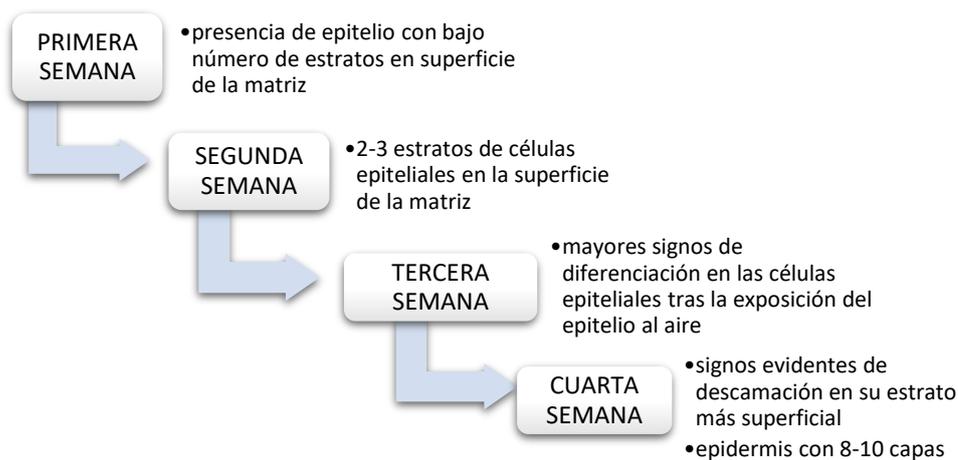


Figura 10. Principales hallazgos histológicos encontrados en el epitelio del modelo UGRSKIN mantenido en cultivo durante 28 días.

3. El implante del modelo UGRSKIN en animales de experimentación (ratones atímicos inmunodeficientes) demostró que el modelo era seguro y mostraba indicios de funcionalidad *in vivo* (Figura 11). Una vez implantado *in vivo*, la piel artificial mostró precozmente signos de diferenciación compatibles con una piel similar a la piel humana nativa, aunque sin la presencia de anejos (glándulas y folículos) ni patrones de diferenciación dermo-epidérmica del tipo crestas y papilas (Figura 12). Cuando se evaluaron determinados componentes de la piel humana, se encontró que el implante *in vivo* se asoció a un incremento significativo de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de la dermis, confirmando la idea de que el ambiente *in vivo* es capaz de aportar los factores necesarios para la diferenciación terminal de los tejidos artificiales generados en laboratorio (Garzón et al., 2009, 2020; Chato-Astrain et al., 2018).



Figura 11. Animal de laboratorio (ratón atímico inmunodeficiente) en el que se implantó un fragmento de tejido humano artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada generada mediante ingeniería tisular. La incapacidad del sistema inmune de rechazar los xenoinjertos que se implantan en estos animales posibilita la generación de individuos quiméricos que portan tejidos de naturaleza humana.

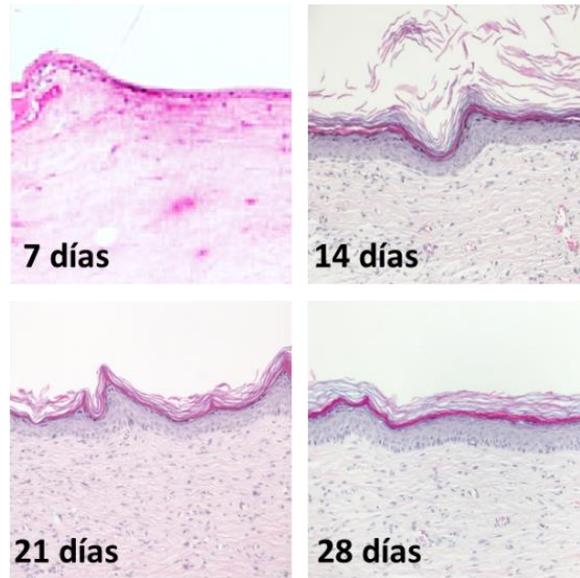


Figura 12. Análisis histológico del modelo UGRSKIN implantado en animales de laboratorio, en el que se aprecia un rápido proceso de diferenciación de la capa epitelial. Tinción de hematoxilina-eosina. Modificado de Carriel y cols. (*Carriel et al., 2012*).

Una vez superados los controles de calidad necesarios para su caracterización preclínica, y tras demostrar bioseguridad y utilidad potencial a nivel preclínico del modelo de piel UGRSKIN, acorde a lo establecido por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (Rico-Sánchez et al., 2019), se procedió a su transferencia clínica como medicamento de terapias avanzadas. Para ello, en primer lugar, se validó la fabricación del modelo de piel UGRSKIN de acuerdo con las normas de correcta fabricación de medicamentos o GMP (del inglés *Good Manufacturing Practice*) en un laboratorio farmacéutico perteneciente al Servicio Andaluz de Salud autorizado por la AEMPS. Tras ello, se generó el producto en una sala GMP como para uso clínico, cumpliendo todos los estándares de calidad requeridos para el uso clínico de estos productos, tal como se hizo previamente con otros modelos de tejidos artificiales basados en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados (Rico-Sánchez et al., 2019; González-Gallardo et al., 2023). Para su aplicación clínica, se obtuvo autorización individual de la AEMPS para su aplicación a pacientes grandes quemados vía uso compasivo (Egea-Guerrero et al., 2019).

Los resultados preliminares del uso clínico del producto en un total de 12 pacientes grandes quemados mostraron una tasa de supervivencia del 75%, dado que tres pacientes fallecieron debido fundamentalmente a infecciones y complicaciones sistémicas derivadas del grave estado general en el que se encontraban (Egea-Guerrero et al., 2019). Aunque estos resultados preliminares resultaron muy alentadores, los mecanismos histológicos e histofisiológicos que se asocian al efecto terapéutico del modelo UGRSKIN aún no han sido determinados. Por ello, se hace necesaria la realización de un análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico completo de los procesos implicados en la regeneración y biointegración del modelo una vez implantado en pacientes. La realización de este tipo de estudios podría contribuir no sólo a entender mejor los mecanismos implicados en el efecto terapéutico del producto UGRSKIN de acuerdo a las directrices de las autoridades reguladoras (Hartmann-Fritsch et al., 2016), sino, además, a establecer acciones de mejora conducentes a perfeccionar el modelo para lograr un producto más seguro y más útil en la clínica humana.

HIPÓTESIS

La generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular ha experimentado un avance considerable en los últimos años, permitiendo la fabricación de diversos modelos de piel humana artificial capaces de reproducir parcialmente la estructura de la piel humana nativa. A este respecto, el modelo de piel artificial UGRSKIN, desarrollado en la Universidad de Granada, ha demostrado previamente su utilidad clínica en el tratamiento de pacientes afectados de graves quemaduras tratados en una Unidad de Quemados.

Aunque los patrones de diferenciación histológica que tienen lugar en la piel injertada en estos pacientes aún no han sido determinados, nuestra hipótesis de trabajo es que la piel artificial implantada *in vivo* es capaz de integrarse adecuadamente en el tejido receptor, mostrando niveles adecuados de maduración y diferenciación, equiparándose finalmente a la piel humana nativa. En concreto, podemos hipotetizar que:

1. La piel artificial generada en laboratorio y mantenida *ex vivo* podría reproducir la estructura de la piel humana, aunque con menores niveles de diferenciación.
2. La piel artificial humana podría integrarse adecuadamente en el paciente, sin inducir la generación de patologías detectables a nivel histológico.
3. El implante en pacientes afectados de graves quemaduras podría inducir la diferenciación del epitelio de los sustitutos de piel, generándose un epitelio biomimético respecto a la piel nativa.
4. La membrana basal del sustituto de piel implantado en pacientes podría diferenciarse de forma adecuada, alcanzando niveles similares a los de la piel nativa.
5. La dermis del sustituto de piel implantado en pacientes podría mostrar signos de diferenciación y maduración, integrándose de forma adecuada en el tejido receptor y mostrando una red vascular que permita el correcto funcionamiento *in vivo* de este sustituto.

OBJETIVOS

Objetivo principal: analizar las características histológicas de un modelo de piel artificial basado en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurada implantado en pacientes afectados de graves quemaduras cutáneas.

Objetivos específicos:

- Analizar histológicamente la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada para determinar patrones de diferenciación epidérmica antes y después de su implante en pacientes grandes quemados.
- Analizar histológicamente la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada para determinar patrones de diferenciación de la membrana basal antes y después de su implante en pacientes grandes quemados.
- Analizar histológicamente la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada para determinar patrones de diferenciación dérmica antes y después de su implante en pacientes grandes quemados.
- Analizar histológicamente la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada para determinar la presencia de vasos sanguíneos y linfáticos antes y después de su implante en pacientes grandes quemados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de sustitutos de la piel humana UGRSKIN mediante ingeniería tisular

1.1. Generación de cultivos primarios de células de la piel

Para generar los sustitutos UGRSKIN de piel humana artificial, se aplicaron métodos de ingeniería tisular previamente desarrollados y optimizados por el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013; Martín-Piedra et al., 2019; Ionescu et al., 2020; Ruiz-López et al., 2022) y posteriormente trasladados y adaptados a condiciones GMP en la Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Para ello, en primer lugar, y previa firma de consentimiento informado, se obtuvieron biopsias de 6-9 cm² de piel sana obtenida a partir de técnica aséptica de grandes quemados ingresados en la Unidad de Quemados del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla (12 pacientes en total), las cuales se introdujeron en un contenedor con solución de transporte estéril compuesta por 500 ml de DMEM sin rojo fenol suplementado con gentamicina 160 µg/ml, vancomicina 100 µg/ml, cefotaxima 100 µg/ml y anfotericina B 1,25 µg/ml, y se enviaron rápidamente a la Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, vinculado al Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, donde se cuenta con un laboratorio farmacéutico que cumple normas GMP (denominado laboratorio GMP) autorizado por la AEMPS y coordinado por la Red Andaluza de diseño y traslación de Terapias Avanzadas (RAdytTA).

Una vez recibidas en el laboratorio GMP, las muestras se lavaron utilizando una solución de lavado preparada previamente compuesta de tampón fosfato (PBS) suplementado con 96 µg/ml de gentamicina, 100 µg/ml de vancomicina, 100 µg/ml de cefotaxima y 1,25 µg/ml de anfotericina B. Posteriormente, las muestras fueron procesadas en condiciones GMP para generar cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos utilizando métodos de digestión enzimática previamente descritos utilizando tripsina y colagenasa (Carriel et al., 2012; Martín-Piedra et al., 2019). Una vez aislados, cada tipo celular se cultivó utilizando medios específicos. En concreto, los fibroblastos dérmicos se cultivaron en medio de fibroblastos, compuesto por

medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo fenol, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) con un 2% de glutamina y 96 µg/ml de gentamicina (Normon). A su vez, las células epiteliales se cultivaron en medio de queratinocitos, compuesto por tres partes de medio DMEM y una parte de medio Ham-F12, suplementado con un 10% de SBF, 96 µg/ml de gentamicina, 2mM de glutamina, 24 µg/ml de adenina, 0,4 mg/ml de hidrocortisona, 5 mg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 1,4 ng/ml de triyodotironina y 1,25 µg/ml de Anfotericina B (todo ello, de Merck/Sigma-Aldrich, a excepción de la gentamicina, que es de Normon). Para favorecer su crecimiento, las células epiteliales se sembraron sobre una capa de células alimentadoras (*feeders*) de origen murino o humano, en función de la superficie a tratar. En todos los casos, las células se mantuvieron en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO₂, utilizando protocolos de cultivo estándar. Estos medios de cultivo se renovaron cada 2-3 días, y las células se subcultivaron cuando alcanzaron subconfluencia utilizando una mezcla comercial de TrypLE™ -Select 1X (Life Technologies).

1.2. Fabricación de sustitutos de piel humana mediante ingeniería tisular

Una vez obtenidos los cultivos celulares, se procedió a generar sustitutos de piel humana utilizando biomateriales de fibrina-agarosa. Para ello, en primer lugar, se fabricaron sustitutos de la dermis humana con fibroblastos en su interior, procediéndose posteriormente a generar una capa de epitelio formado por queratinocitos en su superficie. Para el sustituto dérmico, se utilizó plasma humano procedente de donantes de sangre (como fuente de fibrina) y agarosa tipo VII comercial (Merck/Sigma-Aldrich) a una concentración final del 0,1%. Cada lámina de piel artificial tenía un volumen final de 50 ml y estaba compuesta de 41,6 ml de plasma humano, al que se añadió una suspensión de 1 a 1,5 x 10⁶ fibroblastos en 3,35 ml de medio de cultivo procedentes de los cultivos primarios previamente generados y 0,83 ml de ácido tranexámico (Amchafibrin®, RottaPharm), para evitar la fibrinólisis. Tras mezclar cuidadosamente, se añadieron 2,5 ml de una solución de agarosa tipo VII (Merck/Sigma-Aldrich) al 2% previamente calentada hasta fusión, seguido de 1 ml de una solución de CaCl₂ al 10% (Braun). Esta mezcla se homogeneizó mediante

agitación rápida y se alicuotó inmediatamente en placas de cultivo cuadradas de 144 cm² de superficie (Greiner Bio-One), que se incubaron a 37°C en un incubador celular para favorecer la gelificación del biomaterial. Tras 24 horas, se procedió a incorporar los queratinocitos procedentes de los cultivos primarios en la superficie de estos sustitutos dérmicos a una densidad de 10.000 a 20.000 queratinocitos por cm² de superficie. Estos sustitutos de piel humana se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂, renovándose el medio de cultivo cada 2-3 días.

1.3. Nanoestructuración

Una vez generados los sustitutos de piel artificial humana mediante ingeniería tisular, alrededor de 4-5 semanas después de obtener las biopsias, se aplicaron métodos de nanoestructuración basados en compresión plástica y deshidratación del tejido artificial, siguiendo protocolos previamente optimizados por el grupo de investigación (Ionescu et al., 2011; Carriel et al., 2017c; Chato-Astrain et al., 2018). Para ello, se extrajo cuidadosamente el sustituto de piel de la placa de cultivo, y se depositó, con el epitelio hacia arriba, sobre un filtro poroso de nylon (que permitía el paso de agua, pero no de células ni fibras del biomaterial) colocado sobre varias capas de papel absorbente estéril. Sobre la superficie, se colocó una malla quirúrgica (para proteger al epitelio), seguida de dos filtros porosos de nylon y varias capas de papel absorbente estéril. Tras ello, se aplicó un peso constante de alrededor de 300 g sobre la superficie, dejando actuar al sistema durante 2 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se desmontó el sistema y, con la ayuda de unas pinzas estériles, se recuperó la piel artificial que había perdido gran parte de su volumen debido a la pérdida de agua. Este proceso se repitió para el resto de láminas requeridas para el tratamiento del paciente. Los tejidos, correspondiente al modelo UGRSKIN, generados como producto de terapias avanzadas en el laboratorio GMP de la UPCIT HUVN Granada y que contaba con autorización previa como uso compasivo por la AEMPS, se envasaron en un contenedor estéril que contenía lactato de Ringer (Fresenius Kabi España S.A.) y se liberó, transportándose de forma urgente a la Unidad de Quemados para su uso clínico (Egea-Guerrero et al., 2019).



Figura 13. Aspecto macroscópico de láminas de piel artificial UGRSKIN generadas mediante ingeniería tisular como productos de terapias avanzadas en la UPCIT del HUVN de Granada y enviadas a la Unidad de Quemados del HUVR para su uso autólogo en pacientes afectados de graves quemaduras cutáneas.

2. Implante clínico en pacientes afectados de graves quemaduras

Una vez transportados los sustitutos UGRSKIN desde la UPCIT del HUVN hasta la Unidad de Quemados del HUVR, se procedió a su implante autólogo en los mismos pacientes de los que procedían las biopsias de piel utilizadas para la generación de cultivos primarios. El implante de estos tejidos artificiales se realizó, con la aprobación de la AEMPS caso a caso, como uso compasivo a la espera de obtener la autorización de uso hospitalario (Cuende et al., 2014, 2022) solicitada de acuerdo con el Real Decreto 477/2014 que regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2014).

Hasta el momento del implante, todos los pacientes fueron sometidos a desbridamiento y limpieza de sus quemaduras, siguiendo protocolos establecidos en la Unidad de Quemados para este tipo de pacientes. Para prevenir la infección, se utilizaron pomadas y ungüentos específicos para el tratamiento de grandes quemados, así como curas oclusivas, que se iban renovando periódicamente. Una vez recibido el sustituto de piel en la Unidad de Quemados del HUVR, se procedió a la preparación del lecho quirúrgico de las quemaduras, eliminando tejidos necróticos hasta obtener un lecho que mostrara signos de vitalidad o tejido de granulación. Finalmente, se cubrió toda la superficie cruenta con tejido artificial, fijándose cada lámina de piel artificial autóloga con grapas quirúrgicas, aplicándose apósitos quirúrgicos no adherentes sobre toda la superficie tratada (Figura 14).



Figura 14. Implante de la piel artificial UGRSKIN en un paciente afecto de graves quemaduras cutáneas. Cada lámina de piel artificial se implantó, de forma autóloga, utilizando grapas quirúrgicas, tras preparar cuidadosamente el lecho quirúrgico. A la izquierda, se muestra una lámina de piel artificial en el momento de su implante. A la derecha, el aspecto final de la zona tratada.

3. Muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral

Para evaluar los posibles cambios histológicos que tienen lugar en la piel artificial implantada en pacientes, y determinar su grado de biomimetismo respecto a la piel humana nativa normal, se obtuvieron diferentes muestras biológicas que se resumen en la Tabla 1.

En primer lugar, se obtuvieron muestras de la piel artificial humana UGRSKIN generada mediante ingeniería tisular siguiendo los protocolos descritos más arriba y mantenida en cultivo. Estas muestras se consideraron como muestras *ex vivo*.

En segundo lugar, se tomaron diferentes biopsias procedentes de la zona del implante de piel artificial en los pacientes incluidos en el estudio. En cada paciente, y para evaluar la evolución de la piel artificial implantada, se tomaron biopsias de la zona tratada, tras un periodo de seguimiento de 30, 60 y 90 días tras el implante, catalogadas como muestras *in vivo* de 30, 60 y 90 días de evolución. Estas biopsias se tomaron, bajo anestesia local, utilizando un bisturí circular o *punch* dermatológico de 5 mm de diámetro.

Finalmente, se recogieron muestras de piel humana nativa normal procedentes de pequeños fragmentos de piel sana, que se utilizaron como base para los estudios histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos realizados en la presente Tesis Doctoral. Estas muestras se catalogaron como controles.

Muestra	Origen
<i>Ex vivo</i>	Modelo UGRSKIN generado como producto de terapias avanzadas y mantenido en cultivo
<i>In vivo 30 días</i>	Biopsia de pacientes tras 30 días del implante del modelo UGRSKIN
<i>In vivo 60 días</i>	Biopsia de pacientes tras 60 días del implante del modelo UGRSKIN
<i>In vivo 90 días</i>	Biopsia de pacientes tras 90 días del implante del modelo UGRSKIN
Control	Piel humana nativa sana

Tabla 1. Muestras histológicas analizadas en la presente Tesis Doctoral.

Una vez obtenidas, las muestras se dividieron cuidadosamente en dos fragmentos de espesor completo. El primero de ellos, de mayor tamaño, se fijó en formalina tamponada al 10% en frío. El segundo de ellos, de tamaño menor, se fijó en glutaraldehído al 2,5% en cacodilato en frío. Ambos tipos de muestras se enviaron de forma inmediata al laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada para su procesamiento y análisis.

4. Análisis ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión

Para determinar parámetros de diferenciación ultraestructurales, las muestras fijadas en glutaraldehído al 2,5% se lavaron varias veces con tampón cacodilato frío. Tras ello, se postfijaron con tetróxido de osmio al 1%, se deshidrataron progresivamente con acetona al 30, 50, 70, 95 y 100% y se incluyeron en resina de Spurr para microscopía electrónica (PanReac Química). A continuación, se obtuvieron secciones ultrafinas utilizando un ultramicrotomo, las cuales se montaron sobre rejillas y se contrastaron con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo. Finalmente, las muestras se examinaron en un microscopio Carl Zeiss EM902 (Mediatec) localizado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (Vela-Romera et al., 2019).

En todas las muestras, se determinaron patrones de diferenciación a nivel de la epidermis (ultraestructura de las células, uniones intercelulares, componentes

intercelulares, etc.), membrana basal (presencia de lámina densa, lámina lúcida y lámina reticular) y dermis (ultraestructura de las fibras, tipos de células, etc.).

5. Análisis histológicos mediante tinción de hematoxilina-eosina

Para los estudios histológicos mediante microscopía óptica, las muestras fijadas durante 24 horas en formalina se lavaron en PBS y se incluyeron en parafina, siguiendo protocolos estándar de procesamiento histológico (Garzón et al., 2021; Sánchez-Porras et al., 2023). En primer lugar, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 95 y 100%), se aclararon en xileno y se impregnaron en parafina (todos estos componentes se obtuvieron de PanReac Química). Tras ello, se obtuvieron secciones histológicas de 4 μm de grosor utilizando un microtomo, las cuales se montaron en portaobjetos, se desparafinaron en xileno, se deshidrataron en concentraciones decrecientes de etanol y se rehidrataron en agua destilada para su posterior procesamiento.

Para determinar parámetros histológicos generales se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina. Para ello, las muestras rehidratadas se incubaron en hematoxilina durante 3 minutos, se lavaron en agua corriente para fijar la tinción durante 5 minutos y se tiñeron posteriormente con eosina durante 1 minuto. Tras ello, se deshidrataron las muestras en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon con xileno y se montaron con cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá (PanReac Química). En cada muestra, se determinó la estructura general, la histomorfología del epitelio y de la dermis y la posible presencia de alteraciones histológicas evidenciables.

6. Análisis histoquímicos

Con el objetivo de identificar componentes específicos de la membrana basal y la dermis de cada tipo de muestra, se emplearon métodos histoquímicos específicos para cada componente previamente descritos y optimizados por el Grupo de Ingeniería Tisular para su aplicación a tejidos artificiales (Oliveira et al., 2013; Alfonso-Rodríguez et al., 2014; Carriel et al., 2014; Martin-Piedra et al., 2017; Díaz-Moreno et al., 2018; Vela-Romera et al., 2019). Estos métodos se aplicaron sobre secciones tisulares desparafinadas y rehidratadas siguiendo los protocolos descritos en el punto anterior. Todos los productos aquí descritos se obtuvieron de PanReac Química.

- Para la identificación de fibras de colágeno en la dermis de los diferentes tejidos artificiales se utilizó la técnica de rojo picrosirius. Para ello, las muestras rehidratadas se incubaron durante 30 minutos en una solución de Sirius Red F3B, se lavaron brevemente, y se contrastaron brevemente con hematoxilina de Harris, lavándose en abundante agua para retirar los restos de colorante.
- Para teñir específicamente las fibras elásticas se aplicó la técnica histoquímica de Verhoeff. En este caso, las preparaciones se incubaron durante 10 minutos en la solución de Verhoeff, diferenciándose posteriormente en una solución de cloruro férrico al 2% durante 15 segundos.
- La identificación de glicoproteínas de la matriz extracelular se llevó a cabo mediante la tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Para ello, las preparaciones rehidratadas se sumergieron durante 10 minutos en una solución de ácido periódico al 0,5%. Tras ello, se incubaron en reactivo de Schiff durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, se utilizó hematoxilina de Harris durante 15 segundos para contrastar brevemente la muestra.
- Para teñir los proteoglicanos de la matriz extracelular se utilizó la técnica histoquímica del azul alción. En este caso, las muestras rehidratadas se incubaron en solución de azul alción (pH 2,5) durante 30 minutos, contrastándose posteriormente de firma breve con *nuclear fast red*.

En todos los casos, las preparaciones se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en xileno y se montaron con cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá. Para su evaluación, las muestras se

escanearon utilizando un escáner de preparaciones histológicas Panoramic Desk DW II (3DHISTECH) o se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i (Nikon Corp.). En el caso de las muestras teñidas mediante rojo picrosirius, se tomaron imágenes utilizando tanto luz no polarizada como luz polarizada (para identificar el grado de organización y maduración de las fibras de colágeno). Todas las imágenes se tomaron al mismo tiempo, utilizando las mismas condiciones de iluminación, balance de blancos y exposición, para posibilitar los estudios cuantitativos.

7. Análisis inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes

Para la identificación específica de componentes celulares y extracelulares mediante inmunohistoquímica, las secciones tisulares fueron desparafinadas y rehidratadas como se describió más arriba. Posteriormente, se realizó un tratamiento con tampón citrato (pH 6,0) a 95°C para recuperación antigénica, seguida de prehibridación con suero de caballo durante 1 h. Tras ello, se aplicó una solución que contenía un anticuerpo primario, incubándose toda la noche en frío. Los anticuerpos y las condiciones específicas utilizados en esta Tesis Doctoral se resumen en la Tabla 2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las muestras varias veces en PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente utilizando el sistema comercial ImmPRESS® HRP IgG, se lavaron varias veces en PBS y la señal se reveló utilizando una solución comercial de diaminobencidina, que se paró mediante inmersión en agua destilada (todos estos reactivos de inmunohistoquímica se adquirieron a Vector Laboratories). Finalmente, los tejidos se contratiñeron brevemente con hematoxilina de Harris, se lavaron en agua, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en xileno y se montaron con bálsamo de Canadá. Al igual que en las muestras tratadas mediante histoquímica, las preparaciones se escanearon utilizando un escáner de preparaciones histológicas Panoramic Desk DW II o se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i utilizando luz blanca no polarizada. Todas las imágenes se tomaron al mismo tiempo, utilizando las mismas

condiciones de iluminación, balance de blancos y exposición, para posibilitar los estudios cuantitativos.

En el caso de las proteínas de unión intercelular claudina 1 y placoglobina, las muestras se analizaron utilizando métodos de inmunofluorescencia. En estas muestras, se procedió tal como se describió para la inmunohistoquímica, pero los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con moléculas fluorescentes de color naranja rojizo (Cy3) o verde (FITC). Tras ello, las muestras se lavaron en PBS y se cubrieron directamente con cubreobjetos utilizando aceite de montaje con DAPI (para teñir los núcleos de color azul-morado). Estas muestras se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i utilizando luz fluorescente. Todas las imágenes se tomaron al mismo tiempo, utilizando las mismas condiciones de iluminación, balance de blancos y exposición, para posibilitar los estudios cuantitativos.

ANTICUERPO	TIPO	ORIGEN	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
CK8	Primario	Conejo	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000693QD
CK18	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000150QD
CK5	Primario	Conejo	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000491QD
Filagrina	Primario	Ratón	1:50	Abcam, ab17808
Involucrina	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000164QD
Claudina 1	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000523QD
Placoglobina	Primario	Ratón	Prediluido	Abcam, ab12083
Melan-A	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-001767QD
CD1a	Primario	Conejo	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000673QD
Ki67	Primario	Conejo	1:100	Thermo Scientific, PA1-38032
Colágeno tipo V	Primario	Conejo	1:100	Abcam, ab7046
Decorina	Primario	Cabra	1:500	R&D System, AF143
CD31	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-002048QD
D2-40	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-000402QD
SMA	Primario	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica, MAD-001195QD
ImmPRESS® HRP Anti-Mouse IgG	Secundario	Caballo	Prediluido	Vector Laboratories, MP7401
ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG	Secundario	Caballo	Prediluido	Vector Laboratories, MP7402
ImmPRESS® HRP Anti-Goat IgG	Secundario	Caballo	Prediluido	Vector Laboratories, MP7405
Anti-Mouse IgG FITC	Secundario	Ratón	1:100	Merck/Sigma Aldrich, F0257
Anti-Mouse IgG Cy3	Secundario	Conejo	1:100	Merck/Sigma Aldrich, AP160C

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios y condiciones utilizadas para los estudios inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes realizados en la presente Tesis Doctoral.

8. Análisis cuantitativos

Una vez realizados los estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos, se realizaron estudios cuantitativos para determinar niveles de positividad en cada una de las muestras, tal como se describió en estudios previamente publicados (Oliveira et al., 2013; Alfonso-Rodríguez et al., 2014; Carriel et al., 2014, 2017b; Díaz-Moreno et al., 2018; Vela-Romera et al., 2019; Rodríguez-Pozo et al., 2020; Sánchez-Porras et al., 2023). Todos estos estudios se realizaron por quintuplicado, analizando 5 imágenes de cada muestra (n=5).

- Para determinar el número de vasos sanguíneos y linfáticos por mm² de dermis se analizaron áreas representativas de la dermis superficial y de la dermis profunda sometidas a inmunohistoquímica para vasos sanguíneos (CD31), vasos de grueso calibre con capa muscular (SMA) o vasos linfáticos (D2-40).
- Para determinar el porcentaje de células en estado de proliferación activa por cada milímetro de longitud de la capa basal del epitelio (donde residen las células proliferativas) se cuantificó, en cada una de las muestras, el porcentaje de células positivas para Ki67 respecto al número total de células en la capa basal del epitelio. El mismo método se utilizó para cuantificar el número de células positivas para el marcador MELAN-A (melanocitos) y CD1a (células de Langerhans) por mm de longitud de epitelio.
- Para cuantificar los niveles de señal obtenidos en los estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos se utilizó un método automatizado basado en el programa ImageJ (*National Institutes of Health*, EEUU). En el caso de los estudios histoquímicos realizados con las técnicas de Verhoeff y de rojo picrosirius con luz polarizada se determinó el porcentaje de área de dermis superficial y de dermis profunda ocupada por fibras teñidas con cada técnica, utilizando una escala que oscila entre 0 y 100% de área ocupada. Para ello, las imágenes se convirtieron a coloración binaria (blanco y negro), tras ajustar el contraste de cada microfotografía. Tras ello, se utilizó la función de área del programa ImageJ, pidiéndose al programa que calculara el porcentaje de área correspondiente a señal positiva.

- En el resto de los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos se determinó la intensidad de tinción en una escala que oscila entre 0 y 255 unidades de intensidad (U.I.) del programa ImageJ, correspondiendo 0 U.I. al color blanco, y 255 U.I. al color negro. Para realizar este análisis, se seleccionaron 10 puntos al azar en cada fotografía realizada en la dermis superficial o en la dermis profunda de cada muestra, midiéndose la intensidad de la señal de forma automática.

Todos estos estudios cuantitativos fueron realizados independientemente por tres histólogos expertos y, en los casos en los que no existía coincidencia entre las tres mediciones, se solicitó la opinión de un cuarto histólogo, hasta llegar a un consenso.

9. Análisis estadístico

Para expresar los resultados obtenidos en cada estudio cuantitativo, se calcularon medias y desviaciones estándar para técnica de análisis y para cada tipo de muestra. Para los estudios de estadística inferencial, en primer lugar, se analizó la normalidad de cada distribución utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Puesto que la mayoría de las distribuciones no cumplieron criterios de normalidad de acuerdo con esta prueba, las comparaciones de los resultados obtenidos entre distintos grupos de estudio se realizaron utilizando la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney. Mediante este test se realizaron comparaciones, para cada método de análisis, entre las muestras mantenidas *ex vivo* y las demás muestras analizadas (tejidos implantados durante 30, 60 y 90 días de evolución y controles de piel nativa), entre los controles y las demás muestras del estudio (*ex vivo* y muestras implantadas) y entre las muestras implantadas en pacientes durante diferentes tiempos de evolución (30, 60 y 90 días).

Todos estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico *RealStatistics* para Excel (Dr. Charles Zaiontz, Purdue University, West Lafayette, EEUU). Los valores de significación p por debajo de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos para las pruebas de doble cola.

10. Análisis clasificatorio utilizando métodos *cluster*

Una vez analizadas las muestras de piel artificial y los controles con las diferentes técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas cuantitativas, se realizó un estudio clasificatorio de tipo *cluster* para determinar los niveles de afinidad de cada muestra con otros tipos de muestras, en base a los resultados de dichas técnicas. Para realizar este estudio, se utilizaron los valores cuantitativos medios correspondientes a cada tipo de muestra, los cuales se analizaron utilizando la herramienta *ClustVis* para datos multivariantes (Metsalu y Vilo, 2015), capaz de generar árboles clasificatorios en función de la similitud entre las muestras analizadas. Para maximizar la validez del árbol clasificatorio, se utilizaron las opciones de máxima distancia clasificatoria entre filas y entre columnas, y de método completo de clasificación para filas y columnas. Esta herramienta está disponible en abierto en internet (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

RESULTADOS

1. Estructura general de los sustitutos de piel artificial UGRSKIN

En primer lugar, el análisis histológico de los tejidos artificiales UGRSKIN generados en laboratorio GMP y mantenidos en cultivo *ex vivo* utilizando la tinción de hematoxilina-eosina mostró que este sustituto estaba constituido por dos capas principales. La primera, correspondiente a la epidermis, estaba formada por una delgada capa de células epiteliales localizadas en la superficie del producto. La segunda, correspondiente a la dermis, presentaba una malla fibrilar con abundantes células inmersas en su espesor. La unión entre la dermis y la epidermis mostró una morfología plana, no existiendo patrones de diferenciación de tipo crestas y papilas (Figura 15).

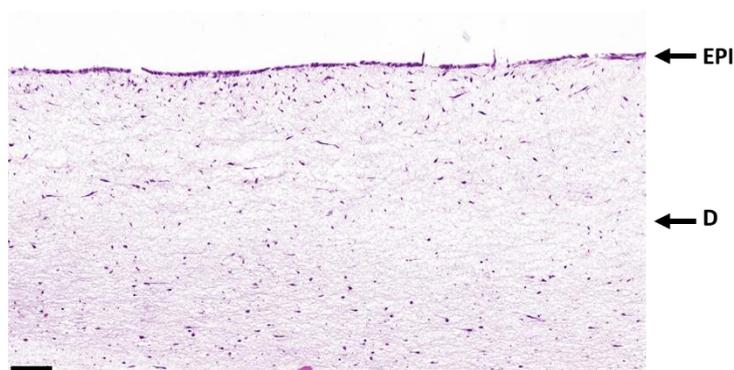


Figura 15. Análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina del modelo UGRSKIN generado en laboratorio como producto de terapias avanzadas y mantenido en cultivo (*ex vivo*). EPI: epidermis, D: dermis. Escala: 100 μ m.

En segundo lugar, la evaluación histológica del modelo UGRSKIN implantado *in vivo* en pacientes afectados de graves quemaduras cutáneas mostró algunas diferencias con la piel humana nativa utilizada como control. Como se muestra en la Figura 16, la piel nativa estaba constituida por una epidermis superficial localizada sobre una gruesa capa que contenía abundantes componentes fibrilares, así como por una gruesa capa de tejido celular subcutáneo o hipodermis que se localizaba en la capa más profunda de dicha piel nativa. Como era de esperar, la epidermis mostraba una morfología festoneada, con entrantes y salientes respecto a la dermis, compatible con la presencia de crestas y papilas. A nivel dérmico, se podían distinguir fácilmente dos

capas: una capa de dermis superficial, correspondiente fundamentalmente con la dermis papilar, y una capa de dermis profunda, compatible con la dermis reticular.

Cuando se analizó la piel artificial implantada en pacientes, se encontraron algunas diferencias respecto al control y respecto al tiempo de evolución de las muestras implantadas *in vivo*. En todos los casos, las muestras implantadas en pacientes mostraron un epitelio superficial compatible con una epidermis que recubría toda la superficie de la piel analizada, así como una gruesa capa de dermis y una hipodermis en los niveles estructurales más profundos de la piel. A diferencia del control, la epidermis presentó una morfología plana en su capa más basal, no detectándose crestas ni papilas en ninguno de los tiempos analizados. En lo que se refiere a la dermis, se identificó una región más superficial, que denominamos dermis superficial, que se encontraba separada por una interfase de otra región localizada más profundamente, que se denominó dermis profunda. Como se muestra en la Figura 16, las diferencias entre la dermis superficial y la dermis profunda, así como la línea de interfase, fueron muy evidentes en las muestras de 30 días, tendiendo a suavizarse y a hacerse menos patentes en las muestras implantadas en pacientes durante 60 y 90 días.

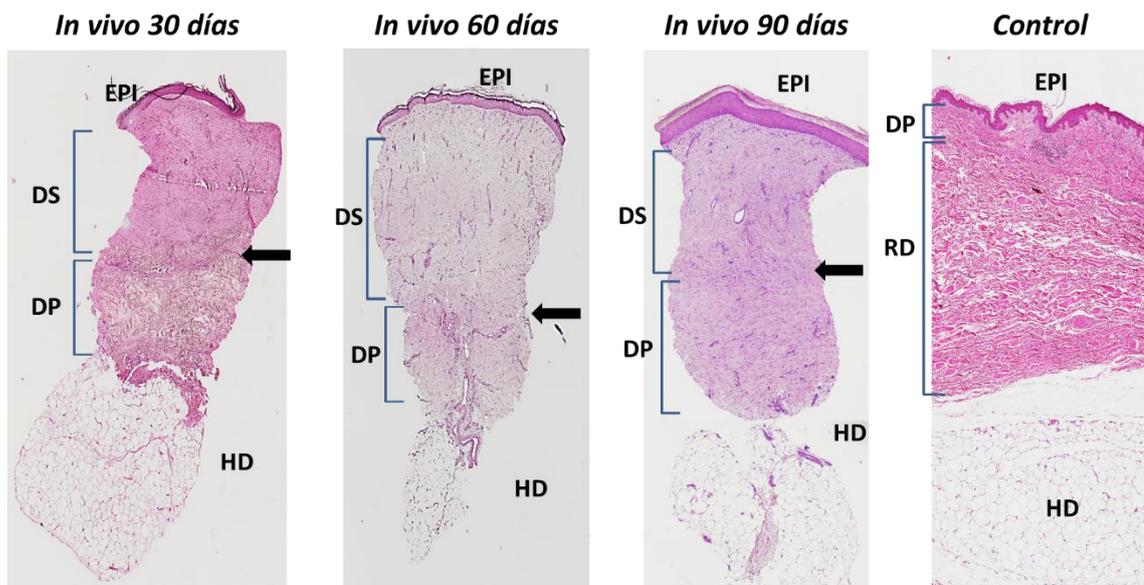


Figura 16. Análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina del modelo UGRSKIN implantado en pacientes durante 30, 60 y 90 días y de piel nativa humana utilizada como control. EPI: epidermis, SD: dermis superficial, DP: dermis profunda, HD: hipodermis. La zona de interfase entre la dermis superficial y la dermis profunda se ha señalado con una flecha. Se muestran imágenes de baja magnificación.

2. Caracterización histológica de la capa epitelial de los sustitutos de piel artificial **UGRSKIN**

2.1. Análisis histológico de la epidermis mediante tinción de hematoxilina-eosina

El análisis detallado de la capa de epidermis de los diferentes tejidos analizados en la presente Tesis Doctoral (controles y tejidos artificiales) utilizando la tinción de hematoxilina-eosina (Figura 17) mostró la existencia de distintos patrones histológicos en cada una de las muestras. Por un lado, la piel humana nativa utilizada como control presentaba la típica estructura de la epidermis humana, constituida por un epitelio de tipo plano estratificado en el que se podían distinguir varios estratos celulares. En concreto, se observó una capa basal, en la que las células presentaban morfología prismática, cilíndrica o columnar, un estrato espinoso, en el que las células adoptaban una morfología poligonal, un estrato granuloso, en el que las células tendían a aplanarse y mostraban gránulos en su interior y, finalmente, un estrato córneo de células muy planas o escamosas, con signos de descamación y queratinización en sus capas más superficiales. Por el contrario, el análisis del tejido artificial generado en laboratorio y mantenido *ex vivo* reveló la existencia de un epitelio pobremente diferenciado en el que únicamente se distinguía uno, dos o hasta tres estratos celulares, en el que no se apreciaron diferencias entre los diferentes estratos. Cuando las muestras de piel artificial se implantaron *in vivo*, se apreció la existencia de un epitelio estratificado, con más de 15 estratos celulares, que presentaba numerosos signos de diferenciación epidérmica. En concreto, se pudo detectar la presencia de estratos basal, espinoso, granuloso y córneo, como era el caso de la piel nativa utilizada como control. A este nivel, no se encontraron diferencias estructurales apreciables entre los tejidos implantados durante 30, 60 y 90 días.

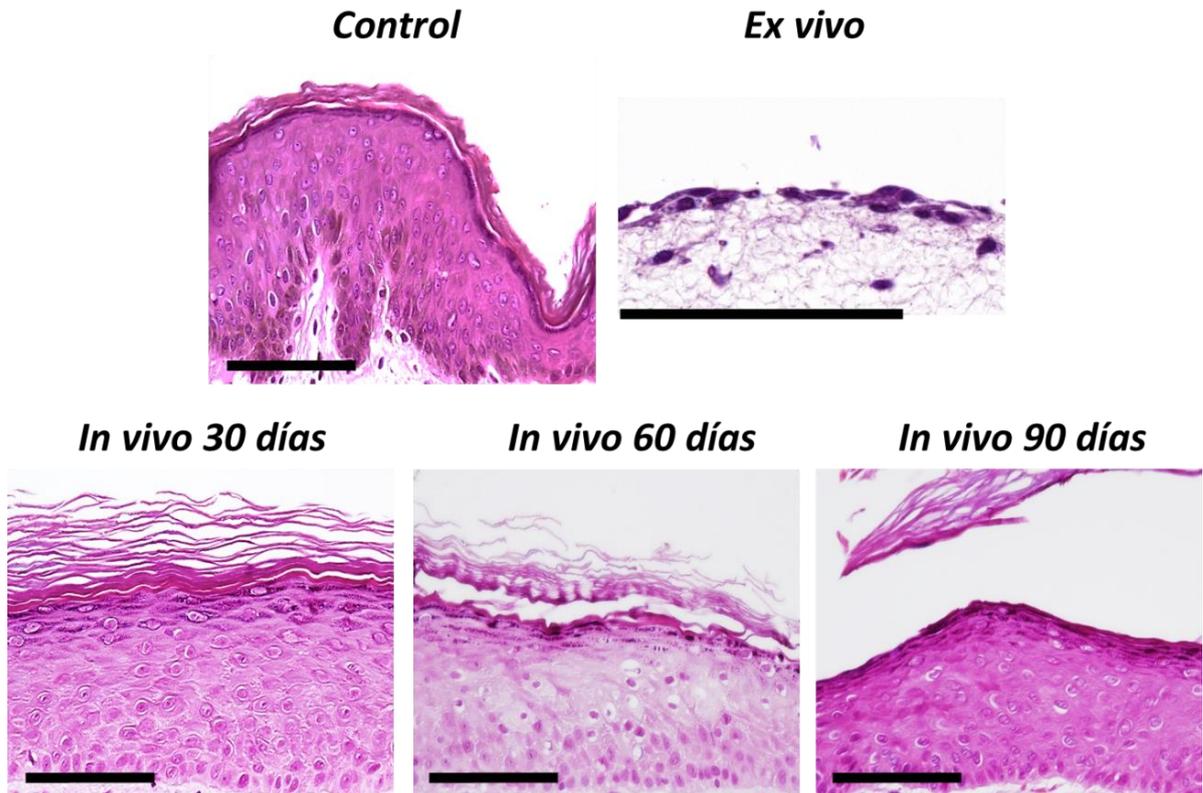


Figura 17. Análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina de la capa epitelial de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas de la piel nativa humana utilizada como control, el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*) y la piel artificial implantada en pacientes durante 30, 60 y 90 días. Escala: 100 μ m.

2.2. Análisis ultraestructural de la epidermis mediante microscopía electrónica de transmisión

Cuando se analizaron a nivel ultraestructural las muestras de piel artificial implantadas en pacientes utilizando microscopía electrónica de transmisión, se confirmó la existencia de patrones de diferenciación celular en las células de las muestras correspondientes a 30, 60 y 90 días de evolución *in vivo*, sin que se encontraran diferencias apreciables entre los distintos tiempos de evolución. Como se muestra en la Figura 18, el estrato córneo de todas las muestras implantadas en pacientes estaba formado por células de morfología escamosa, en las que se había perdido el núcleo celular, compatibles con diferenciación terminal corneocítica, existiendo tanto corneocitos densos (electrodensos) como corneocitos claros

(electrolúcidos). A nivel del estrato granuloso, se encontraron células nucleadas altamente diferenciadas que contenían abundantes gránulos electrodensos de queratohialina, no existiendo diferencias entre las muestras de 30, 60 y 90 días de evolución *in vivo*. En el estrato espinoso, las células presentaban morfología poligonal u ovoidea, un núcleo voluminoso central, y emitían numerosas prolongaciones de tipo espinas para establecer uniones con las células adyacentes. El análisis ultraestructural mostró que la mayoría de estas uniones eran de tipo desmosoma. En la capa basal, se confirmó la presencia de células elongadas de morfología prismática, cilíndrica o columnar, con un gran núcleo elongado, cuyo polo basal se unía a la membrana basal subyacente al epitelio. Además de los queratinocitos, el análisis ultraestructural reveló la presencia de algunas células de Langerhans y melanocitos (Figura 18).

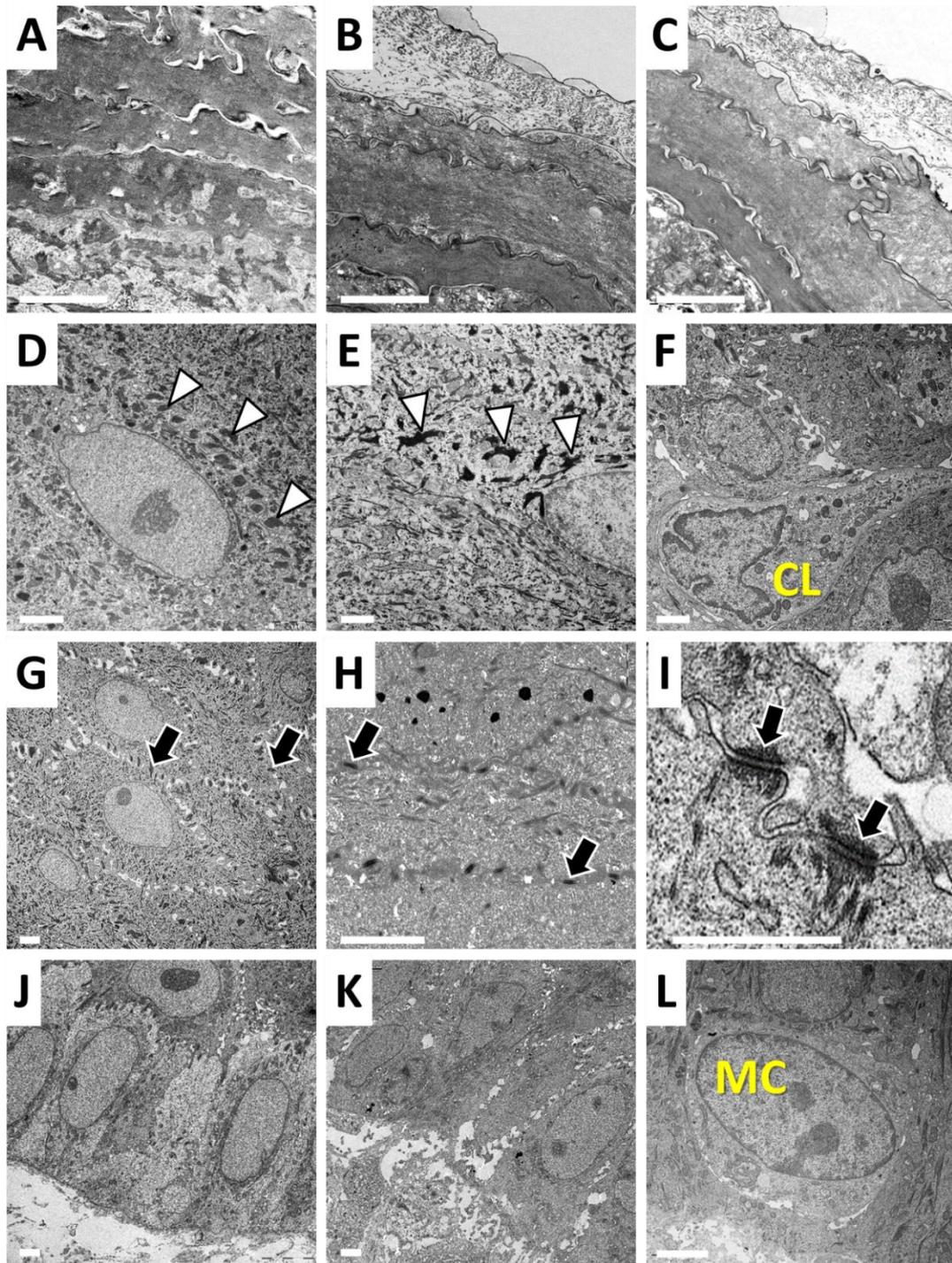


Figura 18. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de la capa epitelial del modelo UGRSKIN implantado en pacientes. A, B y C: queratinocitos del estrato córneo en muestras correspondientes a 30, 60 y 90 días tras el implante; D, E y F: queratinocitos del estrato granuloso en el que se han señalado algunos gránulos de queratohialina; G, H e I: células del estrato espinoso en las que se han señalado algunas uniones intercelulares; J, K y L: células del estrato basal de la epidermis; CL: célula de Langerhans; MC: melanocito. Escala: 2 μm .

2.3. Análisis de la capa epitelial mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

2.3.1. Análisis de citoqueratinas

Para caracterizar la presencia de componentes específicos a nivel de las células epidérmicas de las distintas muestras analizadas en esta Tesis Doctoral, se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. En primer lugar, para determinar la presencia de citoqueratinas, se aplicaron técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos frente a las citoqueratinas CK5, CK8 y CK10. Como se muestra en la Figura 19, los resultados de estos análisis mostraron la presencia de CK5 en todas las muestras, especialmente, en el control de piel nativa, siendo muy escasa en los tejidos artificiales mantenidos *ex vivo*. Los análisis cuantitativos de intensidad de señal inmunohistoquímica (Tablas 3 y 4) confirmaron que las muestras mantenidas *ex vivo* presentaban los niveles más bajos de esta citoqueratina, y que todas las muestras implantadas en pacientes (30, 60 y 90 días), así como el control de piel humana nativa, presentaban niveles significativamente superiores de expresión de CK5. Las diferencias entre el control y las muestras implantadas *in vivo* no fueron estadísticamente significativas. En lo que se refiere a CK8, nuestros análisis confirmaron la ausencia de expresión de esta citoqueratina en todas las muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral, sin que existieran diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio (Figura 19 y Tablas 3 y 4). Sin embargo, la expresión de CK10 fue muy intensa en todas las muestras, excepto en el tejido mantenido *ex vivo*, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras *ex vivo* y todas las demás muestras del estudio. Asimismo, se comprobó que los mayores niveles de intensidad de inmunotinción para CK10 correspondieron al control de piel humana nativa, los cuales eran significativamente superiores al tejido implantado en pacientes durante 30 días, pero no diferían estadísticamente de los tejidos implantados durante 60 y 90 días. Asimismo, las diferencias entre los tejidos implantados *in vivo* durante 30 días resultaron estadísticamente significativas cuando se compararon con los tejidos implantados durante 90 días (Figura 19 y Tablas 3 y 4).

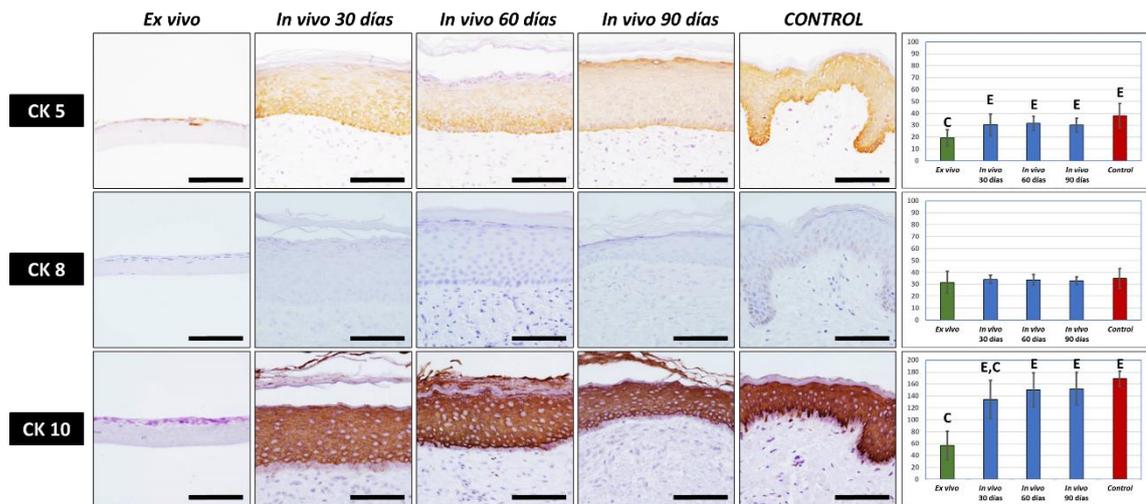


Figura 19. Análisis inmunohistoquímico de la capa epitelial de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de citoqueratinas CK5, CK8 y CK10. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha de cada inmunotinción, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la intensidad de señal, expresada como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μm .

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	<i>In vivo</i> 30 días	<i>In vivo</i> 60 días	<i>In vivo</i> 90 días	CONTROL
CK5	Epidermis	19,2±6,8	30,4±8,88	31,6±6	30,1±5,9	38±10,24
CK8	Epidermis	31,7±9,12	34,2±3,22	33,7±4,3	33±3,3	34,8±8,24
CK10	Epidermis	56,8±24,01	134,1±32,18	150,2±28,74	152±27,47	169,1±12,8

Tabla 3. Resultados del análisis cuantitativo de intensidad de tinción inmunohistoquímica para las citoqueratinas CK5, CK8 y CK10 en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores corresponden a unidades de intensidad obtenidos con el programa ImageJ, y se expresan como medias y desviaciones típicas.

	CK5	CK8	CK10
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	0,0039*	0,1903	0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,0011*	0,1230	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,0021*	0,1903	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	0,0002*	0,3150	<0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	0,0524	0,1431	0,0007*
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	0,0524	0,1431	0,1230
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	0,0753	0,0753	0,1230
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,5787	0,4813	0,2176
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,7394	0,2176	0,0288*
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,8534	0,9118	0,6305

Tabla 4. Valores p de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de intensidad de tinción inmunohistoquímica para las citoqueratinas CK5, CK8 y CK10 en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

2.3.2. Análisis de proteínas implicadas en la formación de uniones intercelulares

En segundo lugar, se analizó la expresión de dos proteínas que constituyen parte fundamental de los sistemas de unión intercelular del epitelio de la piel humana: claudina 1 y placoglobina. A este respecto, se encontró que ambas proteínas mostraron perfiles de expresión muy similares, con muy bajos niveles en las muestras mantenidas *ex vivo* (que mostraron diferencias significativas con todas las demás muestras) y valores altos en todas las muestras implantadas en pacientes y en los controles de piel humana nativa. No se encontraron diferencias significativas entre los controles y las muestras implantadas *in vivo*. Asimismo, las diferencias entre las

muestras injertadas en pacientes durante distintos tiempos no resultaron estadísticamente significativas (Figura 20 y Tablas 5 y 6).

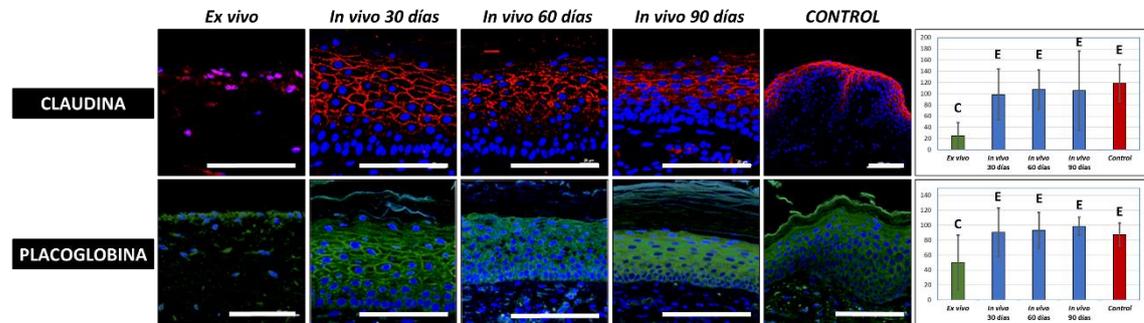


Figura 20. Análisis mediante inmunofluorescencia de la capa epitelial de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de uniones intercelulares de tipo claudina 1 y placoglobina. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha de cada inmunotinción, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la intensidad de señal, expresada como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μ m.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
Claudina 1	Epidermis	24,6 \pm 23,94	98,4 \pm 45,1	107,2 \pm 34,83	105,6 \pm 70,77	119,1 \pm 32,93
Placoglobina	Epidermis	50,2 \pm 36,64	90,3 \pm 32,39	93,2 \pm 23,9	98,5 \pm 12,04	87,5 \pm 15,14

Tabla 5. Resultados del análisis cuantitativo de intensidad de tinción inmunohistoquímica para claudina 1 y placoglobina en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores corresponden a unidades de intensidad obtenidos con el programa ImageJ, y se expresan como medias y desviaciones típicas.

	CLAUDINA 1	PLACOGLOBINA
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	0,0003*	0,0185*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,0001*	0,0052*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,0015*	0,0005*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	<0,0001*	0,0288*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	0,1431	0,5288
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	0,3930	0,2176
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	0,4359	0,1051
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,7394	0,9705
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,8534	0,8534
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,7394	0,8534

Tabla 6. Valores p de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de intensidad de tinción inmunohistoquímica para las citoqueratinas CK5, CK8 y CK10 en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

2.3.3. Análisis de marcadores de diferenciación terminal epidérmica

En tercer lugar, se analizó la presencia de dos marcadores de diferenciación terminal de la epidermis de la piel humana utilizando métodos inmunohistoquímicos. Para filagrina, los resultados muestran muy escasos niveles de expresión de este marcador en la piel artificial mantenida *ex vivo*, existiendo diferencias significativas con todas las demás muestras, y elevados niveles de expresión en todas las muestras implantadas en pacientes y en el control de piel humana nativa, sin que existan diferencias significativas entre estas muestras (Figura 21 y Tablas 7 y 8). Del mismo modo, los resultados obtenidos para el análisis de expresión inmunohistoquímica de involucrina revelan la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras *ex vivo*, que presentan los menores niveles de expresión, respecto a todas las demás muestras del estudio. Sin embargo, las muestras implantadas en

pacientes durante 30 días mostraron niveles significativamente inferiores de expresión de involucrina que las muestras de 60 y 90 días y que los controles de piel humana nativa, sin que existieran diferencias significativas entre las muestras de 60 y 90 días y los controles (Figura 21 y Tablas 7 y 8).

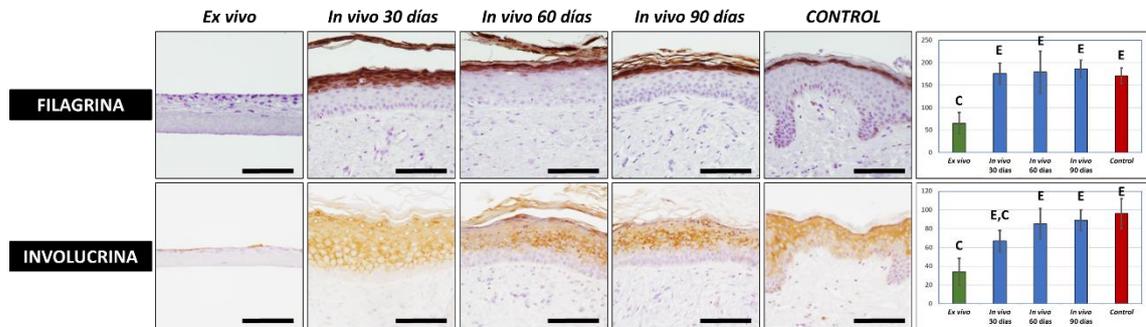


Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de la capa epitelial de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de los marcadores filagrina e involucrina. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha de cada inmunotinción, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la intensidad de señal, expresada como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μ m.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
Filagrina	Epidermis	65,3±23,98	175,8±23,43	179,2±46,83	186,4±19,24	170,7±17,06
Involucrina	Epidermis	34,1±14,35	66,9±11,32	85,4±16,28	89±11,04	96,1±16,08

Tabla 7. Resultados del análisis cuantitativo de intensidad de tinción inmunohistoquímica para filagrina e involucrina en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores corresponden a unidades de intensidad obtenidos con el programa ImageJ, y se expresan como medias y desviaciones típicas.

	FILAGRINA	INVOLUCRINA
Ex vivo vs. in vivo 30 días	<0,0001*	0,0002*
Ex vivo vs. in vivo 60 días	<0,0001*	<0,0001*
Ex vivo vs. in vivo 90 días	<0,0001*	<0,0001*
Ex vivo vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*
In vivo 30 días vs. CONTROL	0,6842	0,0005*
In vivo 60 días vs. CONTROL	0,3150	0,1431
In vivo 90 días vs. CONTROL	0,0630	0,1230
In vivo 30 días vs. in vivo 60 días	0,6305	0,0232*
In vivo 30 días vs. in vivo 90 días	0,3527	0,0007*
In vivo 60 días vs. in vivo 90 días	0,9705	0,4359

Tabla 8. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de intensidad de tinción inmunohistoquímica para filagrina e involucrina en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

2.3.4. Cuantificación de melanocitos y células de Langerhans en el epitelio de la piel humana

Para identificar la presencia de melanocitos en las diferentes muestras de piel humana, se utilizó la tinción inmunohistoquímica para el marcador MELAN-A, específico de este tipo de células. Cuando se cuantificó el número de melanocitos presentes por unidad de longitud en cada tipo de muestra, se encontró que las muestras mantenidas *ex vivo* no presentaban ninguna célula de este tipo. Por el contrario, los controles de piel nativa normal mostraron abundantes melanocitos a nivel de la capa basal de la epidermis. En cuanto a las muestras implantadas en pacientes, los análisis revelaron que la piel implantada *in vivo* durante 30 días mostró muy escaso número de estas células, mientras que las muestras de 60 y 90 días presentaron numerosos melanocitos con marcación positiva para MELAN-A, aunque

en menor nivel que el control. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre las muestras *ex vivo* y las muestras implantadas *in vivo* durante 60 y 90 días, así como con el control, y entre el control y todos los demás tipos de muestras (Figura 22 y Tablas 9 y 10).

Por otro lado, se utilizó la tinción inmunohistoquímica de CD1a para identificar células de Langerhans a nivel de la epidermis. Como se muestra en la Figura 22 y Tablas 9 y 10, los resultados mostraron la ausencia de este tipo de células en las muestras mantenidas *ex vivo*, mientras que la mayor abundancia de estas células correspondía a los controles de piel nativa. Respecto a las muestras implantadas *in vivo*, se encontró que las muestras de 30 días presentaban un número reducido de células de Langerhans, aunque significativamente superior al de los tejidos mantenidos *ex vivo*, y que este número fue aumentando progresivamente en los días 60 y 90, sin llegar al número encontrado en los controles. Todas las diferencias resultaron estadísticamente significativas.

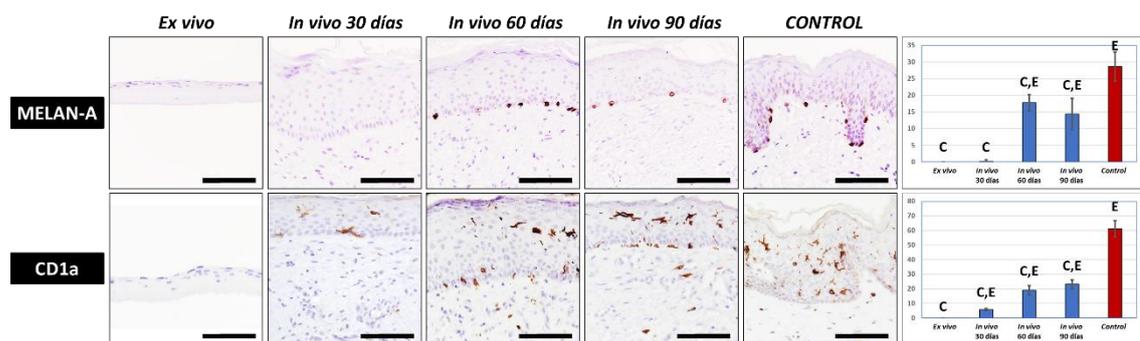


Figura 22. Análisis inmunohistoquímico de la capa epitelial de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de los marcadores MELAN-A y CD1a. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha de cada inmunotinción, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación del número de células positivas, expresado como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μ m.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
MELAN-A	Epidermis	0±0	0,2±0,45	17,8±2,39	14,4±4,72	28,6±4,34
CD1a	Epidermis	0±0	5,8±0,84	19±3,32	23,2±3,03	61,2±5,54

Tabla 9. Resultados del análisis cuantitativo del número de células que muestran tinción positiva para MELAN-A o para CD1a en 1 mm de longitud de epitelio del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	MELAN-A	CD1a
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	0,4813	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,1051	0,0115*

Tabla 10. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos del número de células que muestran tinción positiva para MELAN-A o para CD1a en 1 mm de longitud de epitelio en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

2.3.5. Análisis de proliferación de las células del epitelio de la piel humana

La aplicación de métodos de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Ki67 permitió identificar las células del epitelio que se encontraban en fase de proliferación y división celular (Figura 23 y Tablas 11 y 12). Los resultados revelaron la presencia de células en proliferación en todas las muestras, con los valores más pequeños correspondientes a las muestras *ex vivo* y a las muestras *in vivo* de 30 y 60 días, no existiendo diferencias significativas entre estos tres tipos de muestras. Sin embargo, los mayores niveles de células en proliferación correspondieron a las muestras *in vivo* de 90 días de evolución y a los controles de piel nativa, no existiendo diferencias significativas entre ambos tipos de muestras. Las diferencias entre las muestras *ex vivo* y las muestras *in vivo* de 90 días y los controles fueron estadísticamente significativas, así como las diferencias entre los controles y todos los tipos de muestras, excepto las *in vivo* de 90 días y las diferencias entre los distintos tipos de muestras implantadas en pacientes.

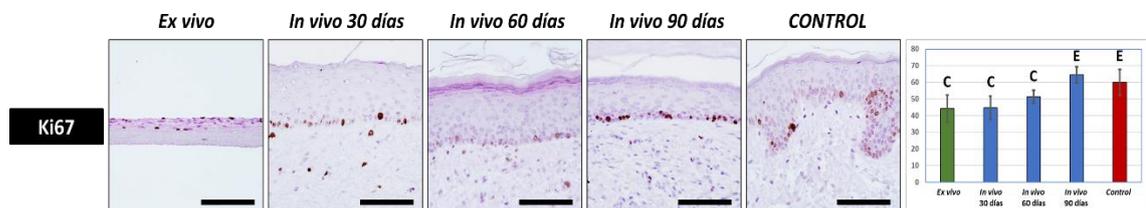


Figura 23. Análisis inmunohistoquímico de la capa epitelial de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de células en proliferación mediante el marcador Ki67. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación del número de células positivas, expresado como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 µm.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
Ki67	Epidermis	44,2±8,1	44,6±7,1	51,4±2,4	64,6±4,7	60±8,2

Tabla 11. Resultados del análisis cuantitativo del número de células que muestran tinción positiva para Ki67 en 1 mm de longitud de epitelio del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	Ki67
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	0,6842
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,0753
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	0,0007*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	0,0005*
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	0,0147*
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	0,2475
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,0232*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*

Tabla 12. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos del número de células que muestran tinción positiva para Ki67 en 1 mm de longitud de epitelio en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

3. Caracterización histológica de la membrana basal de los sustitutos de piel artificial UGRSKIN

3.1. Análisis de la membrana basal mediante técnicas de histoquímica

La aplicación de la técnica histoquímica del PAS permitió marcar las glicoproteínas y los glicosaminoglicanos de la membrana basal en los sustitutos de piel artificial analizados en esta Tesis Doctoral. De este modo, se pudo comprobar que las muestras mantenidas *ex vivo* no presentaban una membrana basal bien desarrollada, existiendo a este nivel una señal histoquímica muy débil para la técnica del PAS. Por el contrario, todas las muestras implantadas en pacientes y la piel nativa utilizada como control presentaron tinción PAS-positiva a nivel de la unión dermo-epidérmica compatible con la presencia de una membrana basal bien desarrollada, sin que existieran diferencias significativas entre estos tipos de muestras que, sin embargo, fueron significativamente superiores a los tejidos mantenidos *ex vivo* (Figura 24 y Tablas 13 y 14).

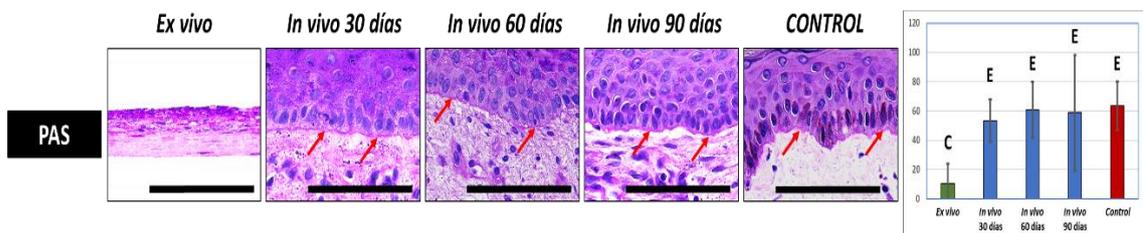


Figura 24. Análisis histoquímico de la membrana basal de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de glicoproteínas y glicosaminoglicanos identificados mediante la técnica del PAS. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la intensidad de señal, expresada como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μ m.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
PAS	Epidermis	10,3±13,59	53,4±14,5	60,8±19,08	58,8±39,66	63,7±16,6

Tabla 13. Resultados del análisis cuantitativo de intensidad de señal para la técnica PAS en la membrana basal del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	PAS
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	<0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	0,1903
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	0,6305
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	0,1230
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,4359
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,5787
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,2475

Tabla 14. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de intensidad de tinción para la técnica del PAS en el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

3.2. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión

Para confirmar la presencia de una membrana basal bien diferenciada a nivel de la unión dermo-epidérmica de los sustitutos de piel artificial generados mediante ingeniería tisular e implantados en pacientes, se procedió al análisis de estos tejidos mediante microscopía electrónica de transmisión. Los resultados de este análisis confirman la presencia de una membrana basal ortotípica constituida por una lámina basal (con lámina lúcida y lámina densa) y una lámina reticular subyacente (Figura 25). Como era de esperar, el polo apical de las células que contactaban con esta membrana basal mostraron numerosos hemidesmosomas que contribuían al anclaje de estas células con la membrana basal. No se encontraron diferencias apreciables entre las muestras implantadas *in vivo* durante 30, 60 y 90 días.

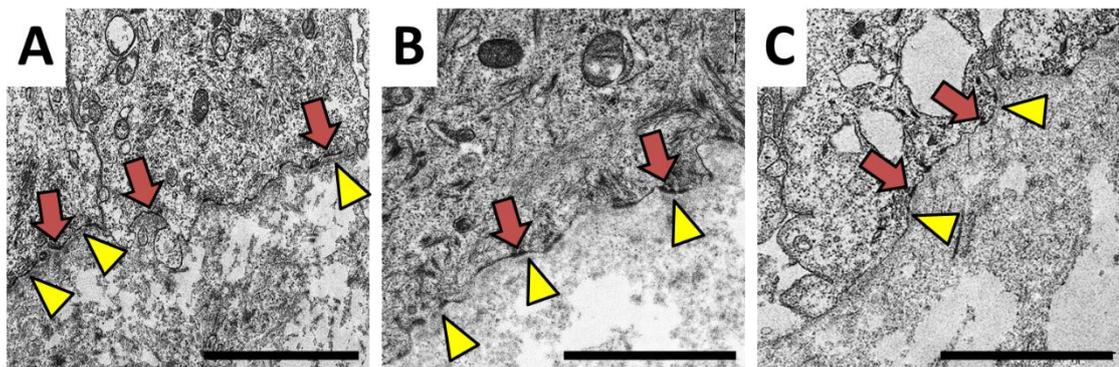


Figura 25. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de la membrana basal del modelo UGRSKIN implantado en pacientes. Las flechas de color rojo corresponden a hemidesmosomas, mientras que las puntas de flecha de color amarillo corresponden a zonas donde se aprecian la lámina basal constituida por una lámina lúcida y una lámina densa de la membrana basal. Escala: 2 μ m.

4. Caracterización histológica de la dermis de los sustitutos de piel artificial UGRSKIN

4.1. Análisis histológico de la dermis mediante tinción de hematoxilina-eosina

La evaluación histológica de la dermis correspondiente a los distintos tejidos analizados en la presente Tesis Doctoral confirmó la existencia de diferencias estructurales entre la dermis superficial y la dermis profunda, tanto en los controles de piel nativa, como en las muestras de piel artificial implantadas en pacientes

durante 30, 60 y 90 días. Sin embargo, los sustitutos de piel humana mantenidos *ex vivo*, como era de esperar, no mostraron ninguna diferencia entre el sustituto dérmico superficial y el sustituto dérmico profundo (Figura 26).

El análisis de los controles de piel nativa mostró una mayor densidad celular en la dermis superficial cuando se comparó con la dermis profunda, aunque la dermis profunda presentó mayor densidad de haces de fibras de colágeno gruesas y bien organizadas, que eran muy escasas en la dermis superficial. Respecto a la piel artificial implantada en pacientes, las muestras de 30 días de evolución mostraron abundantes células tanto en la dermis superficial como en la profunda, especialmente, en la superficial. En ambos tipos de dermis, se encontró una matriz extracelular homogénea en la que no se distinguían gruesos haces de fibras. En las muestras implantadas durante 60 días, los resultados fueron muy similares a los de 30 días, aunque el número de células de la dermis superficial fue inferior a los 30 días de evolución. Finalmente, el análisis de las muestras implantadas durante 90 días mostró abundantes células en la dermis superficial, así como una matriz extracelular homogénea que no parecía contener gruesos haces fibrilares. Por el contrario, la dermis profunda de las muestras de 90 días contenía una escasa población celular, y abundantes haces gruesos de fibras, cuya estructura era histológicamente similar a la de la dermis profunda de las muestras de piel nativa utilizadas como control (Figura 26).

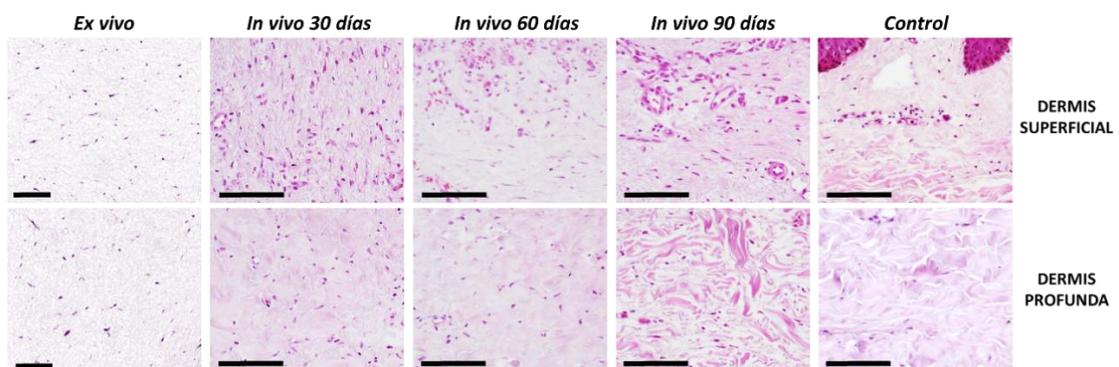


Figura 26. Análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina de la dermis de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas de la piel nativa humana utilizada como control, el sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*) y la piel artificial implantada en pacientes durante 30, 60 y 90 días. Escala: 100 µm.

4.2. Análisis ultraestructural de la dermis mediante microscopía electrónica de transmisión

A nivel ultraestructural, las muestras de piel artificial humana de fibrina-agarosa implantadas en pacientes mostraron patrones de diferenciación compatibles con una dermis normal. En concreto, como se muestra en la Figura 27, se encontró que las muestras implantadas *in vivo* presentaban, a nivel de la dermis, haces de fibras de colágeno maduro, así como fibras elásticas, a nivel de la matriz extracelular dérmica. Asimismo, la dermis contenía abundantes células de tipo fibroblástico inmersas en la matriz extracelular y, en algunas muestras, se observaron vasos sanguíneos de pequeño calibre compatibles con la presencia de capilares sanguíneos.

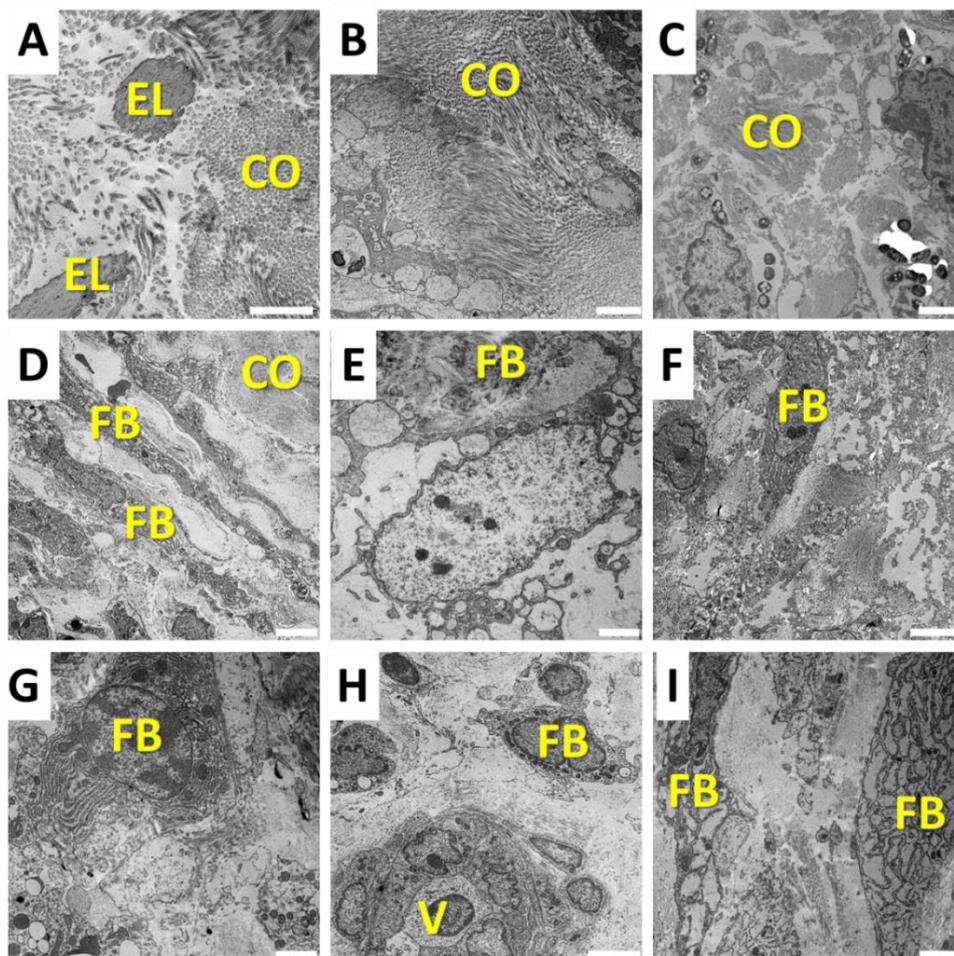


Figura 27. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de la dermis del modelo UGRSKIN implantado en pacientes. A, B y C: fibras de la matriz extracelular de la dermis; D, E, F, G, H e I: células inmersas en la matriz extracelular de la dermis; EL: fibras de elastina; CO: fibras de colágeno; FB: fibroblastos; V: vasos sanguíneos (capilares). Escala: 2 μ m.

4.3. Análisis de la dermis mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

4.3.1. Análisis de fibras de colágeno en la matriz extracelular de la dermis

Para determinar la presencia de componentes fibrilares en la matriz extracelular de la dermis de los diferentes tipos de muestras analizados en esta Tesis Doctoral, se utilizó, en primer lugar, la técnica histoquímica del rojo picrosirius con luz blanca no polarizada (Figura 28). El análisis cuantitativo de los resultados de este análisis demostró que los sustitutos de piel humana mantenidos *ex vivo* presentaron muy escasa intensidad de tinción de rojo picrosirius, con diferencias estadísticamente significativas respecto a todas las demás muestras analizadas (Tablas 15 y 16). A nivel de la dermis superficial, se comprobó que el mayor contenido en fibras de colágeno teñidas mediante esta técnica correspondía a la piel nativa control, encontrándose niveles intermedios entre las muestras *ex vivo* y el control en todas las muestras implantadas en pacientes. Sin embargo, el análisis estadístico reveló diferencias significativas entre las muestras *in vivo* de 30 y 60 días respecto al control, pero no entre las muestras *in vivo* de 90 días y el control. Las diferencias entre las muestras implantadas en pacientes durante 30, 60 y 90 días no fueron significativas. A nivel de la dermis profunda, se encontró que todas las muestras implantadas en pacientes y los controles de piel nativa presentaban niveles similares de intensidad de tinción, no existiendo diferencias significativas entre estas muestras, aunque sí con los tejidos mantenidos *ex vivo*.

En segundo lugar, se analizaron los resultados obtenidos con la tinción de rojo picrosirius utilizando luz polarizada para identificar fibras de colágeno maduras y orientadas (Figura 28 y Tablas 15 y 16). A este respecto, se encontró que las muestras mantenidas *ex vivo* mostraron señal negativa, no existiendo en estas muestras fibras de colágeno que mostrasen señal positiva con luz polarizada. La aplicación de esta técnica a la dermis superficial de las muestras implantadas en pacientes y los controles reveló resultados muy similares a los que se obtuvieron con luz polarizada, con los mayores índices de fibras positivas en los controles y en las muestras implantadas durante 90 días, sin que existieran diferencias significativas entre ambos tipos de muestras. Sin embargo, los tejidos implantados *in vivo* durante 30 y 60 días

mostraron diferencias significativas respecto al control. Por otro lado, el análisis de la dermis profunda mostró que los menores valores de fibras positivas para luz polarizada correspondían a las muestras implantadas durante 30 días, con diferencias significativas respecto al control y a las muestras de 60 y 90 días, mientras que los mayores niveles se encontraron en las muestras de 90 días, que no diferían significativamente del control, pero fueron significativamente superiores a las muestras de 60 días.

Asimismo, se cuantificó la presencia de colágeno tipo V en la dermis de los diferentes tejidos analizados en esta Tesis Doctoral. Como se muestra en la Figura 28 y las Tablas 15 y 16, los resultados revelan muy escasa intensidad de tinción en las muestras de piel artificial mantenidas *ex vivo*, con diferencias significativas con todas las demás muestras analizadas. En la dermis superficial, se encontró que los mayores niveles de expresión correspondían a las muestras implantadas en pacientes afectados de grandes quemaduras, que resultaron significativamente superiores al control de piel nativa. Asimismo, el tiempo de evolución *in vivo* se asoció a un incremento en la intensidad de señal de colágeno tipo V, con diferencias significativas entre las muestras de 30, 60 y 90 días de evolución, encontrando los mayores niveles en las muestras de 90 días. En la dermis profunda, se encontró asimismo un aumento significativo de colágeno tipo V con el tiempo de evolución, encontrando los mayores niveles de esta proteína en las muestras *in vivo* de 60 y 90 días, sin diferencias significativas entre ambos tiempos, que resultaron significativamente superiores a las muestras de 30 días y a los controles de piel humana nativa.

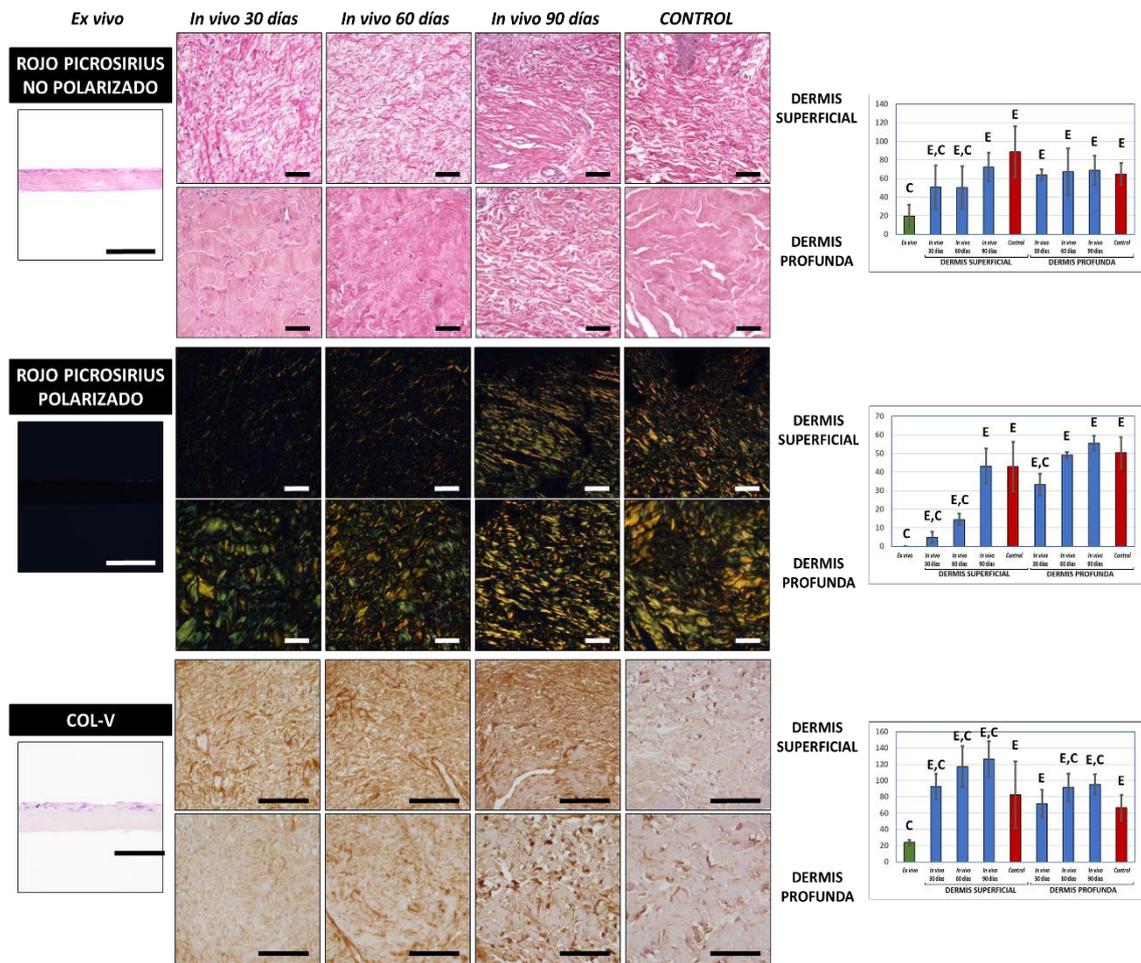


Figura 28. Análisis histoquímico de la dermis de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de fibras de colágeno a nivel de la matriz extracelular mediante la técnica de rojo picrosirius con luz blanca no polarizada y polarizada y de fibras de colágeno tipo V (COL-V) mediante inmunohistoquímica. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la intensidad de señal (rojo picrosirius con luz no polarizada y COL-V) o de la fracción de área ocupada por fibras teñidas (rojo picrosirius con luz polarizada), expresadas como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μm .

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
ROJO	Dermis		50,7±23,2	50,5±22,7	72,3±15,4	88,7±27,5
PICROSIRIUS	superficial	19,6±12,2				
(NO	Dermis		63,8±6	67,2±25,1	68,9±15,4	65±11,7
POLARIZADO)	profunda					
ROJO	Dermis		4,8±1,3	14,4±1,4	43,2±4,2	43±6
PICROSIRIUS	superficial	0±0				
(POLARIZADO)	Dermis		33,2±2,6	49,1±0,8	55,6±1,8	50,3±3,7
	profunda					
COL-V	Dermis		92,9±15,6	117,1±25,3	126,6±22,1	82,4±40,9
	superficial	23,9±3				
	Dermis		71,7±16,7	91,5±16,9	95,2±12,5	66,5±15,8
	profunda					

Tabla 15. Resultados del análisis cuantitativo para las técnicas histoquímicas de rojo picrosirius (no polarizado y polarizado) y Verhoeff y la técnica inmunohistoquímica de colágeno tipo V (COL-V) en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	ROJO PICROSIRIUS (NO POLARIZADO)		ROJO PICROSIRIUS (POLARIZADO)		COL-V	
	Dermis superficial	Dermis profunda	Dermis superficial	Dermis profunda	Dermis superficial	Dermis profunda
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	0,0052*	<0,0001*	0,0079*	0,0079*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,0005*	<0,0001*	0,0079*	0,0079*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*	<0,0001*	0,0079*	0,0079*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*	0,0079*	0,0079*	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	0,0147*	0,7394	0,0079*	0,0079*	0,0355*	0,7959
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	0,0039*	0,9118	0,0079*	0,6905	0,0147*	0,0005*
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	0,2475	0,3930	1,0000	0,5476	0,0089*	0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,1230	0,9118	0,0079*	0,0079*	0,0185*	0,0355*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,0630	0,2475	0,0079*	0,0079*	0,0005*	0,0039*
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,1903	0,6842	0,0952	0,0317*	<0,0001*	0,3930

Tabla 16. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de la técnica histoquímica de rojo picrosirius (no polarizado y polarizado) y la técnica inmunohistoquímica de colágeno tipo V (COL-V) en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

4.3.2. Análisis de fibras elásticas en la matriz extracelular de la dermis

Cuando se cuantificó la presencia de fibras elásticas en la matriz extracelular de la dermis utilizando la técnica histoquímica de Verhoeff, se encontró, de nuevo, que las muestras mantenidas en cultivo *ex vivo* presentaban muy escasa o nula presencia de fibras elásticas, mostrando valores significativamente inferiores a todas las demás muestras excepto la dermis superficial de las muestras de 30 días de evolución *in vivo*. El análisis de la dermis superficial mostró niveles de fibras elásticas comparables (diferencias no significativas) al control de piel nativa en las muestras implantadas durante 60 y 90 días. A nivel de la dermis profunda, se encontraron niveles significativamente inferiores al control en la piel artificial implantada durante 30 días, así como niveles significativamente superiores al control en la piel correspondiente a 60 y 90 días de evolución *in vivo*.

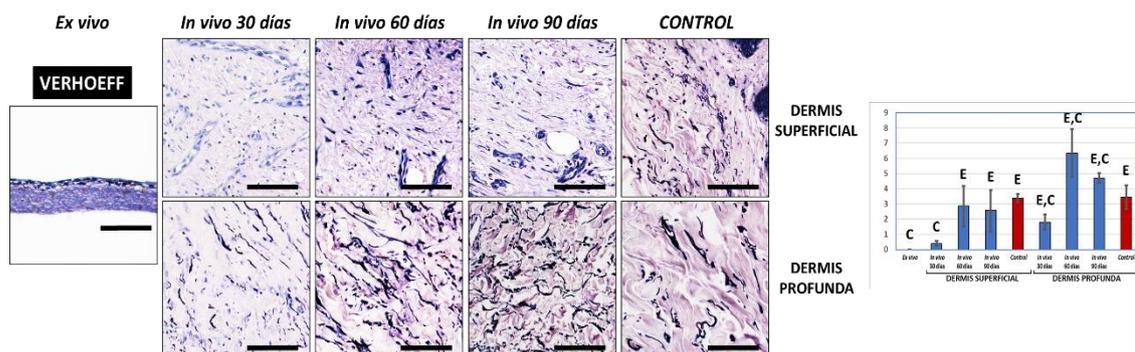


Figura 29. Análisis de la dermis de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de fibras elásticas mediante la técnica histoquímica de Verhoeff en la matriz extracelular. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la fracción de área ocupada por fibras teñidas mediante la técnica de Verhoeff, expresadas como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 µm.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
VERHOEFF	Dermis superficial	0,3±0,3	0,4±0,1	2,9±0,6	2,6±0,6	3,4±0,1
	Dermis profunda		1,8±0,2	6,4±0,7	4,7±0,1	3,5±0,3

Tabla 17. Resultados del análisis cuantitativo para la técnica histoquímica de Verhoeff en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

VERHOEFF		
	Dermis superficial	Dermis profunda
Ex vivo vs. in vivo 30 días	0,1508	0,0159*
Ex vivo vs. in vivo 60 días	0,0079*	0,0079*
Ex vivo vs. in vivo 90 días	0,0159*	0,0079*
Ex vivo vs. CONTROL	0,0079*	0,0079*
In vivo 30 días vs. CONTROL	0,0079*	0,0079*
In vivo 60 días vs. CONTROL	0,3095	0,0079*
In vivo 90 días vs. CONTROL	0,2222	0,0079*
In vivo 30 días vs. in vivo 60 días	0,0079*	0,0079*
In vivo 30 días vs. in vivo 90 días	0,1508	0,0079*
In vivo 60 días vs. in vivo 90 días	0,5476	0,0159*

Tabla 18. Valores p de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de la técnica histoquímica de Verhoeff en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

4.3.3. Análisis de proteoglicanos de la matriz extracelular de la dermis

Para la identificación global de proteoglicanos, se utilizó la técnica histoquímica de azul alcian. Los resultados revelaron la presencia de estos componentes no fibrilares de la matriz extracelular en todas las muestras analizadas, incluyendo las muestras *ex vivo*, las muestras implantadas *in vivo* y los controles. El análisis de la dermis superficial mostró los menores niveles de tinción en las muestras implantadas en pacientes durante 30 días, las cuales fueron significativamente inferiores a los tejidos mantenidos *ex vivo* y a los controles. Por el contrario, los mayores niveles se encontraron en los controles de piel normal, aunque los resultados encontrados en las muestras implantadas *in vivo* durante 60 y 90 días no difirieron estadísticamente de dichos controles. En cuanto a la dermis profunda, las muestras implantadas en pacientes durante 30 días mostraron los niveles más intensos de esta tinción histoquímica, seguidas de las muestras de 60 días. Ambas muestras fueron significativamente superiores a los tejidos artificiales mantenidos *ex vivo*, pero no a los controles de piel nativa (Figura 30 y Tablas 19 y 20).

Además, se analizó la expresión de decorina utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Como se muestra en la Figura 30 y las Tablas 19 y 20, los resultados sugieren que este proteoglicano estaba presente en todas las muestras analizadas, aunque los menores niveles se encontraron en las muestras *ex vivo*, que mostraron diferencias significativas con todas las demás muestras excepto las muestras implantadas *in vivo* durante 30 días. Curiosamente, tanto la dermis superficial como la dermis profunda de los controles de piel humana mostraron niveles de tinción inmunohistoquímica de decorina similares (diferencias no significativas) con todas las muestras implantadas en pacientes, excepto la muestra de 30 días a nivel de la dermis superficial.

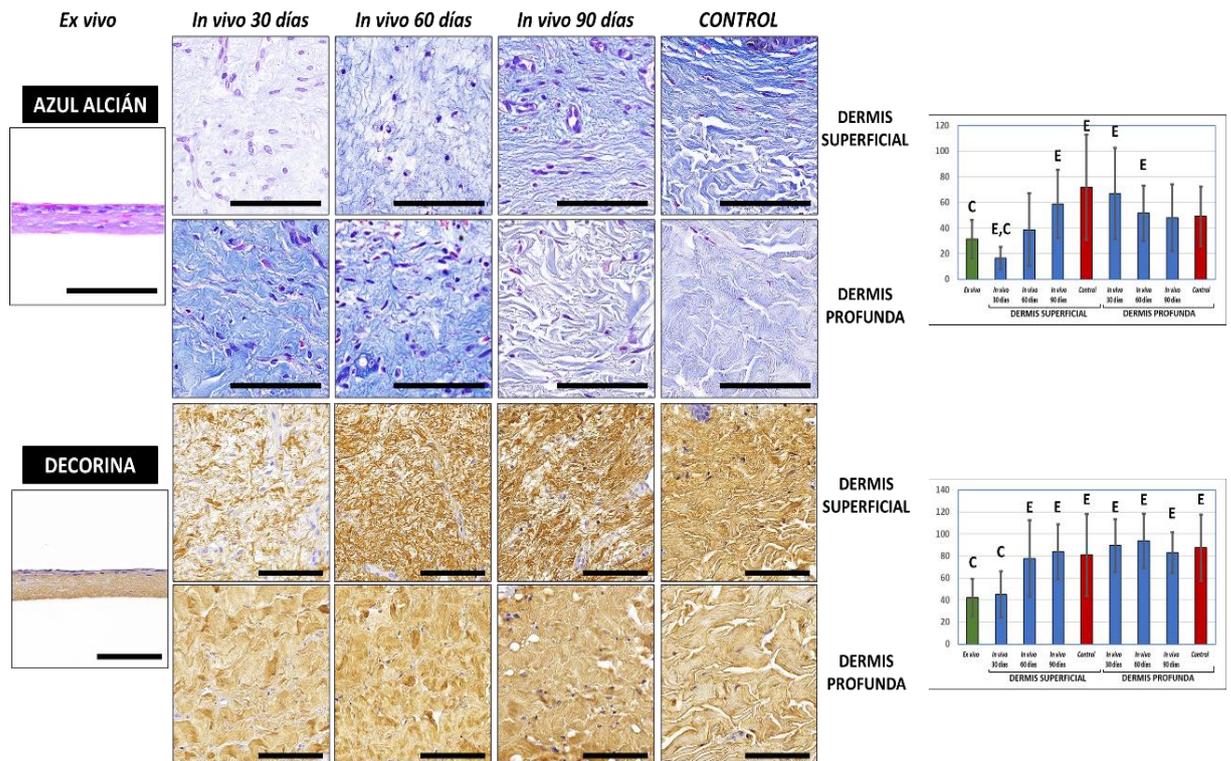


Figura 30. Análisis de la dermis de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de proteoglicanos (azul alción) a nivel de la matriz extracelular mediante histoquímica y de decorina mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación de la intensidad de señal, expresada como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μ m.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
AZUL ALCIÁN	Dermis superficial	31,3±14,8	16,6±8,7	38,6±28,4	58,9±26,8	72±41
	Dermis profunda		66,8±35,6	51,6±21,7	48,1±26	49,3±23,3
DECORINA	Dermis superficial	42,2±17,1	45±21,1	77,8±34,9	83,9±25	80,9±37,2
	Dermis profunda		89,5±24,1	93,8±24,7	82,9±18,4	87,5±30

Tabla 19. Resultados del análisis cuantitativo para la técnica histoquímica de azul alción y la técnica inmunohistoquímica para decorina en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	AZUL ALCIÁN		DECORINA	
	Dermis superficial	Dermis profunda	Dermis superficial	Dermis profunda
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	0,0288*	0,0115*	0,5787	0,0002*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,8534	0,0288*	0,0115*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,0433*	0,0753	0,0007*	0,0003*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	0,0232*	0,0630	0,0089*	0,0005*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	0,0185*	0,1431	0,0185*	0,8534
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	0,0630	0,8534	0,9705	0,5288
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	0,2799	0,9118	0,5787	0,9118
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	0,0068*	0,2475	0,0007*	0,7394
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,0892	0,1051	0,3527	0,4359
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	0,7394	0,8534	0,5288	0,5787

Tabla 20. Valores *p* de significación estadística para la comparación de los resultados cuantitativos de la técnica histoquímica de azul alción y la técnica inmunohistoquímica para decorina en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

5. Análisis de vasos sanguíneos y linfáticos en los sustitutos de piel artificial UGRSKIN

5.1. Cuantificación de vasos sanguíneos

El estudio cuantitativo del número de vasos sanguíneos positivos a CD31 existentes por unidad de área en los diferentes tejidos analizados reveló importantes diferencias entre grupos de estudio (Figura 31 y Tablas 21 y 22). Como era de esperar, la piel artificial mantenida en cultivo *ex vivo* mostró una carencia total de este tipo de estructuras, existiendo diferencias significativas con todas las demás muestras analizadas. Al analizar la dermis superficial, se encontró que todas las muestras implantadas en pacientes presentaron un número de vasos sanguíneos significativamente superior al control de piel normal, encontrando los valores más elevados en las muestras implantadas durante 90 días. El mismo patrón se encontró en la dermis profunda, existiendo diferencias significativas entre las muestras injertadas en pacientes y los controles de piel normal, aunque, en dermis profunda, se encontró un número de vasos inferior al encontrado en la dermis superficial.

Asimismo, el análisis de vasos sanguíneos de mayor calibre que mostraban señal inmunohistoquímica para SMA reveló la usencia total de estas estructuras en las muestras mantenidas *ex vivo*, con diferencias significativas respecto al resto de las muestras. Cuando se analizó la dermis superficial, se encontró un número significativamente mayor de vasos sanguíneos por unidad de área en las muestras implantadas en pacientes respecto a los controles, existiendo un número significativamente mayor en muestras implantadas durante 90 días respecto a las de 30 y 60 días de evolución. En la dermis profunda, al igual que ocurría con los vasos identificados mediante CD31, se encontró un número inferior de vasos sanguíneos, existiendo mayor cantidad de estas estructuras en las muestras implantadas en pacientes respecto al control de piel humana nativa (Figura 31 y Tablas 21 y 22).

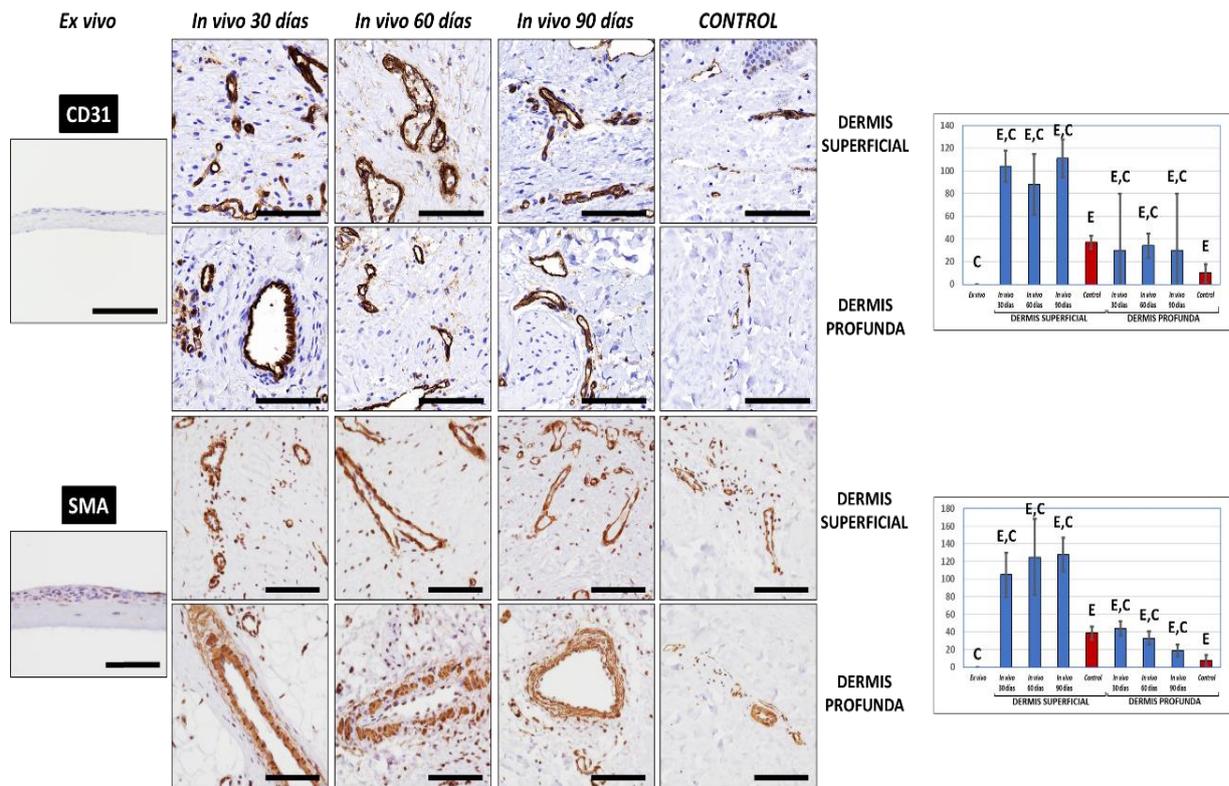


Figura 31. Análisis de la dermis de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de vasos sanguíneos que muestran reacción para la técnica inmunohistoquímica frente a CD31 y SMA. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación del número de vasos sanguíneos que muestran señal positiva por mm² de área, expresado como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 µm.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
CD31	Dermis superficial	0±0	104±12,7	88±23,1	111±15,2	37±5,9
	Dermis profunda		30±4,1	34±8,9	30±4,4	10±7
SMA	Dermis superficial	0±0	105±22,5	125±41,2	128±19	39±7
	Dermis profunda		44±7,8	33±6,2	19±5,6	8±5

Tabla 21. Resultados del análisis cuantitativo de vasos sanguíneos identificados mediante inmunohistoquímica para CD31 y SMA en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	CD31	CD31	SMA	SMA
	Dermis superficial	Dermis profunda	Dermis superficial	Dermis profunda
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 30 días	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 60 días	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ex vivo</i> vs. CONTROL	<0,0001*	0,0002*	<0,0001*	0,0002*
<i>In vivo</i> 30 días vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 60 días vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 90 días vs. CONTROL	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0001*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 60 días	<0,0001*	0,2799	<0,0001*	0,0039*
<i>In vivo</i> 30 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*	0,9705	<0,0001*	<0,0001*
<i>In vivo</i> 60 días vs. <i>in vivo</i> 90 días	<0,0001*	0,2475	<0,0001*	0,0002*

Tabla 22. Valores *p* de significación estadística para la comparación de la cuantificación de vasos sanguíneos identificados mediante inmunohistoquímica para CD31 y SMA en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

5.2. Cuantificación de vasos linfáticos

La cuantificación de vasos linfáticos en la dermis de las distintas muestras de piel artificial (Figura 32 y Tablas 23 y 24) mostró, en primer lugar, una ausencia total de este tipo de vasos en las muestras mantenidas *ex vivo*, con diferencias estadísticamente significativas con los controles y con las muestras implantadas en pacientes durante 60 y 90 días, aunque no con las muestras correspondientes a 30 días de evolución *in vivo*. A nivel de la dermis superficial, se encontró un número significativamente superior de vasos linfáticos en las muestras implantadas *in vivo* durante 90 días, mientras que las muestras de 60 días mostraron un número de vasos similar a los controles de piel nativa. A nivel de la dermis profunda, se encontró un número de vasos linfáticos similar al control (diferencias no significativas) en todas las muestras injertadas en el paciente.

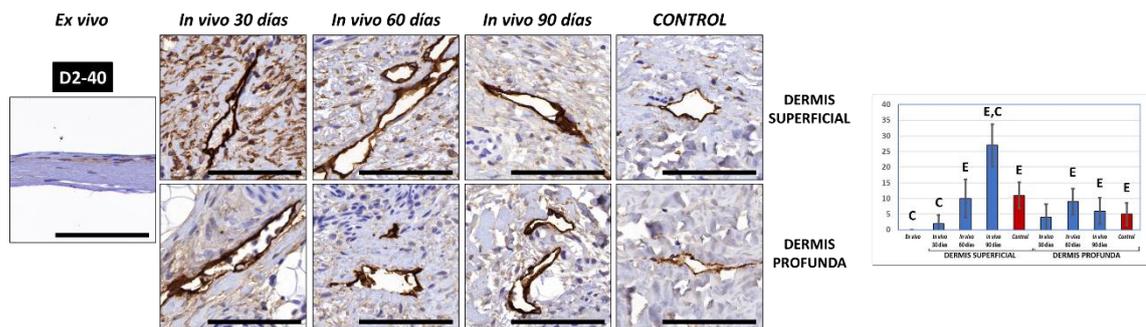


Figura 32. Análisis de la dermis de las distintas muestras de piel humana analizadas en la presente Tesis Doctoral para determinar la presencia de vasos linfáticos que muestran reacción para la técnica inmunohistoquímica frente a D2-40. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. A la derecha, se muestra un histograma con los valores obtenidos para la cuantificación del número de vasos linfáticos que muestran señal positiva por mm² de área, expresado como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con el control de piel nativa se han marcado con la letra C, mientras que las diferencias significativas respecto al modelo *ex vivo* se han señalado con la letra E. Escala: 100 μ m.

MARCADOR	CAPA	EX VIVO	In vivo 30 días	In vivo 60 días	In vivo 90 días	CONTROL
D2-40	Dermis superficial	0±0	2±2,4	10±5,5	27±5,6	11±3,8
	Dermis profunda		4±4,6	9±5,9	6±4,1	5±3,1

Tabla 23. Resultados del análisis cuantitativo de vasos linfáticos identificados mediante inmunohistoquímica para D2-40 en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los valores se expresan como medias y desviaciones típicas.

	D2-40	D2-40
	Dermis superficial	Dermis profunda
Ex vivo vs. in vivo 30 días	0,0630	0,0630
Ex vivo vs. in vivo 60 días	0,0002*	0,0002*
Ex vivo vs. in vivo 90 días	<0,0001*	0,0002*
Ex vivo vs. CONTROL	<0,0001*	0,0002*
In vivo 30 días vs. CONTROL	<0,0001*	0,5288
In vivo 60 días vs. CONTROL	0,8534	0,0892
In vivo 90 días vs. CONTROL	<0,0001*	0,7394
In vivo 30 días vs. in vivo 60 días	0,4359	0,0433*
In vivo 30 días vs. in vivo 90 días	0,0115*	0,2799
In vivo 60 días vs. in vivo 90 días	<0,0001*	0,1903

Tabla 24. Valores *p* de significación estadística para la comparación de la cuantificación de vasos linfáticos identificados mediante inmunohistoquímica para D2-40 en la dermis del sustituto de piel artificial UGRSKIN generado en laboratorio y mantenido en cultivo (*ex vivo*), la piel artificial implantada *in vivo* en pacientes durante 30, 60 y 90 días y la piel nativa humana utilizada como control. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con un asterisco (*).

6. Análisis de clasificación *cluster* de los sustitutos de piel artificial UGRSKIN

Una vez analizados los diferentes tejidos artificiales generados en esta Tesis Doctoral utilizando métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos, se procedió a clasificar las muestras utilizando los valores cuantitativos obtenidos para cada método como criterio clasificatorio. Los resultados de este análisis clasificatorio muestran dos grupos fundamentales de muestras (Figura 33). El primer grupo incluye a las muestras de piel artificial implantadas en pacientes durante 60 y 90 días en pacientes y las muestras de piel nativa control. El segundo grupo incluye las muestras implantadas durante 30 días, así como los tejidos artificiales mantenidos *ex vivo*.

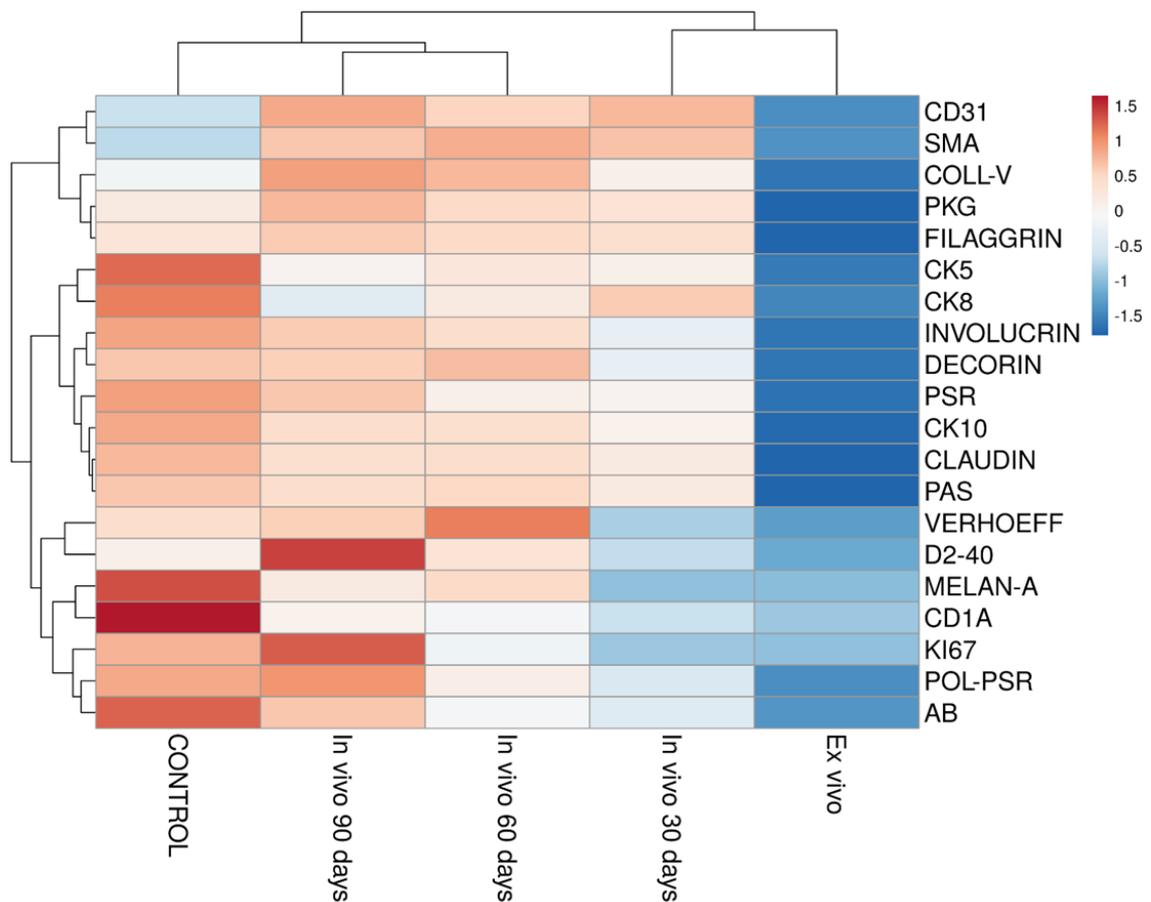


Figura 33. Clasificación de las muestras de piel artificial humana analizadas en la presente Tesis Doctoral utilizando el método *cluster* a partir de los valores medios de cuantificación de cada técnica histoquímica e inmunohistoquímica. El árbol clasificatorio mostrado en columnas corresponde a las muestras, mientras que los diferentes métodos analizados se han clasificado en filas.

DISCUSIÓN

El desarrollo de la ingeniería tisular ha permitido la generación de numerosos modelos de piel artificial en los últimos años (Oliveira et al., 2022), aunque son muy pocos los modelos que se han logrado fabricar como medicamentos de terapias avanzadas y se han aplicado en pacientes (Egea-Guerrero et al., 2019; Holmes et al., 2019; Sakamoto et al., 2023). En la presente Tesis Doctoral, se ha evaluado la efectividad de un modelo basado en biomateriales de fibrina-agarosa previamente generado en la Universidad de Granada (UGRSKIN) que mostró resultados prometedores en diversos ensayos preclínicos realizados *ex vivo* (Ionescu et al., 2020; Ruiz-López et al., 2022) e *in vivo* en animales de laboratorio (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013). Tras obtener autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, este modelo de piel artificial pudo ser generado en una sala GMP como medicamento de terapias avanzadas e implantado en pacientes afectados de graves quemaduras cutáneas (Egea-Guerrero et al., 2019).

Uno de los principales requisitos que ha de cumplir un medicamento de terapias avanzadas aplicado a pacientes es la seguridad y la garantía de que el producto está libre de efectos adversos relevantes (Cuende et al., 2021; Canceill et al., 2023). A este respecto, el biomaterial de fibrina-agarosa nanoestructurado utilizado en el modelo UGRSKIN previamente demostró niveles de bioseguridad y ausencia de efectos adversos cuando se aplicó a pacientes con lesiones corneales severas, lo cual apoya la seguridad del producto (González-Gallardo et al., 2023) y concuerda con los estudios previamente realizados a nivel preclínico (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013). En el caso de la piel artificial aplicada a grandes quemados, el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral ha contribuido a determinar parámetros de bioseguridad a nivel histológico, habiéndose demostrado que la piel implantada en pacientes estaba libre de alteraciones estructurales o ultraestructurales detectables tras 30, 60 y 90 días de evolución en el paciente.

Por otro lado, trabajos preliminares previamente publicados demostraron que el producto UGRSKIN mostraba indicios de eficacia clínica en pacientes afectados de graves quemaduras cutáneas (Egea-Guerrero et al., 2019). Aunque habrá que llevar a cabo futuros estudios para determinar la eficacia real del producto, los hallazgos histológicos descritos en la presente Tesis Doctoral apoyan la idea de que este

producto de terapias avanzadas podría contribuir a mejorar la situación clínica de los pacientes, generándose una piel estructuralmente análoga a la piel humana nativa. Aunque aún será necesario determinar los mecanismos moleculares que se asocian al efecto terapéutico de esta piel artificial, los estudios histológicos de la piel artificial implantada en pacientes que se han llevado a cabo en este trabajo contribuirán a la caracterización de este producto de terapias avanzadas y permitirán establecer acciones futuras de mejora de este medicamento.

Aunque estudios previos realizados sobre otros modelos de piel artificial incluyeron algunos estudios histológicos básicos (Momeni et al., 2019), la presente Tesis Doctoral ha realizado un estudio histológico completo que incluye análisis mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión, en el que se han determinado no sólo patrones histoestructurales, sino, además, patrones histoquímicos e inmunohistoquímicos. Esta completa caracterización a distintos niveles, realizada por primera vez en piel artificial implantada en pacientes, contribuirá a determinar la utilidad real del modelo UGRSKIN aplicado a grandes quemados. El hecho de que las biopsias de piel analizadas corresponden a diferentes tiempos de evolución (30, 60 y 90 días) de los mismos pacientes contribuye a incrementar la validez de los resultados, tal como se sugirió en trabajos previos (Vela-Romera et al., 2019).

En general, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demostraron que el modelo UGRSKIN se integró en el paciente desde el primer momento del análisis, 30 días después de su implante, a pesar de que la integración completa requirió mayores tiempos de evolución *in vivo*. A nivel epitelial, las muestras de tejido implantado en pacientes durante distintos tiempos de evolución mostraron patrones de diferenciación epidérmica identificables mediante microscopía óptica y electrónica muy similares al control de piel humana nativa desde el primer momento, lo cual sugiere que la diferenciación de este estrato de la piel ocurre muy rápidamente tras el implante *in vivo*, aunque la piel injertada carecía de cierto tipo de especializaciones como glándulas, folículos o crestas y papilas, tal como se describió en la piel artificial implantada en animales de laboratorio (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013).

De hecho, la epidermis de la piel implantada mostró desde el inicio diferenciación en los típicos estratos de la piel humana (estratos basal, espinoso, granuloso y córneo) (Freeman y Sonthalia, 2023), lo cual revela un rápido proceso de biointegración en el paciente, a pesar de que la piel artificial generada en laboratorio carecía de estos patrones de diferenciación. Además, el análisis ultraestructural de la piel implantada en pacientes mostró patrones de diferenciación histológica en cada uno de los estratos del epitelio que resultaron altamente biomiméticos respecto a la piel humana normal, con la presencia de células ortotípicas en cada uno de los estratos. Estudios previos demostraron que la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada mantenida en cultivo *ex vivo* presentaba muy escasos niveles de diferenciación histológica, aunque el implante *in vivo* en animales de experimentación fue capaz de inducir la diferenciación terminal del epitelio y la formación de los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013; Cases-Perera et al., 2022). Al igual que en los mencionados estudios realizados a nivel preclínico, la diferenciación completa de la epidermis ocurre muy rápidamente tras el implante *in vivo*, probablemente debido al efecto de numerosos factores inductores de tipo paracrino liberados por el tejido receptor (Xu et al., 2017; Martin-Piedra et al., 2019).

Para caracterizar el estrato epitelial de los sustitutos de piel artificial generados en la presente Tesis Doctoral, se realizaron estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales para identificar diversos marcadores de los queratinocitos de la epidermis humana y predecir la posible función de barrera protectora de este estrato epitelial (de Szalay y Wertz, 2023).

En primer lugar, se analizó la presencia de varias citoqueratinas en el epitelio de la piel artificial y en los controles de piel humana. Los resultados mostraron la ausencia de expresión de citoqueratina CK8 en todas las muestras analizadas en el presente estudio. Estos resultados coinciden con trabajos previos que demuestran que esta proteína únicamente se expresa en epitelios simples (Garzon et al., 2009; Garzón et al., 2009; Jacob et al., 2018), siendo negativa en la piel humana normal (Oshima et al., 1996). El hecho de que no existiera expresión de CK8 en las muestras implantadas en pacientes es consistente con un patrón de diferenciación normal de la piel

artificial, ya que esta citoqueratina se ha descrito sobreexpresada en ciertos tipos de cáncer (Lim y Ku, 2021, 8).

Por otro lado, se analizó la expresión de CK10, una citoqueratina de tipo I que se encuentra típicamente expresada en piel humana y es marcador de diferenciación terminal, queratinización y cornificación (Uhlig et al., 2022). Al considerarse un marcador de diferenciación terminal del epitelio de la piel humana, la presencia de CK10 constituye un elemento clave en la diferenciación funcional de la piel artificial (Subramaniam et al., 2022). Como era de esperar, esta citoqueratina no se encontró expresada en la piel artificial mantenida en cultivo, debido a los escasos niveles de diferenciación celular que muestran típicamente los tejidos mantenidos *ex vivo* (Blanco-Elices et al., 2023). Sin embargo, el implante en pacientes logró aumentar significativamente los niveles de expresión de CK10 hasta alcanzar niveles comparables a la piel nativa normal a partir del día 60 de evolución en el paciente. Curiosamente, las muestras de piel artificial implantadas en pacientes durante tiempos más cortos (30 días) mostraron niveles significativamente menores de expresión de esta citoqueratina, lo cual sugiere que estas muestras, que presentan un epitelio estructuralmente análogo a la epidermis normal, aún podrían ser funcionalmente inmaduras. Estos resultados coinciden con análisis previos realizados a nivel preclínico, en los que se demostró que la piel artificial de fibrina-agarosa implantada en animales de experimentación requiere al menos 30-40 días de evolución *in vivo* para expresar niveles apreciables de CK10 y de CK1, citoqueratina que se asocia a CK10 constituyendo una pareja a nivel funcional (Carriel et al., 2012). Asimismo, el mismo grupo de investigación que diseñó el modelo UGRSKIN demostró resultados similares en un modelo de mucosa oral generado por ingeniería tisular utilizando los mismos biomateriales de fibrina-agarosa (Garzón et al., 2009).

Además, los diferentes tejidos generados mediante ingeniería tisular fueron evaluados para detectar la expresión de CK5. Esta citoqueratina está normalmente expresada en células que proliferan activamente, tal como las células del estrato basal de la piel humana normal, por lo que su expresión puede utilizarse como marcador de proliferación celular (Peschen et al., 1997; Boecker y Buerger, 2003). De hecho, CK5 se considera un marcador de células madre de numerosos tipos de

epitelio (Sanz Ressel et al., 2021). En nuestro caso, se encontró que todas las muestras presentaban expresión de CK5, incluyendo la piel artificial mantenida *ex vivo*. Estos resultados confirman la idea de que las células mantenidas en cultivo, que mantienen pobres niveles de diferenciación celular, son capaces de proliferar en contacto con el biomaterial, como ya se demostró para otros tipos de tejidos artificiales (Garzón et al., 2009; Rodríguez et al., 2013; Chato-Astrain et al., 2020). Tras implantarla en pacientes, la piel artificial fue capaz de incrementar sus niveles de expresión de CK5 hasta alcanzar niveles comparables al control de piel nativa desde el día 30 de evolución, sugiriendo que, desde el punto de vista de esta citoqueratina, y a diferencia de CK10, la piel artificial fue capaz de madurar funcionalmente desde el principio. Al considerarse un marcador del estrato basal de la piel (Rollins-Raval et al., 2011), la expresión de CK5 en la piel implantada en pacientes se considera un requisito fundamental de las terapias basadas en tejidos artificiales, pues la piel injertada debe ser capaz de autorregenerarse y autorrenovarse una vez integrada en el paciente, y esta función, en el caso de la piel, depende de las células madre del estrato basal de la epidermis (Yang et al., 2020; Mannino et al., 2022). Al expresar CK5, las células madre de la piel demuestran su capacidad para proliferar y autorrenovarse y, por tanto, para mantener la homeostasis y la regeneración de la piel injertada (Mannino et al., 2022), lo cual apoya la utilidad clínica del modelo UGRSKIN.

Para confirmar la capacidad de proliferación de las células de la piel artificial, se realizaron pruebas de inmunohistoquímica utilizando el marcador de proliferación Ki67. Esta proteína es considerada como uno de los principales marcadores de proliferación celular, y puede utilizarse para detectar células con capacidad de división en todo tipo de tejidos humanos (Lashen et al., 2023). En concordancia con los resultados encontrados para CK5, Ki67 resultó positiva tanto en la piel artificial mantenida *ex vivo* como en la piel implantada en pacientes, así como en los controles, mostrando expresión fundamentalmente en las células del estrato basal de la epidermis, tal como se ha descrito para la piel normal (Vidor et al., 2018). De hecho, la piel humana muestra altos niveles de proliferación únicamente a nivel de las unidades proliferativas epidérmicas localizadas en el estrato basal (Senoo, 2013). De

nuevo, estos resultados sugieren que los tejidos mantenidos en cultivo muestran capacidad de proliferación activa, y que una vez implantados en el paciente, los sustitutos de piel humana mantienen su capacidad de proliferación y, por tanto, de regeneración. Sin embargo, y a diferencia de CK5, los resultados obtenidos para Ki67 sugieren que los niveles de proliferación celular de la piel humana injertada en pacientes son inferiores a los de la piel nativa control en los días 30 y 60 de evolución, alcanzándose los niveles del control únicamente en el día 90. Aunque futuros estudios tendrán que determinar si la capacidad regenerativa de la piel es plena a los días 30 y 60, estos resultados confirman la funcionalidad de la piel injertada y su biomimetismo respecto a la piel humana nativa utilizada como control a partir del día 90 de seguimiento.

Por otra parte, y tras evaluar la expresión de diferentes citoqueratinas, se analizó la diferenciación epidérmica mediante la identificación de uniones intercelulares entre los queratinocitos del epitelio de la piel artificial. De este modo, se pudo comprobar que los tejidos mantenidos *ex vivo* mostraban muy escasos niveles de cohesión intercelular, existiendo escasa expresión de claudina 1 y placoglobina, proteínas implicadas en la formación de uniones célula-célula en los epitelios bien diferenciados (Lai-Cheong et al., 2007). En concreto, las claudinas, junto con las ocludinas y otras proteínas de unión, forman parte intrínseca de las uniones estrechas o *zonula occludens*, responsables de unir fuertemente dos células epiteliales adyacentes para evitar la pérdida de agua y formar una barrera protectora impermeable (Saito et al., 2023), además de regular la proliferación celular (Kuo et al., 2022). Por ello, la formación de uniones intercelulares de tipo estrecho es fundamental para garantizar la función de barrera de la piel humana normal (Katsarou et al., 2023). Por su parte, la placobina es una proteína fundamental de las uniones adherentes tipo desmosoma, las cuales son las principales responsables de unir los queratinocitos a nivel epidérmico, manteniendo la integridad estructural del epitelio de la piel y permitiendo a dicho epitelio soportar las fuerzas a las que éste está sometido (Stokes, 2007; Al-Jassar et al., 2013).

La escasa presencia de ambas proteínas en la piel artificial mantenida en cultivo vuelve a confirmar los bajos niveles de diferenciación de estos tejidos, tal como se demostró previamente en otros tejidos artificiales fabricados con el mismo biomaterial, que requirieron largos periodos de tiempo en cultivo para mostrar expresión de proteínas relacionadas con cohesión intercelular (González-Andrades et al., 2009). A su vez, la piel artificial injertada en pacientes sí mostró elevados niveles de expresión de claudina 1 y placoglobina desde el primer momento, alcanzando niveles comparables al control en todos los tiempos analizados (30, 60 y 90 días), lo que vuelve a apoyar la idea de que la piel artificial tiende a integrarse de manera muy rápida, mostrando funcionalidad de barrera protectora desde los primeros momentos. Estos resultados están en línea con los hallazgos del estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, en el que se encontraron abundantes uniones intercelulares en las muestras implantadas en el paciente, sin que se pudiesen apreciar diferencias entre los distintos tiempos de evolución post-injerto. Así, se comprobó que las células del estrato basal poseían abundantes uniones célula-célula (fundamentalmente, desmosomas) y célula-membrana basal (fundamentalmente, hemidesmosomas), mientras que los queratinocitos del estrato espinoso mostraban abundantes espinas que contenían numerosos desmosomas ultraestructuralmente bien formados, y las células del estrato granuloso estaban, asimismo, unidas por numerosas uniones intercelulares.

Dos de las proteínas más importantes implicadas en la función de barrera protectora de la epidermis son la filagrina y la involucrina, proteínas altamente presentes en la epidermis madura, que pueden considerarse como marcadores de diferenciación terminal de la piel (Furue, 2020). La filagrina es capaz de asociarse con las citoqueratinas del citoesqueleto de los queratinocitos de la piel durante la diferenciación terminal de estas células, mientras que la involucrina está implicada en la formación de una capa córnea impermeable (Presland y Dale, 2000). Los análisis realizados sobre los distintos modelos de piel artificial generados en esta Tesis Doctoral revelaron la presencia de ambos tipos de proteínas en las muestras implantadas en pacientes durante 60 y 90 días, en niveles similares a los del control. Sin embargo, tanto las muestras mantenidas *ex vivo* como las muestras injertadas

durante 30 días mostraron cantidades inferiores de filagrina e involucrina que el control, lo cual apoya de nuevo la idea de que la piel artificial generada en laboratorio como producto de terapias avanzadas presenta inicialmente bajos niveles de diferenciación celular (Carriel et al., 2012), requiriendo su implante *in vivo* para alcanzar patrones de diferenciación comparables a la epidermis humana normal. Tal como se demostró previamente en tejidos artificiales implantados en animales de laboratorio, el tiempo de evolución una vez implantados *in vivo* es un factor fundamental, y la mayoría de los tejidos requieren varias semanas de evolución para madurar y diferenciarse (Martin-Piedra et al., 2019; Garzón et al., 2020; Blanco-Elices et al., 2023). De nuevo, estos resultados sugieren que la epidermis generada en los sustitutos de piel humana fabricados mediante ingeniería tisular presenta patrones de diferenciación similares a los controles, con elevada expresión de filagrina e involucrina a partir de 60 días del injerto. Aunque habrá que llevar a cabo estudios de tipo funcional, la presencia de estos componentes fundamentales de la epidermis sugiere que la capa epitelial de la piel artificial generada en laboratorio podría funcionar eficazmente, formando una barrera protectora similar a la de la piel humana nativa (Shah et al., 2023).

Estos resultados pudieron, además, confirmarse a nivel ultraestructural. A este respecto, los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión mostraron patrones de diferenciación terminal compatibles con una piel normal en todas las muestras implantadas en pacientes. Por un lado, los análisis del estrato córneo revelaron la presencia de numerosas capas de células planas, de aspecto escamoso, que habían perdido el núcleo celular, compatibles con corneocitos que contenían numerosas proteínas altamente compactadas en su interior, tal como ocurre en la piel humana nativa (Candi et al., 2005; Lefèvre-Utile et al., 2021). Además, el estrato granuloso mostró abundantes gránulos constituidos, muy probablemente, por queratohialina, queratinas, filagrina, involucrina y otras proteínas relacionadas con diferenciación queratinocítica (Furue, 2020). Estos hallazgos confirman la idea de que la piel implantada en pacientes experimenta un rápido proceso de diferenciación, asimismo, a nivel ultraestructural, y coincidirían con trabajos previos que sugieren

que la piel artificial se integra muy rápidamente en el receptor, mostrando una plena integración dos semanas después del injerto (Momeni et al., 2019).

Un aspecto muy importante en la caracterización de la epidermis es la identificación y cuantificación de diversos tipos celulares que juegan un papel fundamental en la piel humana, tales como los melanocitos y las células de Langerhans, entre otras (Passeron et al., 2007; Boulais y Misery, 2008). En nuestro caso, se comprobó que la piel generada en laboratorio y mantenida en cultivo carecía de este tipo de células, lo cual podría explicarse por el hecho de que en su fabricación se utilizaron únicamente cultivos de fibroblastos (para la dermis) y cultivos de queratinocitos (para la epidermis). Curiosamente, la piel artificial humana implantada en pacientes grandes quemados mostró cierto número de melanocitos y células de Langerhans ya desde el primer momento (día 30), aunque en cantidades aún muy reducidas, especialmente en lo que se refiere a los melanocitos. Sin embargo, la presencia de ambos tipos celulares se incrementó en los días 60 y 90, aunque en ninguno de estos tiempos se logró alcanzar el número de melanocitos y células de Langerhans de la epidermis humana control.

Diversos autores demostraron previamente que la mayor parte de los sustitutos de piel artificial previamente diseñados en laboratorio carecían de melanocitos, siendo ésta una de las principales causas de que la piel implantada en pacientes muestre normalmente signos de hipopigmentación e hipersensibilidad a la exposición solar (Boyce et al., 2020). Por ello, algunos autores han logrado generar modelos de piel artificial que incluyen cultivos primarios de melanocitos, demostrando que estos sustitutos de piel presentaban mayores tasas de pigmentación y coloración más biomimética respecto a la piel humana normal (Biedermann et al., 2015b; Klar et al., 2017; Supp et al., 2020). En cualquier caso, es muy probable que los sustitutos de piel implantados en el paciente sean capaces de ser colonizados por melanocitos del huésped, generándose progresivamente, una piel con mayor contenido en este tipo de células, como se ha demostrado para las células de Langerhans (Hafemann et al., 1999), aunque es probable que nunca se llegue a alcanzar el número de células de la piel normal (Ungureanu et al., 2014).

Respecto a las células de Langerhans, su papel como células presentadoras de antígenos resulta crucial para mantener la homeostasis y la función inmune de la epidermis humana (de Jong y Ogg, 2021). De hecho, estas células forman parte de la primera línea de defensa frente a bacterias y otros patógenos, por lo que su presencia en la piel humana se considera fundamental (Yan et al., 2020; Bellmann et al., 2021). Al igual que ocurría en el caso de los melanocitos, las células de Langerhans tendieron a aumentar su presencia en la piel artificial UGRSKIN implantada en pacientes durante tiempos progresivamente más prolongados. De nuevo, es probable que estas células provengan, en su mayor parte, del receptor, migrando paulatinamente hacia la piel implantada (Hafemann et al., 1999). Para facilitar este proceso, algunos autores sugieren la necesidad de cultivar este tipo de células y de incorporarlas al epitelio de la piel artificial generada en laboratorio como producto de terapias avanzadas (Bechetoille et al., 2007).

En suma, los resultados obtenidos tras el implante *in vivo* del modelo UGRSKIN revelan, a nivel epitelial, un rápido proceso de diferenciación celular, con la rápida formación de una barrera epidérmica protectora en el paciente. Aunque esta piel aún presenta ciertos niveles de indiferenciación, especialmente en el día 30 post-implante, nuestros hallazgos estructurales y funcionales sugieren que esta piel artificial podría ser plenamente funcional, compartiendo altos niveles de biomimetismo respecto de la piel normal, en el día 60 y, especialmente, en el día 90 tras su implante en el paciente, lo cual contribuiría a explicar los positivos resultados clínicos obtenidos con este modelo de piel (Egea-Guerrero et al., 2019). Estos resultados concuerdan con el análisis clasificatorio de tipo *cluster* llevado a cabo a partir de los datos obtenidos a nivel del epitelio, pero también a nivel de la membrana basal, la dermis y los vasos sanguíneos y linfáticos, que demuestran la similitud histofuncional de las muestras inmaduras mantenidas *ex vivo* y los tejidos implantados *in vivo* durante 30 días, mientras que las muestras de piel nativa control serían similares a los tejidos implantados en pacientes durante 60 y 90 días.

Una vez evaluada la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, se procedió a caracterizar la unión dermo-epidérmica, como parte de la caracterización integral de estos tejidos artificiales utilizados como medicamentos de terapias avanzadas. La

unión dermo-epidérmica juega un papel fundamental en la fisiología de la piel humana (Aumailley y Rousselle, 1999), y su presencia es necesaria para la homeostasis tanto del epitelio como del tejido conectivo subyacente. Desde un punto de vista estructural, la unión dermo-epidérmica presenta, en condiciones normales, una morfología festoneada, con abundantes entrantes y salientes denominados crestas y papilas, que contribuyen a aumentar la superficie de contacto entre el epitelio y el estroma (Ross y Pawlina, 2007; Shen et al., 2023), y presenta una estructura bien diferenciada llamada membrana basal entre ambas capas (Chan, 1997).

Por un lado, las crestas epidérmicas y las papilas dérmicas juegan un papel primordial en el mantenimiento de las propiedades biomecánicas de los epitelios sometidos a intensas fuerzas (Xiong et al., 2013), aumentando significativamente el área que comparten la dermis y la epidermis (Ross y Pawlina, 2007). Al presentar una morfología ondulada, las crestas y papilas aumentan de manera notable la superficie de contacto entre epitelio y estroma, reforzando la adhesión del primero al segundo y permitiendo a la piel resistir grandes fuerzas incidentes (Xiong et al., 2013). Además, se ha demostrado que la presencia de estas estructuras contribuye a la homeostasis del epitelio (Shen et al., 2023). En la piel humana, las lesiones que superan la capacidad de regeneración de la piel normal y son reparadas mediante un tejido fibrótico similar a una cicatriz, se caracterizan, en general, por carecer de crestas y papilas (Borrelli et al., 2021). A pesar de su importancia, la mayor parte de los modelos actualmente disponibles de piel artificial generada por ingeniería tisular carecen de crestas y papilas, presentando una unión dermo-epidérmica plana, aunque recientemente se han desarrollado algunos modelos capaces de mejorar la morfología de esta unión (Blackstone et al., 2020).

En el caso de la piel UGRSKIN, nuestros análisis mostraron la ausencia de crestas y papilas en los tejidos artificiales mantenidos *ex vivo*, tal como se describió para la mayoría de los modelos de piel artificial previamente desarrollados (Raghunath y Meuli, 1997; Llames et al., 2004; Chiu et al., 2023). Curiosamente, cuando el modelo UGRSKIN se implantó en pacientes, se comprobó la ausencia de crestas y papilas, formándose una piel que difería de la piel nativa en cuanto a la morfología de la unión

dermo-epidérmica, tal como se encontró durante la evaluación preclínica del producto implantado en animales de laboratorio (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013; Ruiz-López et al., 2022). A pesar de la incapacidad de este modelo para reproducir la morfología de la unión dermo-epidérmica de la piel nativa, la piel implantada en pacientes fue capaz de desarrollar una epidermis y una dermis de características estructurales similares a los de la piel nativa. Futuros estudios realizados a largo plazo deberán determinar si la falta de crestas y papilas puede afectar a la fisiología de la piel implantada en grandes quemados y si las características biomecánicas de esta piel son o no similares a las de la piel nativa. Asimismo, la aplicación de fuerzas de tracción y compresión durante el desarrollo y la maduración de la piel, podrían contribuir a la formación de estas importantes estructuras a nivel de la unión dermo-epidérmica (Roig-Rosello y Rousselle, 2020).

La falta de especializaciones de la unión dermo-epidérmica en forma de crestas y papilas podría contribuir a explicar la escasez de células no queratinocíticas que se encontraron en el modelo UGRSKIN implantado en pacientes. De hecho, trabajos previos demostraron que estas células, especialmente los melanocitos, son mucho más abundantes a nivel de las crestas epidérmicas que en otras zonas del epitelio, lo cual sugiere una interrelación entre dichas crestas y la correcta fisiología de los melanocitos (Hirobe et al., 2021).

Por otro lado, el desarrollo de una membrana basal plenamente funcional es un requisito de todos los epitelios, pues esta estructura es la encargada de anclar el epitelio al estroma subyacente y de establecer una barrera de intercambio de nutrientes y factores tróficos que son necesarios para las células epiteliales (Rousselle et al., 2022). La membrana basal es una estructura plana cuya función principal es anclar el epitelio al tejido conectivo subyacente (Breitkreutz et al., 2009). A nivel estructural y ultraestructural, la membrana basal se compone de una lámina basal y una lámina reticular (Gómez de Ferraris y Campos, 2019). A su vez, la lámina basal está constituida por una lámina densa y una lámina lúcida, mientras que la lámina reticular consta fundamentalmente de fibras de colágeno firmemente ancladas al tejido conectivo (Merker, 1994; Chan, 1997). En la presente Tesis Doctoral, se comprobó que todos los tejidos implantados en pacientes presentaban una

membrana basal bien conformada desde el inicio, 30 días después del injerto, sin que se identificaran diferencias ultraestructurales entre las muestras de 30, 60 y 90 días de evolución, presentando lámina lúcida, lámina densa y lámina reticular en todas estas muestras. En línea con los hallazgos encontrados a nivel del epitelio, estos resultados apoyan la idea de que la piel artificial presentaba gran capacidad de biointegración *in vivo* desde los primeros momentos de su implante, desarrollándose estructuras fundamentales para la homeostasis epitelial, como es el caso de la membrana basal, desde los primeros momentos. Como se ha demostrado previamente, la formación de una membrana basal plenamente funcional es un requisito fundamental para que el desarrollo del epitelio ocurra de forma adecuada en diferentes modelos de tejido artificial generado mediante ingeniería tisular (Segal et al., 2008).

La composición química de la membrana basal es compleja, existiendo numerosas proteínas, proteoglicanos y glicoproteínas, por lo que esta estructura puede identificarse fácilmente utilizando técnicas histoquímicas capaces de reconocer estos componentes, como es el caso del PAS (Folberg et al., 2000; Sood et al., 2015). En nuestro caso, se comprobó que la piel injertada en pacientes presentaba una lámina basal teñida mediante el método del PAS, que se asemejaba estructuralmente a la de la piel nativa, a pesar de que esta estructura estaba ausente de los tejidos artificiales mantenidos en cultivo *ex vivo*. Estos hallazgos vuelven a coincidir con los resultados previamente expuestos e implican un rápido proceso de maduración y diferenciación de la piel artificial una vez implantada en pacientes.

Otra de las principales capas de la piel humana es la dermis (Brown y Krishnamurthy, 2023). La dermis está constituida, fundamentalmente, por una población de células estromales, en su mayoría, fibroblastos, inmersos en una densa matriz extracelular (Ross y Pawlina, 2007). Entre sus múltiples funciones, destaca la de servir como asiento del epitelio, aportando nutrientes e intercambiando importantes sustancias y factores con éste, a través de la membrana basal, induciendo el desarrollo y la diferenciación de la epidermis suprayacente (Foraster y Ferrandiz, 2001; Shin et al., 2019). De hecho, se ha demostrado que un correcto desarrollo de la dermis es fundamental para que la epidermis pueda asimismo desarrollarse y diferenciarse

normalmente, tanto en la piel nativa (Galbraith, 2010), como en sustitutos tisulares generados mediante ingeniería tisular (Rakhorst et al., 2006). A este respecto, se ha demostrado que el desarrollo del sustituto dérmico artificial juega un importante papel regulando la función de las células del epitelio de los tejidos artificiales, incluyendo tanto las citoqueratinas, como las células no queratinocíticas como los melanocitos (Biedermann et al., 2015a).

Como era de esperar, el análisis histológico del modelo UGRSKIN mantenido *ex vivo* reveló la presencia de un sustituto dérmico regular y homogéneo, formado por una población celular de fibroblastos inmersos en una matriz extracelular fibrilar, tal como se demostró previamente en varios tipos de sustitutos tisulares basados en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados (González-Andrades et al., 2009; Rodríguez et al., 2013; Jaimes-Parra et al., 2016; Chato-Astrain et al., 2020; Garzón et al., 2020). Sin embargo, el implante *in vivo* en pacientes afectados de graves quemaduras se asoció a una importante modificación de la dermis, la cual modificó significativamente su estructura, siendo capaz de reproducir la histología de la dermis nativa, al menos parcialmente. De hecho, las fibras de fibrina asociadas a cadenas de agarosa fueron rápidamente reemplazadas por una densa matriz extracelular que contenía abundantes haces fibrilares compatibles con la presencia de colágeno maduro, como asimismo se demostró en los estudios *in vivo* realizados en animales de laboratorio previamente a su implante en pacientes (Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013). Al igual que en la epidermis, estos hallazgos son compatibles con un rápido proceso de biointegración de la dermis artificial implantada en pacientes.

A pesar de mostrar una estructura compatible con una dermis nativa, la piel artificial implantada en pacientes reveló la presencia de dos tipos de tejido estructuralmente diferentes (una dermis superficial y una dermis profunda), estando ambas separadas por una interfase, especialmente en el día 30 de evolución. Muy probablemente, estos dos tipos de dermis corresponden, respectivamente, a la piel injertada (dermis superficial) y al remanente de piel del paciente (dermis profunda), que actuó como lecho hospedador de la piel artificial. El hecho de que la zona de interfase tendió a desaparecer y a hacerse menos evidente con el tiempo de evolución, así como la progresiva similitud que alcanzó la dermis superficial respecto a la profunda en los

sucesivos momentos del análisis (30, 60 y 90 días) sugieren que la piel artificial injertada, a pesar de integrarse muy rápidamente, aún requirió varias semanas para su plena maduración y diferenciación. Sin embargo, como se discutió más arriba, la dermis implantada no fue capaz de generar en ningún momento especializaciones de la unión dermo-epitelial del tipo crestas y papilas, como sí fue el caso de la piel nativa.

Para caracterizar histológicamente la dermis de los sustitutos UGRSKIN, en la presente Tesis Doctoral se realizó un estudio histoquímico e inmunohistoquímico de la matriz extracelular de dicho estrato de la piel. La matriz extracelular de los tejidos conectivos constituye una estructura dinámica y altamente funcional que rodea a las células, los vasos sanguíneos y linfáticos, los nervios y otras estructuras que aparecen inmersas en dichos tejidos (Huang et al., 2022). El papel de la matriz extracelular en la fisiología de la dermis es fundamental, ya que esta estructura participa en la regulación de numerosas funciones biológicas, incluyendo la adhesión celular, proliferación, diferenciación, migración, nutrición e intercambio de sustancias, entre otras (Tracy et al., 2016; Nyström y Bruckner-Tuderman, 2019). Por ese motivo, una adecuada caracterización de la matriz extracelular es uno de los requerimientos de los tejidos generados mediante ingeniería tisular y debe formar parte del control de calidad de estos tejidos (Carriel et al., 2014).

En primer lugar, la matriz extracelular de los tejidos humanos está constituida por un abundante componente fibrilar que contiene, fundamentalmente, fibras de colágeno y fibras elásticas, siendo menos abundantes, otros tipos fibrilares (Ross y Pawlina, 2007). La presencia de estas fibras confiere la mayor parte de las propiedades biomecánicas de la piel, destacando su resistencia a las fuerzas que inciden sobre ésta, así como su elasticidad y su capacidad de resiliencia (Hsu et al., 2018; Shin et al., 2019). Por tal motivo, su presencia y su adecuado desarrollo son requerimientos básicos para obtener una piel plenamente funcional.

De entre todos los componentes fibrilares, las fibras de colágeno suponen el mayor porcentaje de fibras en la dermis humana, siendo uno de las estructuras más abundantes del cuerpo humano (Ross y Pawlina, 2007; Welsch, 2008). El colágeno es considerado como el principal biopolímero de nuestro organismo, siendo el principal responsable, junto con otras moléculas, de la resistencia mecánica de nuestros

tejidos (Sherman et al., 2015). Cuando se analizó la presencia de fibras maduras de colágeno en la piel artificial utilizando la técnica del rojo picosirius, se encontró, como era de esperar, muy escasa señal en los tejidos mantenidos *ex vivo*, tal como se demostró previamente para diversos tipos de tejidos de fibrina-agarosa mantenidos en cultivo (Carriel et al., 2014; Garzón et al., 2021; Blanco-Elices et al., 2023). Probablemente, el mantenimiento en cultivo de los tejidos artificiales podría suponer un aumento en la síntesis de fibras de colágeno, como se sugirió previamente (Ionescu et al., 2011), aunque el pleno desarrollo de este tipo de estructuras requiere, en la mayoría de los casos, la presencia de moléculas inductoras que únicamente están presentes tras su implante *in vivo* (Garzon et al., 2009; Garzón et al., 2009; Carriel et al., 2012). En cuanto a la piel artificial implantada en pacientes, el presente estudio reveló la rápida síntesis de fibras de colágeno, evidenciables tanto mediante microscopía óptica como mediante microscopía electrónica de transmisión, desde el día 30 de evolución *in vivo*. A nivel ultraestructural, se comprobó que todas las muestras *in vivo* analizadas presentaban abundantes fibras maduras de colágeno, así como numerosas células de aspecto fibroblástico que serían las responsables de la síntesis y la remodelación de estas fibras (Ross y Pawlina, 2007; Gómez de Ferraris y Campos, 2019). A nivel estructural, el análisis mediante microscopía óptica de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina mostró la presencia de gruesos haces de fibras, compatibles con colágeno maduro, en la dermis profunda, aunque estos gruesos haces resultaron muy escasos a nivel de la dermis superficial, donde las fibras eran más delgadas y menos abundantes. La similitud de este patrón histoarquitectural con los controles de piel humana nativa apoya la idea de que la dermis de la piel artificial tendió a integrarse y a madurar rápidamente, una vez implantada en el paciente, tal como ocurrió en el caso de la epidermis y de la membrana basal.

Para cuantificar la presencia de fibras de colágeno, se utilizó la técnica histoquímica de rojo picosirius (Carriel et al., 2017a). En general, nuestros resultados muestran, una vez más, que el implante *in vivo* se asoció a un incremento en la síntesis de componentes clave de la matriz extracelular respecto a los tejidos mantenidos *ex vivo*. Por una parte, se comprobó el efecto del tiempo de evolución *in vivo* sobre la

síntesis de fibras de colágeno a nivel de la dermis superficial, alcanzándose los niveles del control de piel nativa únicamente a los 90 días de evolución. Curiosamente, las muestras de 30 y 60 días presentaron niveles de estos componentes significativamente superiores a los tejidos *ex vivo*, pero sin llegar aún a los niveles de los controles. Por el contrario, los niveles de colágeno identificado mediante rojo picrosirius en la dermis profunda resultaron comparables a los controles desde el primer momento de evolución en el día 30. Aunque será necesario realizar estudios que confirmen o desmientan esta hipótesis, estos resultados están de acuerdo con la idea de que la dermis superficial de las muestras implantadas en pacientes podría corresponder a la piel artificial injertada en el paciente, mientras que la dermis profunda podría corresponder a dermis nativa del paciente que, por tanto, mostraría signos de madurez desde el primer momento. En cualquier caso, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral no nos permiten excluir la posibilidad de que la dermis profunda provenga asimismo del tejido artificial implantado, y de que esta estructura madure más rápidamente que la dermis superficial, al estar en contacto más directo con los tejidos nativos de la zona receptora.

Un aspecto importante para la correcta fisiología de la dermis es la orientación de las fibras de colágeno. Al constituir uno de los principales factores implicados en la respuesta de la piel a las fuerzas que inciden sobre ésta, una adecuada orientación de las fibras supone un factor fundamental para el control de las propiedades biomecánicas de la dermis humana (Sherman et al., 2015). Para evaluar la orientación de las fibras, las muestras de tejido artificial y los controles de piel nativa se analizaron utilizando luz polarizada, la cual es capaz de revelar la presencia de colágeno maduro y bien orientado, capaz de responder de forma específica a la luz polarizada, a diferencia del colágeno inmaduro, que no muestra dicho comportamiento (Zerbinati y Calligaro, 2018). En este sentido, se comprobó que, en la dermis superficial, las muestras correspondientes a 30 y 60 días post-injerto presentaban menor nivel de fibras que mostraban polarización positiva, en comparación con los controles, mientras que la piel de 90 días sí alcanzó los niveles del control de piel nativa. Estos resultados coinciden con los análisis realizados con luz no polarizadas y confirman la idea de que las fibras de colágeno formadas en los días 30 y 60 son aún, inmaduras,

alcanzando niveles de madurez compatibles con el tejido nativo a partir del día 90 de evolución. En la dermis profunda, se observó que las muestras de 60 y 90 días eran comparables a los controles. Sin embargo, la cantidad de fibras de colágeno que responden a la luz polarizada fue inferior al control en la dermis profunda correspondiente a 30 días. Los motivos de este comportamiento de las muestras de 30 días deberán ser dilucidados en futuros estudios, aunque estos resultados podrían apoyar preferentemente la teoría de que la dermis profunda podría provenir de la piel artificial injertada, al igual que la superficial, y en este momento, aún no habría sido capaz de formar una red plenamente madura de colágeno. Por el contrario, si aceptásemos la teoría de que la dermis profunda corresponde a dermis remanente del paciente, podríamos hipotetizar que el colágeno de la dermis profunda podría haber experimentado ciertas alteraciones debidas al trauma térmico sufrido por la dermis inmediatamente superior a ésta, que desembocarían en cierta desorganización del colágeno a nivel de la dermis profunda, el cual se podría reorganizar a partir del día 60 para alcanzar niveles fisiológicos.

Uno de los tipos específicos de colágeno que juegan un papel relevante en la fisiología de la piel humana es el colágeno tipo V, el cual supone alrededor del 5% del contenido total de colágeno de la dermis, pero (Shin et al., 2019). El colágeno tipo V presenta estructura fibrilar y tiende a asociarse a otros colágenos fibrilares como el colágeno tipo I, colaborando en aportar elasticidad a la piel humana (Malfait, 2018). Su presencia en la matriz extracelular es muy importante, y sus alteraciones han sido relacionadas con problemas de estabilidad biomecánica de los tejidos blandos humanos (Henriksen, 2016). De hecho, su presencia es crucial para la estabilidad estructural de la dermis humana (Kobayasi y Karlsmark, 2006). Cuando se analizó este componente fibrilar en la dermis de la piel artificial injertada en pacientes, se encontró un aumento significativo de colágeno tipo V en todas las muestras, respecto a la piel artificial mantenida *ex vivo*. Además, se comprobó que la presencia de colágeno tipo V tendió a aumentar con el tiempo de evolución post-injerto *in vivo*, tanto en la dermis superficial como en la dermis profunda. A este respecto, destaca el hecho de que la síntesis de este tipo de fibras resultó significativamente superior en todas las muestras implantadas en pacientes que en los controles de piel nativa,

excepto en la dermis profunda de 30 días de evolución. Aunque las consecuencias de esta presencia incrementada de colágeno tipo V deberán determinarse en el futuro, estos hallazgos estarían en línea con estudios previos que demuestran que la síntesis de este tipo de colágeno se encuentra incrementada en los tejidos en remodelación que presentan altos niveles de síntesis de otros tipos de fibras, considerándose que el colágeno tipo V podría actuar como un regulador de la fibrillogénesis (Mak et al., 2016). En el caso del modelo UGRSKIN, es posible que el elevado grado de remodelación funcional y estructural al que están sometidos estos tejidos una vez implantados en el paciente, puedan inducir la síntesis de colágeno tipo V como agente regulador de dicha remodelación. En cualquier caso, se hace necesario llevar a cabo estudios capaces de determinar si la presencia incrementada de colágeno V en las muestras de piel artificial implantadas en el paciente tiene carácter permanente, o si los niveles de este componente tienden a equilibrarse con la piel nativa después de tiempos de evolución más prolongados.

Por otro lado, en la presente Tesis Doctoral se evaluó la presencia de fibras elásticas como componentes fundamentales de la matriz extracelular de la dermis (Brown y Krishnamurthy, 2023). De estructura compleja, las fibras elásticas están constituidas, fundamentalmente, por elastina, y su función es primordial para mantener la estructura tridimensional de la dermis, aportando elasticidad a la misma (Kondo et al., 2022; Brown y Krishnamurthy, 2023). Su formación ocurre en el contexto de un complejo proceso multifactorial denominado elastogénesis, en el que participan numerosos factores sintetizados, en su mayoría, por los fibroblastos de la dermis (Schmelzer y Duca, 2022; Zhang et al., 2022). Tras una fase inicial en la que las células sintetizan una serie de microfibrillas inmaduras (fundamentalmente, de fibrilina, fibulina y otros tipos de fibras relacionadas con la elastina), las fibras elásticas deben madurar y sufrir un proceso de entrecruzamiento intermolecular, para generar fibras maduras y plenamente funcionales (Halper, 2021; Schmelzer y Duca, 2022). En la dermis, las fibras elásticas maduras permiten a la piel responder a las fuerzas incidentes con la resiliencia que caracteriza a este órgano (Heinz, 2021), por lo que su presencia debería ser analizada en la piel artificial para garantizar la función estructural y biomecánica de ésta una vez implantada en pacientes.

En el presente estudio, se comprobó, en consonancia con los resultados obtenidos en el caso de las fibras de colágeno, que el implante *in vivo* se asoció significativamente a un incremento en la síntesis de fibras elásticas. Mientras estas fibras estaban ausentes en los tejidos *ex vivo*, confirmando la idea de que la piel mantenida en cultivo aún presenta bajos niveles de diferenciación y carece de gran parte de los componentes de la piel nativa (Garzón et al., 2013; Ruiz-López et al., 2022), el implante en pacientes fue capaz de generar la síntesis de fibras elásticas a nivel de la dermis. De hecho, se comprobó, en la dermis superficial, que estas fibras aparecían desde el día 30, aunque sin llegar a los niveles de la piel control, alcanzándose dichos niveles a partir del día 60 de evolución. En línea con los resultados anteriores, estos hallazgos sugieren que la integración y maduración de la dermis superficial ocurre de forma rápida, aunque no llega a los niveles de la piel nativa hasta, al menos, el día 60 de evolución *in vivo*. En cuanto a la dermis profunda, se observó que los tejidos correspondientes a 30 días de evolución presentaban menor cantidad de fibras elásticas que los controles, tal como ocurría para las fibras de colágeno observadas mediante luz no polarizada y luz polarizada. Curiosamente, las muestras de mayor tiempo de evolución presentaron niveles significativamente superiores de fibras elásticas, que superaban los niveles encontrados en la piel nativa control. Aunque habrá que determinar si este hecho conlleva alguna modificación en las propiedades biomecánicas de la piel implantada en el paciente, la mayor presencia de fibras elásticas en las muestras de larga evolución podría ser consecuencia del proceso de remodelación *in vivo* que experimenta la piel artificial una vez implantada, y sugiere que esta piel podría mantener niveles adecuados de elasticidad que posibilitarían las funciones fisiológicas de la piel. En cualquier caso, estudios previos sugieren que no existe una correlación directa entre la cantidad de fibras elásticas presentes en la piel y la existencia de patologías de la misma tales como la fibrosis o la esclerosis (Pasquali Ronchetti et al., 1989). Asimismo, el rápido desarrollo de la epidermis en la piel artificial implantada *in vivo* podría contribuir a explicar la formación de numerosas fibras elásticas a nivel de la dermis, ya que se ha demostrado el potencial inductor del epitelio a la hora de sintetizar de fibras elásticas por parte de los fibroblastos dérmicos, mediante un proceso de interacción entre la epidermis y la dermis (Kondo et al., 2022).

En segundo lugar, la matriz extracelular de los tejidos humanos contiene un abundante componente no fibrilar constituido por una gran cantidad de agua, proteoglicanos, glicoproteínas y otras moléculas no fibrilares cuya función es esencial para la homeostasis tisular (Tracy et al., 2016; Halper, 2021; Huang et al., 2022). De todos estos componentes no fibrilares, los proteoglicanos son, probablemente, los componentes más abundantes y más importantes a la hora de controlar las propiedades biomecánicas y biológicas de la matriz extracelular (Rodríguez-Pozo et al., 2020; Eisner et al., 2022), actuando como reguladores de primer orden de procesos tan importantes como la proliferación, migración, síntesis proteica y remodelación de la matriz extracelular (Vela-Romera et al., 2019). El análisis global de proteoglicanos mediante la técnica histoquímica del azul alcian nos permitió cuantificar la presencia de estos componentes en la dermis de cada una de las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se comprobó que la piel artificial mantenida *ex vivo* mostraba cierta cantidad de proteoglicanos en su composición, aunque esta cantidad era significativamente inferior a la de la dermis superficial de la piel nativa control. Este hallazgo no es sorprendente, ya que el tejido artificial se construyó utilizando diversos componentes ricos en proteoglicanos y glicoproteínas contenidos en el biomaterial de fibrina-agarosa, por lo que los tejidos artificiales generados a partir de este biomaterial tienden a mostrar cierta cantidad de proteoglicanos incluso antes de su aplicación *in vivo* (Garzón et al., 2021; Blanco-Elices et al., 2023). En segundo lugar, se observó una progresiva tendencia a alcanzar los niveles de la piel nativa control en los tejidos implantados en pacientes. Por un lado, la dermis superficial tendió a incrementar la concentración de proteoglicanos con el tiempo de evolución *in vivo*. Por otro lado, la dermis profunda tendió a disminuir la cantidad de estos componentes con el tiempo de evolución. En ambos casos, la cantidad de proteoglicanos se equiparó a la del control alrededor del día 90 de evolución, aunque las diferencias con el control no fueron significativas desde el día 60 post-implante. El hecho de que la piel implantada en pacientes alcanzara niveles de proteoglicanos que no diferían del control vuelve a poner de relieve el rápido proceso de biointegración y maduración que experimenta el modelo UGRSKIN una vez implantado en pacientes, aunque, en este caso, el correcto desarrollo de

proteoglicanos podría requerir un mínimo de 60 días de evolución para alcanzar niveles fisiológicos.

Tras analizar globalmente la presencia de proteoglicanos, se procedió a cuantificar uno de los proteoglicanos más abundantes y más importantes de la dermis: la decorina (Kosho et al., 2019). La decorina participa en numerosos procesos relacionados con las principales propiedades de la matriz extracelular, y es de especial relevancia en la regulación de la formación de los componentes fibrilares y el control del grosor de las fibras maduras que se van formando en la matriz extracelular, especialmente, en el caso de las fibras de colágeno (Graham et al., 2000; Reed y Iozzo, 2002). Como resultado del análisis llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, se observó, en primer lugar, la escasa presencia de decorina en los sustitutos de piel mantenidos en cultivo. En segundo lugar, se comprobó que el implante en pacientes se asoció a un aumento significativo de los niveles de decorina en todas las muestras, excepto en la dermis superficial del tejido correspondiente a 30 días de evolución, alcanzándose niveles comparables al control de piel humana nativa en todos los demás casos. Estos resultados concuerdan, en general, con los datos obtenidos para las fibras de colágeno, y confirman la idea de una interrelación directa entre la síntesis de fibras colágeno maduro y la presencia de este tipo de proteoglicanos (Franchi et al., 2007). Además, diversos estudios han demostrado que la ausencia de decorina y otros proteoglicanos se asocia de manera directa a una síntesis anómala de fibras de colágeno y, por tanto, a la aparición de diversas patologías como la fibrosis dérmica o cicatrices hipertróficas (Honardoust et al., 2012).

En conjunto, los resultados obtenidos tras el análisis de la dermis confirman los hallazgos encontrados a nivel de la epidermis y la membrana basal referentes a la rápida biointegración de la piel artificial en el paciente, aunque, en el caso de la dermis, el proceso de maduración y diferenciación parece requerir mayores periodos de tiempo. Tal como demuestran los estudios de clasificación *cluster*, los tejidos que presentarían los mayores niveles de biomimetismo respecto a la piel humana nativa serían los tejidos implantados en pacientes durante 60 y 90 días.

Uno de los principales factores implicados en la biointegración de tejidos generados mediante ingeniería tisular es la generación de una adecuada red vascular que

permita al tejido implantado recibir los nutrientes, el oxígeno y los factores tróficos necesarios para su pleno funcionamiento (Sun et al., 2021). Por ello, se hace necesario evaluar la formación de vasos sanguíneos en la piel artificial generada mediante ingeniería tisular e implantada en grandes quemados, habiéndose demostrado que la falta de una adecuada red vascular podría conducir a hipoxia del tejido artificial implantado y, por tanto, a un fallo del tratamiento (Chandra y Atala, 2019; Masson-Meyers y Tayebi, 2021). En el caso del modelo UGRSKIN, se pudo observar la rápida formación de vasos sanguíneos positivos para el marcador endotelial CD31, así como de vasos de mayor calibre positivos para el marcador de músculo liso SMA, mostrando ambos tipos de vasos, el mismo comportamiento histológico. Como era de esperar, los tejidos artificiales mantenidos *ex vivo* carecían por completo de vasos sanguíneos, resultado negativo para ambos marcadores analizados. En el caso de la piel nativa control, los análisis revelaron la mayor presencia de vasos CD31-positivos y SMA-positivos a nivel de la dermis superficial, siendo ambos más escasos en la dermis profunda. Cuando se analizó el modelo de piel artificial implantado en pacientes, se comprobó, de igual forma, que los vasos sanguíneos eran más abundantes en la dermis superficial que en la profunda, aunque existían diferencias frente al control de piel nativa. Así, los análisis mostraron un mayor número de vasos CD31-positivos y SMA-positivos en los sustitutos de piel artificial implantados en pacientes que en los controles, tanto en la dermis superficial, como en la dermis profunda, existiendo gran abundancia de vasos desde el día 30 de evolución. Estos resultados sugieren que el tejido artificial posee gran capacidad para inducir la formación de vasos a partir de los vasos del tejido receptor, mediante un proceso de angiogénesis (Wu et al., 2018). El rápido desarrollo de una red de capilares, acompañada de vasos de mayor calibre que poseen musculatura lisa en su estructura (Frangiamore et al., 2018), podría explicar los resultados positivos encontrados en los pacientes tratados con el modelo UGRSKIN hasta el momento. Diversos estudios previos ya demostraron que el uso de biomateriales de fibrina podría contribuir a inducir procesos de angiogénesis capaces de mejorar la biointegración de productos de ingeniería tisular aplicados *in vivo* (Hall, 2007), especialmente, cuando estos biomateriales se funcionalizan con otros tipos celulares pro-angiogénicos (Blanco-Elices et al., 2021).

A pesar de su abundancia, es importante señalar que la distribución de los vasos sanguíneos en la piel artificial implantada en pacientes no se distribuyó de manera totalmente biomimética respecto a la dermis humana nativa. De hecho, mientras la dermis nativa presenta dos plexos vasculares interconectados (uno superior, a nivel de la dermis papilar, y otro inferior, a nivel de la dermis reticular) (Braverman, 1989), la dermis de la piel implantada en pacientes presentaba menores niveles de organización y no mostraba claramente la presencia de estos dos plexos vasculares. Probablemente, la necesidad de aportar rápidamente factores tróficos al tejido implantado obliga a la formación de una red vascular inicialmente poco organizada y pobremente estructurada, tal como se demostró en diversos tipos de tejidos (Gounari et al., 2022) que, posteriormente, podría tender a organizarse hasta remedar la estructura existente en los tejidos nativos. Asimismo, es posible que el excesivo número de vasos encontrado en los tejidos artificiales implantados en pacientes tienda a disminuir progresivamente con el tiempo de evolución hasta normalizarse respecto a la piel nativa. Futuros estudios deberán determinar la evolución de estos vasos sanguíneos en muestras de pacientes tomadas tras mayores tiempos de evolución.

Junto a los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos constituyen estructuras fundamentales para garantizar la correcta fisiología de la piel humana y evitar la aparición de edema u otras patologías a nivel de la dermis (Huggenberger y Detmar, 2011; Schwager y Detmar, 2019). Los vasos linfáticos se constituyen formando una red jerárquicamente estructurada, que comienza a nivel de los tejidos, y desemboca en el torrente circulatorio venoso, drenando el exceso de fluido de los tejidos (Skobe y Detmar, 2000). Al igual que ocurrió con los vasos sanguíneos, el presente estudio mostró, en primer lugar, que el número de vasos linfáticos era superior en la dermis superficial que en la dermis profunda de la piel nativa utilizada como control. En segundo lugar, se comprobó la presencia de vasos linfáticos en la piel artificial injertada en el paciente, aunque el número de vasos linfáticos de la dermis superficial fue inferior al de los controles en el día 30 de evolución y superior al de los controles en el día 90 post-implante. De nuevo, estos resultados sugieren que la maduración de la dermis y de los componentes que en ella residen, como los vasos linfáticos,

podría requerir más de 30 días de evolución, encontrándose que las muestras de 60 días ya presentan un número de vasos comparable al control. Al igual que en el caso de los vasos sanguíneos, el hecho de que las muestras de 90 días presenten mayor número de linfáticos en la dermis superficial podría relacionarse con el proceso de biointegración y remodelación de la piel artificial y, probablemente, podría tender a regresar tras un periodo de evolución aún más prolongado. En general, la presencia de vasos linfáticos en la piel artificial injertada en pacientes sugeriría un adecuado funcionamiento de esta piel artificial, al menos, en lo que a drenaje linfático se refiere. Sin embargo, el hecho de que este tipo de vasos juegue un papel fundamental en múltiples procesos fisiológicos de la piel, incluyendo el control de la hidratación y la regulación del sistema inmune, entre otros (Selahi y Jain, 2023), sugeriría que la piel implantada en pacientes podría llevar a cabo funciones fisiológicas de la piel normal desde el día 60 de evolución.

En suma, en la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo a distintos niveles para determinar la estructura y la ultraestructura de la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada implantada en pacientes durante periodos de tiempo crecientes. En general, los resultados sugieren que la piel artificial implantada en pacientes tiende a experimentar un proceso de biointegración que desemboca en la formación de una piel regenerada muy similar a la piel humana nativa, y que este proceso ocurre de forma muy temprana, aunque con diferencias entre las diferentes capas de la piel. Por un lado, la epidermis maduró y se diferenció desde los primeros momentos del estudio, lo cual probablemente contribuyó a la rápida formación de una barrera protectora en el paciente que habría que relacionar con los positivos resultados encontrados a nivel clínico. Por otro lado, la dermis mostró igualmente adecuados niveles de biointegración, aunque su plena maduración y diferenciación requirió mayores tiempos de evolución, e incluso algunos componentes como el colágeno tipo V o los vasos sanguíneos, no llegaron a mimetizar los niveles encontrados en los controles. Estos resultados sugieren en consonancia con los estudios clasificatorios realizados teniendo en cuenta todos los parámetros analizados en esta Tesis Doctoral, que la piel UGRSKIN mantenida *ex vivo* presentaría escasos niveles de diferenciación, comparables a los de la piel implantada durante 30

días. Sin embargo, el implante *in vivo* durante 60 y, especialmente, 90 días, generaría tejidos estructural y funcionalmente biomiméticos respecto a la piel humana nativa.

Todos estos resultados avalan la bioseguridad del modelo UGRSKIN y su capacidad para integrarse adecuadamente en el paciente, contribuyendo de forma decisiva a incrementar la supervivencia y la calidad de vida de estos pacientes.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden inferir las siguientes conclusiones:

1. El análisis histológico de los sustitutos de piel humana basados en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurada mantenidos en cultivo *ex vivo* reveló la presencia de un epitelio formado por 2-3 estratos de queratinocitos que mostraba escasos niveles de diferenciación epidérmica y muy baja expresión de marcadores epiteliales, incluyendo las citoqueratinas C5, CK8 y CK10, las proteínas de unión intercelular claudina 1 y placoglobina y los marcadores de diferenciación queratinocítica filagrina e involucrina, aunque estos sustitutos tisulares sí presentaban signos de proliferación celular a nivel del epitelio. No se encontraron otros tipos celulares, tales como los melanocitos o las células de Langerhans en estos sustitutos de piel mantenidos en cultivo. Por el contrario, las muestras de piel humana artificial generados por ingeniería tisular e implantados en pacientes afectos de graves quemaduras cutáneas mostraron, desde el día 30 de evolución *in vivo*, un epitelio bien diferenciado en el que las células se disponían en estratos basal, espinoso, granuloso y córneo, reproduciendo la estructura y la ultraestructura de la piel humana nativa utilizada como control, sin que se apreciaran diferencias entre los diferentes días de evolución. Este epitelio mostró, en general, un patrón de expresión de marcadores de diferenciación epidérmica similar al de la piel control, aunque con menor expresión de la citoqueratina CK10 y de involucrina en el día 30 de seguimiento *in vivo*, sin que existieran diferencias en la expresión de CK5, CK8, claudina 1, placoglobina y filagrina respecto al control, aunque el número de melanocitos y células de Langerhans fue significativamente inferior al control en todos los tiempos. La proliferación celular determinada por la expresión de Ki67 reveló la presencia de células proliferativas en el estrato basal epidérmico, siendo similar al control a partir del día 90 de evolución *in vivo*. Estos hallazgos sugieren que el epitelio de los sustitutos de piel artificial implantados en pacientes es capaz de integrarse y de diferenciarse muy rápidamente, mostrando patrones de diferenciación epidérmica ortotípica que mimetizan en gran parte a la piel nativa.

2. El análisis histológico de la membrana basal de los tejidos artificiales generados en la presente Tesis Doctoral reveló la existencia de una unión dermo-epidérmica de morfología plana, carente de las típicas crestas y papilas existentes en la piel nativa, tanto en el tejido mantenido *ex vivo* como en los sustitutos de piel implantados en pacientes. Asimismo, los análisis histoquímicos utilizando la técnica del PAS mostraron la presencia de una membrana basal que contenía abundantes glicoproteínas en todos los sustitutos de piel implantados en pacientes, aunque no en el sustituto mantenido en cultivo, sin que se apreciaran diferencias entre los diferentes tiempos de evolución *in vivo*. A nivel ultraestructural, se evidenció la existencia de una membrana basal ortotípica en todas las muestras implantadas en pacientes, con la presencia de una lámina lúcida, una lámina densa y una lámina reticular, sin que se evidenciaran alteraciones en ninguno de los casos. Estos resultados sugieren que la unión dermo-epidérmica de los sustitutos implantados en pacientes es capaz de reproducir, desde el primer momento, los patrones de diferenciación de la piel nativa en cuanto a la membrana basal, aunque la morfología de esta unión carecía de las crestas y papilas existentes en la piel humana utilizada como control.

3. Los estudios histológicos llevados a cabo a nivel de la dermis de la piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada confirmó la adecuada biointegración de este modelo de piel, una vez implantado en el paciente. Sin embargo, los tejidos artificiales implantados en grandes quemados evidenciaron la presencia de una dermis superficial y una dermis profunda separadas por una interfase, que eran muy evidentes a los 30 días de evolución *in vivo* y menos evidentes tras 60 y 90 días del implante. En general, la dermis superficial contenía mayor cantidad de células, mientras que la dermis profunda contenía mayor cantidad de componentes fibrilares maduros y bien diferenciados, similares a los de la piel control. Los estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos revelaron la presencia de abundantes fibras de colágeno en los sustitutos implantados en pacientes, aunque no en los constructos mantenidos en cultivo, alcanzándose los niveles y el comportamiento con luz polarizada de la piel nativa a los 90 días de evolución *in vivo*, en el caso de la dermis superficial, y a los 60 días, en el caso de

la dermis profunda. En el caso del colágeno tipo V, se comprobó que el implante en pacientes se asoció, en general, a un aumento significativo de la cantidad de este tipo de fibras. Asimismo, el estudio de las fibras elásticas mostró niveles comparables al control en la dermis superficial de 60 y 90 días de seguimiento, y un aumento significativo respecto al control en la dermis profunda correspondiente a los mismos días de evolución. En cuanto a los proteoglicanos de la matriz extracelular, se comprobó que los tejidos artificiales implantados en pacientes mostraron niveles similares al control a partir del día 60, en el caso de la dermis superficial, y en todos los periodos analizados, para la dermis profunda. Todos estos resultados revelan la posibilidad de que la dermis de la piel artificial experimente un proceso de biointegración en el paciente, aunque este proceso ocurre de forma más lenta y progresiva en comparación con la epidermis. Aunque la dermis mostró signos parciales de diferenciación desde el día 30, la maduración de esta capa de la piel no ocurre hasta, al menos, el día 60 de evolución post-implante en pacientes afectados de graves quemaduras.

4. La cuantificación de vasos sanguíneos y linfáticos en la piel artificial generada por ingeniería tisular evidenció, en primer lugar, la formación de numerosos vasos sanguíneos de delgado calibre que mostraron marcación positiva para CD31, así como de vasos de mayor calibre que contenían una capa muscular y mostraron marcación positiva para SMA, especialmente, en la dermis superficial, tal como ocurría en los controles de piel humana nativa. Sin embargo, a diferencia de los controles, los tejidos artificiales implantados en pacientes mostraron un número significativamente superior de vasos sanguíneos en todos los tiempos de evolución analizados, lo cual sugiere la presencia de un proceso activo de angiogénesis relacionado con la biointegración del tejido artificial. En cuanto a los vasos linfáticos identificados mediante el marcador D2-40, se evidenció un aumento del número de estas estructuras en la dermis superficial con el tiempo de evolución, superando los niveles del control a los 90 días, mientras que su número fue comparable al control en todos los tiempos analizados en la dermis profunda. Estos resultados sugieren que la piel artificial es capaz de inducir de forma eficaz la formación de nuevos vasos de tipo sanguíneo y linfático, que

contribuirían a la viabilidad y, por tanto, a la integración del tejido artificial en el paciente.

5. En general, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran la utilidad del modelo UGRSKIN de piel artificial de fibrina-agarosa nanoestructurada implantada en pacientes y su capacidad de integración y diferenciación en el lecho receptor. Los estudios de clasificación de tipo *cluster* sugieren que la piel artificial mantenida en cultivo *ex vivo* presenta escasos niveles de diferenciación que serían, en parte, comparables a las muestras implantadas en pacientes durante 30 días, mientras que las muestras de 60 y, especialmente, de 90 días de evolución presentan patrones histoarquitecturales y funcionales biomiméticos respecto a la piel humana nativa utilizada como control. Estos resultados revelan la capacidad del modelo UGRSKIN para integrarse, madurar y diferenciarse una vez implantado en pacientes, aunque la plena diferenciación podría requerir un mínimo de 60 días de seguimiento *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaminos, M., Del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Muñoz-Avila, J. I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., et al. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3311–3317. doi: 10.1167/iovs.05-1647.
- Alfonso-Rodríguez, C.-A., Garzón, I., Garrido-Gómez, J., Oliveira, A.-C.-X., Martín-Piedra, M.-Á., Scionti, G., et al. (2014). Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease. *PLoS One* 9, e112457. doi: 10.1371/journal.pone.0112457.
- Al-Jassar, C., Bikker, H., Overduin, M., and Chidgey, M. (2013). Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases. *J. Mol. Biol.* 425, 4006–4022. doi: 10.1016/j.jmb.2013.07.035.
- Amini-Nik, S., Dolp, R., Eylert, G., Datu, A. K., Parousis, A., Blakeley, C., et al. (2018). Stem cells derived from burned skin - The future of burn care. *EBioMedicine* 37, 509–520. doi: 10.1016/J.EBIOM.2018.10.014.
- Aumailley, M. (1995). Structure and supramolecular organization of basement membranes. *Kidney Int. Suppl.* 49, S4-7.
- Aumailley, M., and Rousselle, P. (1999). Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biol.* 18, 19–28. doi: 10.1016/S0945-053X(98)00004-3.
- Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-Jahromi, S., et al. (2017). Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 33, 144–172. doi: 10.1080/02648725.2018.1430464.
- Barsotti, M. C., Felice, F., Balbarini, A., and Di Stefano, R. (2011). Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58, 301–310. doi: 10.1002/bab.49.
- Bechetoille, N., Dezutter-Dambuyant, C., Damour, O., André, V., Orly, I., and Perrier, E. (2007). Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Tissue Eng.* 13, 2667–2679. doi: 10.1089/ten.2006.0405.
- Bellmann, L., Zelle-Rieser, C., Milne, P., Resteu, A., Tripp, C. H., Hermann-Kleiter, N., et al. (2021). Notch-Mediated Generation of Monocyte-Derived Langerhans Cells: Phenotype and Function. *J. Invest. Dermatol.* 141, 84-94.e6. doi: 10.1016/j.jid.2020.05.098.
- Berthiaume François, Maguire Timothy, Y. M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 403–430. doi: 10.1146/ANNUREV-CHEMBIOENG-061010-114257.
- Biedermann, T., Böttcher-Haberzeth, S., Klar, A. S., Widmer, D. S., Pontiggia, L., Weber, A. D., et al. (2015a). The influence of stromal cells on the pigmentation of tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts. *Tissue Eng. Part A* 21, 960–969. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0327.
- Biedermann, T., Klar, A. S., Böttcher-Haberzeth, S., Michalczyk, T., Schiestl, C., Reichmann, E., et al. (2015b). Long-term expression pattern of melanocyte markers in light- and dark-pigmented dermo-epidermal cultured human skin substitutes. *Pediatr. Surg. Int.* 31, 69–76. doi: 10.1007/s00383-014-3622-7.
- Blackstone, B. N., Malara, M. M., Baumann, M. E., McFarland, K. L., Supp, D. M., and Powell, H. M. (2020). Fractional CO2 laser micropatterning of cell-seeded electrospun collagen scaffolds enables rete ridge formation in 3D engineered skin. *Acta Biomater.* 102, 287–297. doi: 10.1016/j.actbio.2019.11.051.
- Blanco-Elices, C., Chato-Astrain, J., Oyonarte, S., Bermejo-Casares, F., España-López, A., Fernández-Valadés, R., et al. (2021). Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential. *J. Periodontal Res.* doi: 10.1111/jre.12927.
- Blanco-Elices, C., Morales-Álvarez, C., Chato-Astrain, J., González-Gallardo, C., Ávila-Fernández, P., Campos, F., et al. (2023). Development of stromal differentiation patterns in heterotypical models of artificial corneas generated by tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1124995>.

- Boecker, W., and Buerger, H. (2003). Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif.* 36 Suppl 1, 73–84. doi: 10.1046/j.1365-2184.36.s.1.7.x.
- Borrelli, M. R., Griffin, M., Ngaage, L. M., Longaker, M. T., and Lorenz, H. P. (2021). Striae Distensae: Scars without Wounds. *Plast. Reconstr. Surg.* 148, 77–87. doi: 10.1097/PRS.0000000000008065.
- Boulais, N., and Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. *Eur. J. Dermatol. EJD* 18, 119–127. doi: 10.1684/ejd.2008.0348.
- Boyce, S. T., Supp, D. M., and Lloyd, C. M. (2020). Exogenous Keratinocyte Growth Factor Is Not Required for Pigmentation of Skin Substitutes with Three Isogeneic Cell Types. *Tissue Eng. Part A* 26, 214–224. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0203.
- Braverman, I. M. (1989). Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states. *J. Invest. Dermatol.* 93, 2S-9S. doi: 10.1111/1523-1747.ep12580893.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., and Nischt, R. (2009). Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem. Cell Biol.* 132, 1–10. doi: 10.1007/s00418-009-0586-0.
- Brown, R. A. (2013). In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models? *Exp. Cell Res.* 319, 2460–2469. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.07.001.
- Brown, T. M., and Krishnamurthy, K. (2023). “Histology, Dermis,” in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>
- Burgess, M., Valdera, F., Varon, D., Kankuri, E., and Nuutila, K. (2022). The Immune and Regenerative Response to Burn Injury. *Cells* 11, 3073. doi: 10.3390/cells11193073.
- Canceill, T., Jourdan, G., Kémoun, P., Guissard, C., Monsef, Y. A., Bourdens, M., et al. (2023). Characterization and Safety Profile of a New Combined Advanced Therapeutic Medical Product Platelet Lysate-Based Fibrin Hydrogel for Mesenchymal Stromal Cell Local Delivery in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2206. doi: 10.3390/ijms24032206.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–340. doi: 10.1038/nrm1619.
- Carriel, V., Campos, A., Alaminos, M., Raimondo, S., and Geuna, S. (2017a). Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1560, 207–218. doi: 10.1007/978-1-4939-6788-9_15.
- Carriel, V., Garzón, I., Alaminos, M., and Cornelissen, M. (2014). Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen. Res.* 9, 1657–1660. doi: 10.4103/1673-5374.141798.
- Carriel, V., Garzón, I., Campos, A., Cornelissen, M., and Alaminos, M. (2017b). Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11, 553–563. doi: 10.1002/term.1949.
- Carriel, V., Garzón, I., Jiménez, J.-M., Oliveira, A.-C.-X., Arias-Santiago, S., Campos, A., et al. (2012). Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs* 196, 1–12. doi: 10.1159/000330682.
- Carriel, V., Scionti, G., Campos, F., Roda, O., Castro, B., Cornelissen, M., et al. (2017c). In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11, 1412–1426. doi: 10.1002/term.2039.
- Carriel, V., Vizcaíno-López, G., Chato-Astrain, J., Durand-Herrera, D., Alaminos, M., Campos, A., et al. (2019). Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Exp. Eye Res.* 186, 107717. doi: 10.1016/j.exer.2019.107717.

- Cases-Perera, O., Blanco-Elices, C., Chato-Astrain, J., Miranda-Fernández, C., Campos, F., Crespo, P. V., et al. (2022). Development of secretome-based strategies to improve cell culture protocols in tissue engineering. *Sci. Rep.* 12, 10003. doi: 10.1038/s41598-022-14115-y.
- Chan, L. S. (1997). Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2, d343-352. doi: 10.2741/a196.
- Chandra, P., and Atala, A. (2019). Engineering blood vessels and vascularized tissues: technology trends and potential clinical applications. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 133, 1115–1135. doi: 10.1042/CS20180155.
- Chato-Astrain, J., Campos, F., Roda, O., Miralles, E., Durand-Herrera, D., Sáez-Moreno, J. A., et al. (2018). In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 501. doi: 10.3389/fncel.2018.00501.
- Chato-Astrain, J., Chato-Astrain, I., Sánchez-Porras, D., García-García, Ó.-D., Bermejo-Casares, F., Vairo, C., et al. (2020). Generation of a novel human dermal substitute functionalized with antibiotic-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) with antimicrobial properties for tissue engineering. *J. Nanobiotechnology* 18. doi: 10.1186/s12951-020-00732-0.
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., et al. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1974. doi: 10.3390/ijms17121974.
- Cheema, U., and Brown, R. A. (2013). Rapid Fabrication of Living Tissue Models by Collagen Plastic Compression: Understanding Three-Dimensional Cell Matrix Repair In Vitro. *Adv. Wound Care* 2, 176–184. doi: 10.1089/wound.2012.0392.
- Chiu, A., Sharma, D., and Zhao, F. (2023). Tissue Engineering-Based Strategies for Diabetic Foot Ulcer Management. *Adv. Wound Care* 12, 145–167. doi: 10.1089/wound.2021.0081.
- Coruh, A., and Yontar, Y. (2012). Application of split-thickness dermal grafts in deep partial- and full-thickness burns: a new source of auto-skin grafting. *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.* 33, e94–e100. doi: 10.1097/BCR.0b013e31823499e9.
- Cottone, G., Amendola, F., Strada, C., Chiara Bagnato, M., Brambilla, R., De Francesco, F., et al. (2021). Comparison of Efficacy among Three Dermal Substitutes in the Management of Critical Lower-Limb Wounds: The Largest Biases-Reduced Single-Center Retrospective Cohort Study in Literature. *Medicina (Mex.)* 57. doi: 10.3390/medicina57121367.
- Cuende, N., Álvarez-Márquez, A. J., Díaz-Aunió, C., Castro, P., Huet, J., and Pérez-Villares, J. M. (2021). El negocio de la medicina regenerativa y las células madre: confusión con implicaciones legales. *Gac. Sanit.* 35, 374–378. doi: 10.1016/j.gaceta.2019.12.004.
- Cuende, N., and Izeta, A. (2010). Clinical translation of stem cell therapies: a bridgeable gap. *Cell Stem Cell* 6, 508–512. doi: 10.1016/j.stem.2010.05.005.
- Cuende, N., Boniface, C., Bravery, C., Forte, M., Giordano, R., Hildebrandt, M., et al. (2014). The puzzling situation of hospital exemption for advanced therapy medicinal products in Europe and stakeholders' concerns. *Cytotherapy* 16, 1597–1600. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.08.007.
- Cuende, N., Ciccocioppo, R., Forte, M., Galipeau, J., Ikonomou, L., Levine, B. L., et al. (2022). Patient access to and ethical considerations of the application of the European Union hospital exemption rule for advanced therapy medicinal products. *Cytotherapy* 24, 686–690. doi: 10.1016/j.jcyt.2022.03.007.
- da Silva, L. P., Reis, R. L., Correló, V. M., and Marques, A. P. (2019). Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 21, 145–169. doi: 10.1146/annurev-bioeng-060418-052422.
- Daly, C. H. (1982). Biomechanical properties of dermis. *J. Invest. Dermatol.* 79 Suppl 1, 17s–20s. doi: 10.1111/1523-1747.ep12544620.

- De Francesco, F., Busato, A., Mannucci, S., Zingaretti, N., Cottone, G., Amendola, F., et al. (2020). Artificial dermal substitutes for tissue regeneration: comparison of the clinical outcomes and histological findings of two templates. *J. Int. Med. Res.* 48. doi: 10.1177/0300060520945508.
- de Jong, A., and Ogg, G. (2021). CD1a function in human skin disease. *Mol. Immunol.* 130, 14–19. doi: 10.1016/j.molimm.2020.12.006.
- De la Puente, P., and Ludeña, D. (2014). Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp. Cell Res.* 322, 1–11. doi: 10.1016/J.YEXCR.2013.12.017.
- de Szalay, S., and Wertz, P. W. (2023). Protective Barriers Provided by the Epidermis. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 3145. doi: 10.3390/ijms24043145.
- Díaz-Moreno, E., Durand-Herrera, D., Carriel, V., Martín-Piedra, M.-Á., Sánchez-Quevedo, M.-D.-C., Garzón, I., et al. (2018). Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term storage of biomaterials based on decellularized intestine. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106, 488–500. doi: 10.1002/jbm.b.33861.
- Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano.
- Egea-Guerrero, J. J., Carmona, G., Correa, E., Mata, R., Arias-Santiago, S., Alaminos, M., et al. (2019). Transplant of Tissue-Engineered Artificial Autologous Human Skin in Andalusia: An Example of Coordination and Institutional Collaboration. *Transplant. Proc.* 51, 3047–3050. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.08.014.
- Eisner, L. E., Rosario, R., Andarawis-Puri, N., and Arruda, E. M. (2022). The Role of the Non-Collagenous Extracellular Matrix in Tendon and Ligament Mechanical Behavior: A Review. *J. Biomech. Eng.* 144, 050801. doi: 10.1115/1.4053086.
- Fabia, R., and Groner, J. I. (2009). Advances in the care of children with burns. *Adv. Pediatr.* 56, 219–248. doi: 10.1016/j.yapd.2009.08.020.
- Fernández-Valadés-Gámez, R., Garzón, I., Licerias-Licerias, E., España-López, A., Carriel, V., Martín-Piedra, M.-Á., et al. (2016). Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 11, 015015. doi: 10.1088/1748-6041/11/1/015015.
- Folberg, R., Hendrix, M. J., and Maniotis, A. J. (2000). Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 156, 361–381. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64739-6.
- Foraster, C. F., and Ferrandiz (2001). *Dermatología Clínica*. Elsevier España.
- Franchi, M., Trirè, A., Quaranta, M., Orsini, E., and Ottani, V. (2007). Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal* 7, 404–420. doi: 10.1100/tsw.2007.92.
- Frangiamore, S. J., Morris, E. R., Scibetta, A. C., Chahla, J., Moatshe, G., Civitarese, D., et al. (2018). Evaluation of Endothelial and Vascular-Derived Progenitor Cell Populations in the Proximal and Distal UCL of the Elbow: A Comparative Study. *Orthop. J. Sports Med.* 6, 2325967118777825. doi: 10.1177/2325967118777825.
- Freeman, S. C., and Sonthalia, S. (2023). “Histology, Keratohyalin Granules,” in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537049/>
- Furue, M. (2020). Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5382. doi: 10.3390/ijms21155382.
- Gacto-Sanchez, P. (2017). Surgical treatment and management of the severely burn patient: Review and update. *Med. Intensiva* 41, 356–364. doi: 10.1016/j.medin.2017.02.008.
- Galbraith, H. (2010). Fundamental hair follicle biology and fine fibre production in animals. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 4, 1490–1509. doi: 10.1017/S175173111000025X.
- Gao, C., Lu, C., Jian, Z., Zhang, T., Chen, Z., Zhu, Q., et al. (2021). 3D bioprinting for fabricating artificial skin tissue. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 208, 112041. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112041.

- Garzon, I., Chato-Astrain, J., Campos, F., Fernandez-Valades, R., Sanchez-Montesinos, I., Campos, A., et al. (2020). Expanded Differentiation Capability of Human Wharton's Jelly Stem Cells Toward Pluripotency: A Systematic Review. *Tissue Eng. Part B Rev.* doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0257.
- Garzón, I., Chato-Astrain, J., González-Gallardo, C., Ionescu, A., Cardona, J. de la C., Mateu, M., et al. (2020). Long-Term in vivo Evaluation of Orthotypical and Heterotypical Bioengineered Human Corneas. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 681. doi: 10.3389/fbioe.2020.00681.
- Garzón, I., Jaimes-Parra, B. D., Pascual-Geler, M., Cózar, J. M., Sánchez-Quevedo, M. D. C., Mosquera-Pacheco, M. A., et al. (2021). Biofabrication of a Tubular Model of Human Urothelial Mucosa Using Human Wharton Jelly Mesenchymal Stromal Cells. *Polymers* 13, 1568. doi: 10.3390/polym13101568.
- Garzón, I., Miyake, J., González-Andrades, M., Carmona, R., Carda, C., Sánchez-Quevedo, M. del C., et al. (2013). Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 625–632. doi: 10.5966/sctm.2012-0157.
- Garzón, I., Sánchez-Quevedo, M. C., Moreu, G., González-Jaranay, M., González-Andrades, M., Montalvo, A., et al. (2009). In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J. Periodontal Res.* 44, 588–597. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01159.x.
- Garzon, I., Serrato, D., Roda, O., Del Carmen Sanchez-Quevedo, M., Gonzales-Jaranay, M., Moreu, G., et al. (2009). In vitro cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *Int. J. Artif. Organs* 32, 711–719. doi: 10.1177/039139880903201002.
- Gómez de Ferraris, M.E., and Campos, A. (2019). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. Editorial Médica Panamericana. 4ª Ed.
- Gómez, C., Galán, J. M., Torrero, V., Ferreiro, I., Pérez, D., Palao, R., et al. (2011). Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: Clinical and functional outcomes. A multicentric study. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 37, 580–589. doi: 10.1016/j.burns.2010.10.005.
- González-Andrades, M., Garzón, I., Gascón, M. I., Muñoz-Avila, J. I., Sánchez-Quevedo, M. C., Campos, A., et al. (2009). Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 442–449. doi: 10.1002/term.178.
- González-Andrades, M., Mata, R., Del Carmen González-Gallardo, M., Medialdea, S., Arias-Santiago, S., Martínez-Atienza, J., et al. (2017). A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open*. doi: 10.1136/bmjopen-2017-016487.
- González-Gallardo, C., Martínez-Atienza, J., Mataix, B., Muñoz-Ávila, J. I., Daniel Martínez-Rodríguez, J., Medialdea, S., et al. (2023). Successful restoration of corneal surface integrity with a tissue-engineered allogeneic implant in severe keratitis patients. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 162. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2023.114612.
- Goula, A., Gkioka, V., Michalopoulos, E., Katsimpoulas, M., Noutsias, M., Sarri, E. F., et al. (2020). Advanced Therapy Medicinal Products Challenges and Perspectives in Regenerative Medicine. *J. Clin. Med. Res.* 12, 780–786. doi: 10.14740/jocmr.v12i12.3964.
- Gounari, E., Komnenou, A., Kofidou, E., Nanaki, S., Bikiaris, D., Almpnidou, S., et al. (2022). Intravitreal Administration Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Combined with Anti-VEGF Nanocarriers, in a Pharmaceutically Induced Animal Model of Retinal Vein Occlusion. *Stem Cells Int.* 2022, 2760147. doi: 10.1155/2022/2760147.
- Graham, H. K., Holmes, D. F., Watson, R. B., and Kadler, K. E. (2000). Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. *J. Mol. Biol.* 295, 891–902. doi: 10.1006/jmbi.1999.3384.

- Graham, S., Marina, P. F., and Blencowe, A. (2019). Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. *Carbohydr. Polym.* 207, 143–159. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.053.
- Greenhalgh, D. G. (2019). Management of Burns. *N. Engl. J. Med.* 380, 2349–2359. doi: 10.1056/NEJMRA1807442.
- Gueugniaud, P. Y., Carsin, H., Bertin-Maghit, M., and Petit, P. (2000). Current advances in the initial management of major thermal burns. *Intensive Care Med.* 26, 848–856. doi: 10.1007/s001340051273.
- Hafemann, B., Ensslen, S., Erdmann, C., Niedballa, R., Zühlke, A., Ghofrani, K., et al. (1999). Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 25, 373–384. doi: 10.1016/s0305-4179(98)00162-4.
- Hall, H. (2007). Modified fibrin hydrogel matrices: both, 3D-scaffolds and local and controlled release systems to stimulate angiogenesis. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3597–3607. doi: 10.2174/138161207782794158.
- Halper, J. (2021). Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1348, 105–126. doi: 10.1007/978-3-030-80614-9_4.
- Hartmann-Fritsch, F., Marino, D., and Reichmann, E. (2016). About ATMPs, SOPs and GMP: The Hurdles to Produce Novel Skin Grafts for Clinical Use. *Transfus Med Hemother* 43, 344–352. doi: 10.1159/000447645.
- Heinz, A. (2021). Elastic fibers during aging and disease. *Ageing Res. Rev.* 66, 101255. doi: 10.1016/j.arr.2021.101255.
- Henriksen, N. A. (2016). Systemic and local collagen turnover in hernia patients. *Dan. Med. J.* 63, B5265.
- Hettiaratchy, S., and Dziewulski, P. (2004). ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ* 328, 1427–1429. doi: 10.1136/bmj.328.7453.1427.
- Hirobe, T., Enami, H., and Nakayama, A. (2021). The human melanocyte and melanoblast populations per unit area of epidermis in the rete ridge are greater than in the inter-rete ridge. *Int. J. Cosmet. Sci.* 43, 211–217. doi: 10.1111/ics.12682.
- Holmes, J. H., Schurr, M. J., King, B. T., Foster, K., Faucher, L. D., Lokuta, M. A., et al. (2019). An open-label, prospective, randomized, controlled, multicenter, phase 1b study of StrataGraft skin tissue versus autografting in patients with deep partial-thickness thermal burns. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 45, 1749–1758. doi: 10.1016/j.burns.2019.07.021.
- Honardoust, D., Varkey, M., Marcoux, Y., Shankowsky, H. A., and Tredget, E. E. (2012). Reduced decorin, fibromodulin, and transforming growth factor- β 3 in deep dermis leads to hypertrophic scarring. *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.* 33, 218–227. doi: 10.1097/BCR.0b013e3182335980.
- Hosseini, M., and Shafiee, A. (2021). Engineering Bioactive Scaffolds for Skin Regeneration. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 17, e2101384. doi: 10.1002/sml.202101384.
- Hosseini, M., Koehler, K. R., and Shafiee, A. (2022). Biofabrication of Human Skin with Its Appendages. *Adv. Healthc. Mater.* 11, e2201626. doi: 10.1002/adhm.202201626.
- Hsu, C.-K., Lin, H.-H., Harn, H. I.-C., Hughes, M. W., Tang, M.-J., and Yang, C.-C. (2018). Mechanical forces in skin disorders. *J. Dermatol. Sci.* 90, 232–240. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.004.
- Huang, J., Heng, S., Zhang, W., Liu, Y., Xia, T., Ji, C., et al. (2022). Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 128, 137–144. doi: 10.1016/j.semcdb.2022.02.027.
- Huggenberger, R., and Detmar, M. (2011). The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 15, 24–32. doi: 10.1038/jidsymp.2011.5.

- Ikonomou, L., Cuende, N., Forte, M., Grilley, B. J., Levine, A. D., Munsie, M., et al. (2023). International Society for Cell & Gene Therapy Position Paper: Key considerations to support evidence-based cell and gene therapies and oppose marketing of unproven products. *Cytotherapy* 25, 920–929. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.03.002.
- Ionescu, A. M., Chato-Astrain, J., Cardona Pérez, J. de la C., Campos, F., Pérez Gómez, M., Alaminos, M., et al. (2020). Evaluation of the optical and biomechanical properties of bioengineered human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *J. Biomed. Opt.* 25, 1–16. doi: 10.1117/1.JBO.25.5.055002.
- Ionescu, A.-M., Alaminos, M., de la Cruz Cardona, J., de Dios García-López Durán, J., González-Andrades, M., Ghinea, R., et al. (2011). Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4, 1963–1973. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.06.013.
- Irastorza-Lorenzo, A., Sánchez-Porras, D., Ortiz-Arrabal, O., de Frutos, M. J., Esteban, E., Fernández, J., et al. (2021). Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1923. doi: 10.3390/ijms22041923.
- Izeta, A., and Cuende, N. (2023). Regulation of advanced therapies in Europe: Are we on the right track? *Cell Stem Cell* 30, 1013–1016. doi: 10.1016/j.stem.2023.07.004.
- Jacob, J. T., Coulombe, P. A., Kwan, R., and Omary, M. B. (2018). Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a018275. doi: 10.1101/cshperspect.a018275.
- Jaimes-Parra, B. D., Valle-Díaz de la Guardia, F., Arrabal-Polo, M. Á., Herrera-Imbroda, B., Lara, M. F., Machuca-Santa-Cruz, F.-J., et al. (2016). Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* 23, 85–92. doi: 10.1111/iju.12963.
- Jiang, F., Xu, X.-W., Chen, F.-Q., Weng, H.-F., Chen, J., Ru, Y., et al. (2023). Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review. *Mar. Drugs* 21, 299. doi: 10.3390/md21050299.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol. EJD* 12, 390–399; quiz 400–401.
- Karppinen, S.-M., Heljasvaara, R., Gullberg, D., Tasanen, K., Pihlajaniemi, T., Uitto, J., et al. (2019). Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Res* 8. doi: 10.12688/f1000research.18293.1.
- Katsarou, S., Makris, M., Vakirlis, E., and Gregoriou, S. (2023). The Role of Tight Junctions in Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 12, 1538. doi: 10.3390/jcm12041538.
- Klar, A. S., Biedermann, T., Michalak, K., Michalczyk, T., Meuli-Simmen, C., Scherberich, A., et al. (2017). Human Adipose Mesenchymal Cells Inhibit Melanocyte Differentiation and the Pigmentation of Human Skin via Increased Expression of TGF- β 1. *J. Invest. Dermatol.* 137, 2560–2569. doi: 10.1016/j.jid.2017.06.027.
- Kobayasi, T., and Karlsmark, T. (2006). Type V and VI collagen for cohesion of dermal fibrillar structures. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 38, 103–108.
- Kondo, S., Tohgasaki, T., Shiga, S., Nishizawa, S., Ishiwatari, S., Ishikawa, S., et al. (2022). Elastin microfibril interface-located protein 1 and its catabolic enzyme, cathepsin K, regulate the age-related structure of elastic fibers in the skin. *J. Cosmet. Dermatol.* 21, 4796–4804. doi: 10.1111/jocd.14789.
- Kosho, T., Mizumoto, S., Watanabe, T., Yoshizawa, T., Miyake, N., and Yamada, S. (2019). Recent Advances in the Pathophysiology of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome. *Genes* 11, 43. doi: 10.3390/genes11010043.
- Kowalewski, C., Kozłowska, A., Górńska, M., Woźniak, K., Krajewski, M., Błaszczuk, M., et al. (2005). Alterations of basement membrane zone and cutaneous microvasculature in morphea and

- extragenital lichen sclerosis. *Am. J. Dermatopathol.* 27, 489–496. doi: 10.1097/01.dad.0000183679.40184.23.
- Kuo, W.-T., Odenwald, M. A., Turner, J. R., and Zuo, L. (2022). Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1514, 21–33. doi: 10.1111/nyas.14798.
- Lai-Cheong, J. E., Arita, K., and McGrath, J. A. (2007). Genetic diseases of junctions. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2713–2725. doi: 10.1038/sj.jid.5700727.
- Langer R; Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920–926. doi: 10.1126/SCIENCE.8493529.
- Lashen, A. G., Toss, M. S., Ghannam, S. F., Makhlof, S., Green, A., Mongan, N. P., et al. (2023). Expression, assessment and significance of Ki67 expression in breast cancer: an update. *J. Clin. Pathol.* 76, 357–364. doi: 10.1136/jcp-2022-208731.
- Lefèvre-Utile, A., Braun, C., Haftek, M., and Aubin, F. (2021). Five Functional Aspects of the Epidermal Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11676. doi: 10.3390/ijms222111676.
- Leider M (1949). On the weight of the skin - PubMed. *J Invest Dermatol* 12, 187–191.
- Lewitus, D. Y., Landers, J., Branch, J., Smith, K. L., Callegari, G., Kohn, J., et al. (2011). Biohybrid Carbon Nanotube/Agarose Fibers for Neural Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* 21, 2624–2632. doi: 10.1002/adfm.201002429.
- Li, H., Masieri, F. F., Schneider, M., Kotteck, T., Hahnel, S., Yamauchi, K., et al. (2020). Autologous, Non-Invasively Available Mesenchymal Stem Cells from the Outer Root Sheath of Hair Follicle Are Obtainable by Migration from Plucked Hair Follicles and Expandable in Scalable Amounts. *Cells* 9, 2069. doi: 10.3390/cells9092069.
- Lim, Y., and Ku, N.-O. (2021). Revealing the Roles of Keratin 8/18-Associated Signaling Proteins Involved in the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6401. doi: 10.3390/ijms22126401.
- Llames, S. G., Del Rio, M., Larcher, F., García, E., García, M., Escamez, M. J., et al. (2004). Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 77, 350–355. doi: 10.1097/01.TP.0000112381.80964.85.
- Mak, K. M., Png, C. Y. M., and Lee, D. J. (2016). Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* 299, 613–629. doi: 10.1002/ar.23330.
- Malfait, F. (2018). Vascular aspects of the Ehlers-Danlos Syndromes. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 71–72, 380–395. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.013.
- Mannino, G., Russo, C., Maugeri, G., Musumeci, G., Vicario, N., Tibullo, D., et al. (2022). Adult stem cell niches for tissue homeostasis. *J. Cell. Physiol.* 237, 239–257. doi: 10.1002/jcp.30562.
- Markiewicz-Gospodarek, A., Koziół, M., Tobiasz, M., Baj, J., Radzikowska-Büchner, E., and Przekora, A. (2022). Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 1338. doi: 10.3390/IJERPH19031338.
- Martín-Piedra, M. A., Alaminos, M., Fernández-Valadés-Gámez, R., España-López, A., Licerias-Licerias, E., Sánchez-Montesinos, I., et al. (2017). Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochem. Cell Biol.* 147, 377–388. doi: 10.1007/s00418-016-1489-5.
- Martin-Piedra, M. A., Alfonso-Rodríguez, C. A., Zapater, A., Durand-Herrera, D., Chato-Astrain, J., Campos, F., et al. (2019). Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* 37, 233–249. doi: 10.22203/eCM.v037a14.
- Martin-Piedra, M. A., Garzón, I., Gómez-Sotelo, A., Garcia-Abril, E., Jaimes-Parra, B. D., López-Cantarero, M., et al. (2017). Generation and Evaluation of Novel Stromal Cell-Containing Tissue Engineered Artificial Stromas for the Surgical Repair of Abdominal Defects. *Biotechnol. J.* 12. doi: 10.1002/biot.201700078.

- Masson-Meyers, D. S., and Tayebi, L. (2021). Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 15, 747–762. doi: 10.1002/term.3225.
- Meana, A., Iglesias, J., Del Rio, M., Larcher, F., Madrigal, B., Fresno, M. F., et al. (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 24, 621–630. doi: 10.1016/S0305-4179(98)00107-7.
- Merker, H. J. (1994). Morphology of the basement membrane. *Microsc. Res. Tech.* 28, 95–124. doi: 10.1002/jemt.1070280203.
- Metsalu, T., and Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43, W566–W570. doi: 10.1093/nar/gkv468.
- Momeni, M., Fallah, N., Bajouri, A., Bagheri, T., Orouji, Z., Pahlevanpour, P., et al. (2019). A randomized, double-blind, phase I clinical trial of fetal cell-based skin substitutes on healing of donor sites in burn patients. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 45, 914–922. doi: 10.1016/j.burns.2018.10.016.
- Mudera, V., Morgan, M., Cheema, U., Nazhat, S., and Brown, R. (2007). Ultra-rapid engineered collagen constructs tested in an in vivo nursery site. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 192–198. doi: 10.1002/term.25.
- Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., and Webster, T. J. (2017). A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* 12, 4937–4961. doi: 10.2147/IJN.S124671.
- Nyame, T. T., Chiang, H. A., Leavitt, T., Ozambela, M., and Orgill, D. P. (2015). Tissue-Engineered Skin Substitutes. *Plast. Reconstr. Surg.* 136, 1379–1388. doi: 10.1097/PRS.0000000000001748.
- Nyström, A., and Bruckner-Tuderman, L. (2019). Matrix molecules and skin biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 136–146. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.07.025.
- Oliveira, A. C., Garzón, I., Ionescu, A. M., Carriel, V., Cardona, J. de la C., González-Andrades, M., et al. (2013). Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One* 8, e66538. doi: 10.1371/journal.pone.0066538.
- Oliveira, A., Simões, S., Ascenso, A., and Reis, C. P. (2022). Therapeutic advances in wound healing. *J. Dermatol. Treat.* 33, 2–22. doi: 10.1080/09546634.2020.1730296.
- Oshima, R. G., Baribault, H., and Caulin, C. (1996). Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev.* 15, 445–471. doi: 10.1007/BF00054012.
- Oualla-Bachiri, W., Fernández-González, A., Quiñones-Vico, M. I., and Arias-Santiago, S. (2020). Molecular Sciences Review From Grafts to Human Bioengineered Vascularized Skin Substitutes. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi: 10.3390/ijms21218197.
- Oyen, M. L. (2014). Mechanical characterisation of hydrogel materials. <https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000022> 59, 44–59. doi: 10.1179/1743280413Y.0000000022.
- Palmieri, T. L., and Greenhalgh, D. G. (2002). Topical treatment of pediatric patients with burns: a practical guide. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 529–534. doi: 10.2165/00128071-200203080-00003.
- Pasierb, A., Jezierska, M., Karpuk, A., Czuwara, J., and Rudnicka, L. (2022). 3D skin bioprinting: future potential for skin regeneration. *Postepy Dermatol. Alergol.* 39, 845–851. doi: 10.5114/ada.2021.109692.
- Pasquali Ronchetti, I., Guerra, D., Quaglino, D., Vincenzi, D., Manzini, E., Canossi, B., et al. (1989). Dermal elastin and collagen in systemic sclerosis. Effect of D-penicillamine treatment. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7, 373–383.

- Passeron, T., Coelho, S. G., Miyamura, Y., Takahashi, K., and Hearing, V. J. (2007). Immunohistochemistry and in situ hybridization in the study of human skin melanocytes. *Exp. Dermatol.* 16, 162–170. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00538.x.
- Peschen, M., Grenz, H., Lahayé, T., Brand-Saberi, B., Simon, J. C., Schöpf, E., et al. (1997). Changes of cytokeratin expression in the epidermis with chronic venous insufficiency. *VASA Z. Gefasskrankheiten* 26, 76–80.
- Presland, R. B., and Dale, B. A. (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 11, 383–408. doi: 10.1177/10454411000110040101.
- Raghunath, M., and Meuli, M. (1997). Cultured epithelial autografts: diving from surgery into matrix biology. *Pediatr. Surg. Int.* 12, 478–483. doi: 10.1007/BF01258706.
- Rakhorst, H. A., Posthumus-Van Sluijs, S. J., Tra, W. M. W., Van Neck, J. W., Van Osch, G. J. V. M., Hovius, S. E. R., et al. (2006). Fibroblasts accelerate culturing of mucosal substitutes. *Tissue Eng.* 12, 2321–2331. doi: 10.1089/ten.2006.12.2321.
- Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2014). <https://www.boe.es/eli/es/rd/2014/06/13/477>.
- Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2002). The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* 19, 249–255. doi: 10.1023/A:1025383913444.
- Reglamento (CE) n° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifican la D. 2001/83/CE y el R. (CE) n° 726/2004. Reglamento (CE) n° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) n° 726/2004. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2007-82262>.
- Reiss, M., Büttel, I. C., and Schneider, C. K. (2011). [Report from the Committee for Advanced Therapies (CAT). Pitfalls on the way from concept to medical treatment with advanced therapy medicinal products]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 54, 822–830. doi: 10.1007/S00103-011-1304-3.
- Rico-Sánchez, L., Garzón, I., González-Andrades, M., Ruíz-García, A., Punzano, M., Lizana-Moreno, A., et al. (2019). Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 2142–2154. doi: 10.1002/term.2951.
- Rodriguez, M. A., López-López, M. T., Durán, J. D. G., Alaminos, M., Campos, A., and Rodriguez, I. A. (2013). Cryopreservation of an artificial human oral mucosa stroma. A viability and rheological study. *Cryobiology* 67, 355–362. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.10.003.
- Rodriguez-Pozo, J. A., Ramos-Lopez, J. F., Gonzalez-Gallardo, M. C., Campos, F., Sanchez-Porrás, D., Oyonarte, S., et al. (2020). Evaluation of myopic cornea lenticules. A histochemical and clinical correlation. *Exp. Eye Res.* 196, 108066. doi: 10.1016/j.exer.2020.108066.
- Roig-Rosello, E., and Rousselle, P. (2020). The Human Epidermal Basement Membrane: A Shaped and Cell Instructive Platform That Aging Slowly Alters. *Biomolecules* 10, 1607. doi: 10.3390/biom10121607.
- Rollins-Raval, M., Chivukula, M., Tseng, G. C., Jukic, D., and Dabbs, D. J. (2011). An immunohistochemical panel to differentiate metastatic breast carcinoma to skin from primary sweat gland carcinomas with a review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 975–983. doi: 10.5858/2009-0445-OAR2.
- Ross, M. H., and Pawlina, W. (2007). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana.

- Rousselle, P., Laigle, C., and Rousselet, G. (2022). The basement membrane in epidermal polarity, stemness, and regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 323, C1807–C1822. doi: 10.1152/ajpcell.00069.2022.
- Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. A., Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S., et al. (2015). Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit. Care Lond. Engl.* 19, 243. doi: 10.1186/s13054-015-0961-2.
- Ruiz-López, J., Cardona, J. C., Garzón, I., Pérez, M. M., Alaminos, M., Chato-Astrain, J., et al. (2022). Optical Behavior of Human Skin Substitutes: Absorbance in the 200-400 nm UV Range. *Biomedicines* 10, 1640. doi: 10.3390/biomedicines10071640.
- Safina, I., Childress, L. T., Myneni, S. R., Vang, K. B., and Biris, A. S. (2022). Cell-Biomaterial constructs for wound healing and skin regeneration. *Drug Metab. Rev.* 54, 63–94. doi: 10.1080/03602532.2021.2025387.
- Saito, A. C., Higashi, T., and Chiba, H. (2023). Tight-junction strand networks and tightness of the epithelial barrier. *Microsc. Oxf. Engl.* 72, 213–225. doi: 10.1093/jmicro/dfad008.
- Sakamoto, M., Minaki, Y., Nakano, T., Tsuge, I., Yamanaka, H., Sowa, Y., et al. (2023). A novel approach for wound treatment using dried cultured epidermal allograft: A phase I/II, single-center, open-label clinical trial. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 49, 1079–1086. doi: 10.1016/j.burns.2022.10.006.
- Salati, M. A., Khazai, J., Tahmuri, A. M., Samadi, A., Taghizadeh, A., Taghizadeh, M., et al. (2020). Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering. *Polymers* 12. doi: 10.3390/polym12051150.
- Sánchez-Porras, D., Durand-Herrera, D., Carmona, R., Blanco-Elices, C., Garzón, I., Pozzobon, M., et al. (2023). Expression of Basement Membrane Molecules by Wharton Jelly Stem Cells (WJSC) in Full-Term Human Umbilical Cords, Cell Cultures and Microtissues. *Cells* 12, 629. doi: 10.3390/cells12040629.
- Santisteban-Espejo, A., Campos, F., Martín-Piedra, L., Durand-Herrera, D., Moral-Munoz, J. A., Campos, A., et al. (2018). Global Tissue Engineering Trends: A Scientometric and Evolutive Study. *Tissue Eng. Part A* 24, 1504–1517. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0007.
- Sanz Ressel, B. L., Massone, A. R., and Barbeito, C. G. (2021). Expression of the epidermal stem cell marker p63/CK5 in cutaneous papillomas and cutaneous squamous cell carcinomas of dogs. *Res. Vet. Sci.* 135, 366–370. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.018.
- Schmelzer, C. E. H., and Duca, L. (2022). Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. *FEBS J.* 289, 3704–3730. doi: 10.1111/febs.15899.
- Schwager, S., and Detmar, M. (2019). Inflammation and Lymphatic Function. *Front. Immunol.* 10, 308. doi: 10.3389/fimmu.2019.00308.
- Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., Osorio, R., Durán, J. D. G., Alaminos, M., et al. (2014). Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 2573–2582. doi: 10.1002/JBM.A.34929.
- Segal, N., Andriani, F., Pfeiffer, L., Kamath, P., Lin, N., Satyamurthy, K., et al. (2008). The basement membrane microenvironment directs the normalization and survival of bioengineered human skin equivalents. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 27, 163–170. doi: 10.1016/j.matbio.2007.09.002.
- Selahi, A., and Jain, A. (2023). Engineered models of the lymphatic vascular system: Past, present, and future. *Microcirc. N. Y. N 1994* 30, e12793. doi: 10.1111/micc.12793.
- Senoo, M. (2013). Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin. *Adv. Wound Care* 2, 273–282. doi: 10.1089/wound.2012.0372.
- Shah, N. R., Palackic, A., Brondeel, K. C., Walters, E. T., and Wolf, S. E. (2023). The Burn Wound. *Surg. Clin. North Am.* 103, 453–462. doi: 10.1016/j.suc.2023.01.007.

- Shen, Z., Sun, L., Liu, Z., Li, M., Cao, Y., Han, L., et al. (2023). Rete ridges: Morphogenesis, function, regulation, and reconstruction. *Acta Biomater.* 155, 19–34. doi: 10.1016/j.actbio.2022.11.031.
- Sherman, V. R., Yang, W., and Meyers, M. A. (2015). The materials science of collagen. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 52, 22–50. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.05.023.
- Shin, J.-W., Kwon, S.-H., Choi, J.-Y., Na, J.-I., Huh, C.-H., Choi, H.-R., et al. (2019). Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2126. doi: 10.3390/ijms20092126.
- Simmons, P., McElroy, T., and Allen, A. R. (2020). A Bibliometric Review of Artificial Extracellular Matrices Based on Tissue Engineering Technology Literature: 1990 through 2019. *Mater. Basel Switz.* 13, 2891. doi: 10.3390/ma13132891.
- Skobe, M., and Detmar, M. (2000). Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 14–19. doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00001.x.
- Sood, R., Roggy, D. E., Zieger, M. J., Nazim, M., Hartman, B. C., and Gibbs, J. T. (2015). A comparative study of spray keratinocytes and autologous meshed split-thickness skin graft in the treatment of acute burn injuries. *Wounds Compend. Clin. Res. Pract.* 27, 31–40.
- Stokes, D. L. (2007). Desmosomes from a structural perspective. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 565–571. doi: 10.1016/j.ceb.2007.09.003.
- Su, T., Zhang, M., Zeng, Q., Pan, W., Huang, Y., Qian, Y., et al. (2021). Mussel-inspired agarose hydrogel scaffolds for skin tissue engineering. *Bioact. Mater.* 6, 579–588. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.004.
- Subramaniam, T., Shaiful Hadi, N., Sulaiman, S., Fauzi, M. B., Hj Idrus, R. B., Chowdhury, S. R., et al. (2022). Comparison of three different skin substitutes in promoting wound healing in an ovine model. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 48, 1198–1208. doi: 10.1016/j.burns.2021.08.012.
- Sun, F., Lu, Y., Wang, Z., and Shi, H. (2021). Vascularization strategies for tissue engineering for tracheal reconstruction. *Regen. Med.* 16, 549–566. doi: 10.2217/rme-2020-0091.
- Supp, D. M., Hahn, J. M., Lloyd, C. M., Combs, K. A., Swope, V. B., Abdel-Malek, Z., et al. (2020). Light or Dark Pigmentation of Engineered Skin Substitutes Containing Melanocytes Protects Against Ultraviolet Light-Induced DNA Damage In Vivo. *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.* 41, 751–760. doi: 10.1093/jbcr/iraa029.
- Tracy, L. E., Minasian, R. A., and Caterson, E. J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv. Wound Care* 5, 119–136. doi: 10.1089/wound.2014.0561.
- Uhlig, R., Abboud, M., Gorbokon, N., Lennartz, M., Dwertmann Rico, S., Kind, S., et al. (2022). Cytokeratin 10 (CK10) expression in cancer: A tissue microarray study on 11,021 tumors. *Ann. Diagn. Pathol.* 60, 152029. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2022.152029.
- Ungureanu, A. R., Ioniță, D., Drăghici, L., Andrei, D., Enescu, D. M., and Drăghici, I. M. (2014). The impact of melanocytic cell destruction in pediatric facial burns and plastic surgery therapeutic management. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* 55, 1215–1219.
- Urmacher, C. (1990). Histology of normal skin. *Am. J. Surg. Pathol.* 14, 671–686. doi: 10.1097/0000478-199007000-00008.
- Vela-Romera, A., Carriel, V., Martín-Piedra, M. A., Aneiros-Fernández, J., Campos, F., Chato-Astrain, J., et al. (2019). Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. *Histochem. Cell Biol.* 151, 57–73. doi: 10.1007/s00418-018-1701-x.
- Vidor, S. B., Terraciano, P. B., Valente, F. S., Rolim, V. M., Kuhl, C. P., Ayres, L. S., et al. (2018). Adipose-derived stem cells improve full-thickness skin grafts in a rat model. *Res. Vet. Sci.* 118, 336–344. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.03.014.

- Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S., et al. (2017). Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi: 10.3390/IJMS18040789.
- Viñuela-Prieto, J. M., Sánchez-Quevedo, M. C., Alfonso-Rodríguez, C. A., Oliveira, A. C., Scionti, G., Martín-Piedra, M. A., et al. (2015). Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. *J. Periodontal Res.* 50, 658–665. doi: 10.1111/jre.12247.
- Warby, R., and Maani, C. V. (2023). “Burn Classification,” in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539773/>
- Welsch, U. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Woźniak, K., and Kowalewski, C. (2005). Alterations of basement membrane zone in autoimmune subepidermal bullous diseases. *J. Dermatol. Sci.* 40, 169–175. doi: 10.1016/j.jdermsci.2005.05.002.
- Wu, W., Li, X., Zuo, G., Pu, J., Wu, X., and Chen, S. (2018). The Role of Angiogenesis in Coronary Artery Disease: A Double-Edged Sword: Intraplaque Angiogenesis in Physiopathology and Therapeutic Angiogenesis for Treatment. *Curr. Pharm. Des.* 24, 451–464. doi: 10.2174/1381612824666171227220815.
- Xiong, X., Wu, T., and He, S. (2013). Physical forces make rete ridges in oral mucosa. *Med. Hypotheses* 81, 883–886. doi: 10.1016/j.mehy.2013.07.005.
- Xu, Y., Peng, J., Dong, X., Xu, Y., Li, H., and Chang, J. (2017). Combined chemical and structural signals of biomaterials synergistically activate cell-cell communications for improving tissue regeneration. *Acta Biomater.* 55, 249–261. doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.056.
- Yan, B., Liu, N., Li, J., Li, J., Zhu, W., Kuang, Y., et al. (2020). The role of Langerhans cells in epidermal homeostasis and pathogenesis of psoriasis. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 11646–11655. doi: 10.1111/jcmm.15834.
- Yang, R., Yang, S., Zhao, J., Hu, X., Chen, X., Wang, J., et al. (2020). Progress in studies of epidermal stem cells and their application in skin tissue engineering. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 303. doi: 10.1186/s13287-020-01796-3.
- Yoon, D., Cho, Y. S., Joo, S. Y., Seo, C. H., and Cho, Y. S. (2020). A clinical trial with a novel collagen dermal substitute for wound healing in burn patients. *Biomater. Sci.* 8, 823–829. doi: 10.1039/c9bm01209e.
- Yurchenco, P. D., and O’Rear, J. J. (1994). Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 674–681. doi: 10.1016/0955-0674(94)90093-0.
- Zarrintaj, P., Manouchehri, S., Ahmadi, Z., Saeb, M. R., Urbanska, A. M., Kaplan, D. L., et al. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* 187, 66–84. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2018.01.060.
- Zerbinati, N., and Calligaro, A. (2018). Calcium hydroxylapatite treatment of human skin: evidence of collagen turnover through picosirius red staining and circularly polarized microscopy. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 11, 29–35. doi: 10.2147/CCID.S143015.
- Zhang, X., Alanazi, Y. F., Jowitt, T. A., Roseman, A. M., and Baldock, C. (2022). Elastic Fibre Proteins in Elastogenesis and Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4087. doi: 10.3390/ijms23084087.