

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E  
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE  
MUCOSA ORAL HUMANA.**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**



Tesis doctoral de:

**Miguel Ibáñez Cortés**

Realizado bajo la dirección de:

**Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello**

**Dr. Jesús Chato Astrain**

**2024**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Miguel Ibáñez Cortés  
ISBN: 978-84-1195-335-1  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92544>

# **CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MUCOSA ORAL HUMANA.**

Memoria presentada por **D. Miguel Ibáñez Cortés**, graduado en Biotecnología y  
Máster en Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas para aspirar al título de  
**Doctor por la Universidad de Granada dentro del Programa de Doctorado en  
Biomedicina**

**Fdo.: Miguel Ibáñez Cortés**

**Fdo.: Dra Ingrid Johanna Garzón Bello**

Doctora en Ingeniería Tisular  
Universidad de Granada, España

**Fdo.: Dr Jesús Chato Astrain**

Doctor en Biomedicina  
Universidad de Granada, España

**Departamento de Histología  
Universidad de Granada**

**2024**

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

- Proyectos FIS PI21/00980, PI18/0331 y ICI19/00024 financiados por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica Española (I+D+i) del Ministerio de Ciencia e Innovación Española (Instituto de Salud Carlos III).
- Subvención CSyF PI-0442-2019 financiada por la Conserjería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, España y cofinanciada con fondos FEDER, Unión Europea.

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

**Ibáñez-Cortés, M.**, Martín-Piedra, M. Á., Blanco-Elices, C., García-García, Ó. D., España-López, A., Fernández-Valadés, R., Sánchez-Quevedo, M. D. C., Alaminos, M., Chato-Astrain, J., & Garzón, I. (2023). Histological characterization of the human masticatory oral mucosa. A histochemical and immunohistochemical study. *Microscopy research and technique*, 10.1002/jemt.24398. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/jemt.24398> **Factor de Impacto: 2.5; Cuartil: Q1; Percentil: 81.3**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al profesor catedrático emérito Antonio Campos Muñoz por el legado que ha creado durante todos estos años en el campo de la Biomedicina, de la Histología y de la Ingeniería Tisular, habiéndome dejado participar en él. También, agradecer a la profesora catedrática María del Carmen Sánchez Quevedo cuyos conocimientos en histología bucodental y microscopía electrónica han sido claves a la hora de desarrollar la presente tesis doctoral.

Hacer otra mención especial a mi directora de tesis Ingrid Garzón Bello, por creer en mí desde el primer momento y no cortarme nunca las alas a la hora de investigar. Al igual que mi director Jesús Chato Astrain, por levantarme y mostrar siempre ese entusiasmo a la hora de plantearle mis inquietudes o ideas que tantas ganas tenía de llevar a cabo.

Agradecer al profesorado del máster de Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas, en especial a Miguel Alaminos, Sebastián Carriel y Fernando Campos por todos los conocimientos transmitidos. También a mis compañeros del departamento, David y Óscar, y especialmente a Olimpia y Fabi, por todo el apoyo que me habéis dado sin necesidad alguna y por amenizarme todas las horas que he pasado en este departamento. Eternamente, gracias.

Agradecer a la empresa Vitro S.A. donde actualmente estoy creciendo profesionalmente. En especial a Asunción Olmo y Mercedes Herrera, por haber creído en mí desde el primer momento. A la gente tan bonita que me llevo como Eva, Blanca, Aurora, José, Ramón, Noelia, Miriam, Juanjo y Paula por todo vuestro apoyo y hacerme sonreír a diario, acompañándome siempre aquí en Granada.

A mis amigos de Almería, en especial a Lorena y Alicia, que tan orgullosas os sentís de ver como vuestro amigo de tantos años da un paso más creciendo como doctor. Vuestra paciencia vale oro y no hay palabras para agradeceros todo lo que hacéis por mí.

Finalmente, y no menos importante, agradecer a mis padres, Miguel y Teresa, y a mis hermanas Tania y Tere, porque gracias a todos vosotros soy quién soy. Por darme desde que nací todo lo que tenéis y por todos los valores que me habéis inculcado. A mi padre, la constancia y la perseverancia y, a mi madre, la bondad y humanidad. Os volvería a elegir una y otra vez en todas las vidas que viviese.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1. Cavidad oral humana.....	3
2. Mucosa oral humana.....	4
2.1 Histología general de la mucosa oral humana.....	4
2.2 Tejido epitelial de la mucosa oral humana.....	5
2.2.1 Generalidades y funciones del tejido epitelial.....	5
2.2.2 Composición y organización del tejido epitelial.....	6
2.3 Membrana basal de la mucosa oral humana.....	20
2.3.1 Generalidades y funciones de la membrana basal.....	20
2.3.2 Composición y organización de la membrana basal.....	20
2.4 Tejido conectivo de la mucosa oral humana.....	22
2.4.1 Generalidades y funciones del tejido conectivo.....	22
2.4.2 Composición y organización del tejido conectivo.....	23
2.5 Submucosa de la mucosa oral humana.....	28
2.5.1 Generalidades y funciones de la submucosa.....	28
2.5.2 Composición y organización de la submucosa.....	29
3. Clasificación de la mucosa oral humana.....	30
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
1. Obtención de muestras de mucosa oral humana masticatoria.....	34
2. Análisis histológico.....	34
2.1 Microscopía óptica.....	35
2.2. Microscopía electrónica de barrido.....	35
3. Análisis histoquímico.....	36
4. Análisis inmunohistoquímico.....	39
5. Análisis cuantitativo.....	42
6. Análisis estadístico.....	43
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
1. Análisis histológico e histomorfológico del tejido epitelial de la mucosa oral humana.....	44
2. Caracterización inmunohistoquímica de los componentes epiteliales de la mucosa oral humana.....	47
3. Caracterización de la membrana basal de la mucosa oral humana.....	51

4. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico de los componentes de la matriz extracelular en el tejido conectivo de la mucosa oral humana -----	52
5. Análisis de los vasos sanguíneos y de la densidad celular del tejido conectivo de la mucosa oral humana.....	54
<b>DISCUSIÓN</b> -----	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES</b> -----	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> -----	<b>67</b>

## RESUMEN

La cavidad oral está tapizada en todas sus áreas anatómicas por mucosa oral. La mucosa oral está compuesta histológicamente por un tejido epitelial unido al tejido conectivo a través de una membrana basal. La mucosa oral que recubre la cavidad oral humana difiere en cuanto a sus características funcionales y microscópicas dependiendo del área anatómica en la que se encuentre. En este sentido, los estudios de caracterización histológica de la mucosa oral que determinen las características y diferencias histológicas son escasos y se requiere su estudio en profundidad. Es por ello por lo que en la presente Tesis Doctoral se ha realizado una caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica para determinar dichas características y diferencias microscópicas entre la mucosa oral paraqueratinizada (MOP) y mucosa oral ortoqueratinizada (MOO), estudiando pormenorizadamente el tejido epitelial, la membrana basal y el tejido conectivo subyacente que configuran la mucosa oral. La presente Tesis Doctoral constituye un avance en el conocimiento de las características histológicas de la mucosa oral humana y, por tanto, favorecerá la comprensión de las patologías que puedan afectar a la MOP y MOO. Además, el conocimiento histológico derivado de la presente Tesis Doctoral será de gran importancia en el desarrollo de nuevos tratamientos basados en Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas.

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se requirió de la utilización de muestras de MOP y MOO de pacientes sanos que fueron procesadas para su análisis histológico con el objetivo de determinar las diferentes características microscópicas entre ellas.

Los hallazgos de la presente Tesis Doctoral demostraron la presencia de diferencias histológicas entre la MOP y MOO. Con respecto al tejido epitelial, la MOP mostró mayor grosor en comparación con la MOO debido al mayor número de células en el estrato espinoso. Así mismo, se encontraron diferencias en los patrones de expresión fenotípica de diversos marcadores analizados por inmunohistoquímica. En el tejido epitelial, se observaron diferencias en expresión de marcadores de diferenciación y proliferación celular. Concretamente, se detectó una menor intensidad de señal de citoqueratina 10 y filagrina en las muestras de MOP, proteínas involucradas en la maduración de las células epiteliales, acompañada así mismo de un mayor número de células Ki67 positivas en comparación con la MOO. Respecto a la membrana basal, no se hallaron diferencias

entre la MOP y la MOO. Finalmente, con respecto al tejido conectivo, la MOO mostró mayor cantidad de colágeno y proteoglicanos que la MOP.

De este modo, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral ponen de relieve la importancia del conocimiento de las características histológicas de la mucosa oral masticatoria ortoqueratinizada y paraqueratinizada y fijan un nuevo estándar de calidad para la fabricación de mucosa oral artificial masticatoria con características específicas de MOP y MOO para su potencial traslación clínica.

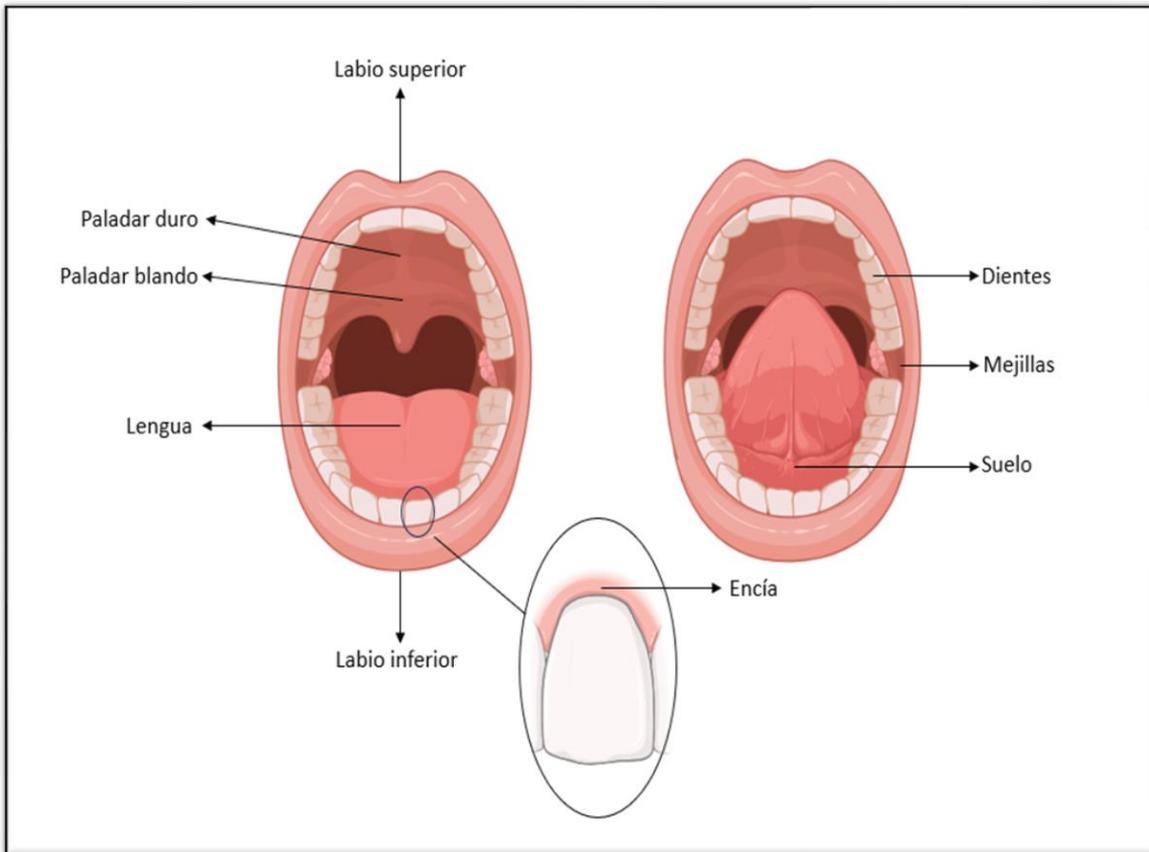
## INTRODUCCIÓN

### 1. Cavidad oral humana

La cavidad oral humana es parte del sistema digestivo y se encuentra delimitada por los labios en la zona anterior, por la orofaringe en la zona posterior, por el paladar duro y blando en la zona superior y por la lengua y suelo de la boca en la zona inferior. Además, la cavidad oral contiene 32 dientes, que en conjunto pueden denominarse piezas dentales, todos ellos unidos a la encía [1, 2].

Funcionalmente, la cavidad oral forma parte del sistema estomatognático, el cual se encarga de integrar y coordinar las estructuras óseas, musculares, nerviosas, dentales y glandulares con el fin de llevarse a cabo las funciones iniciales de la digestión. Las etapas de la digestión son la masticación, la salivación, la degustación, la degradación de carbohidratos y la deglución del alimento [2]. Además, la cavidad oral también participa en otras funciones como son la respiración, el bostezo, la tos, el estornudo, el vómito, la modulación fonética y la gesticulación bucofacial. En este sentido, la cavidad oral está compuesta por diversos órganos como los labios, el suelo de la boca, las mejillas, la lengua, los dientes, la encía, el paladar duro y el paladar blando. Todos los órganos encontrados en la cavidad oral participan en el proceso inicial de la digestión formando parte esencial del proceso de masticación. El proceso de masticación tiene como objetivo principal llevar a cabo tanto la digestión mecánica como la química del alimento. La digestión mecánica consiste en la formación del bolo alimenticio por la acción de las piezas dentales mientras que la digestión química es llevada a cabo por la secreción de las enzimas de la saliva por las glándulas submandibulares y sublinguales sobre el alimento [2, 3]. El proceso de masticación inicia con las piezas dentales que cortan y trituran el alimento en pequeños fragmentos, tamaño adecuado para que se dé la digestión. A su vez, la lengua va comprimiendo y presionando el alimento contra el paladar duro, dando lugar a la formación del bolo alimenticio. Además, la lengua participa en el proceso sensorial gustativo al contener botones y papilas gustativas, y en la fonación. Finalmente, el paladar duro y el paladar blando actúan como barrera

mecánica separando a la cavidad oral del sistema respiratorio, y, por ende, permiten comer y respirar de manera independiente [3] (Figura 1).



**Figura 1. Esquema ilustrativo de la cavidad oral humana.** En la imagen se muestran los distintos órganos que forman parte de la cavidad oral. Figura diseñada con el software BioRender.

## 2. Mucosa oral humana

En este apartado se describirá de una manera breve y concisa las características histológicas propias de la mucosa oral humana. Se comenzará con una descripción general de la mucosa oral humana para posteriormente describirla en profundidad.

### 2.1 Histología general de la mucosa oral humana

Todos los órganos que forman parte de la cavidad oral se encuentran tapizados por mucosa oral. Histológicamente, la mucosa oral humana está compuesta por dos tejidos de diferente origen embriológico, un tejido epitelial formado principalmente por células epiteliales de origen ectodérmico, y un tejido conectivo subyacente formado principalmente por fibroblastos de origen ectomesenquimático. Tanto el tejido epitelial como el tejido conectivo se mantienen sinérgicamente anclados y unidos por una membrana basal, y, a su vez, ambos tejidos son unidos a otros tejidos circundantes mediante la submucosa [4, 5] (Figura 2).

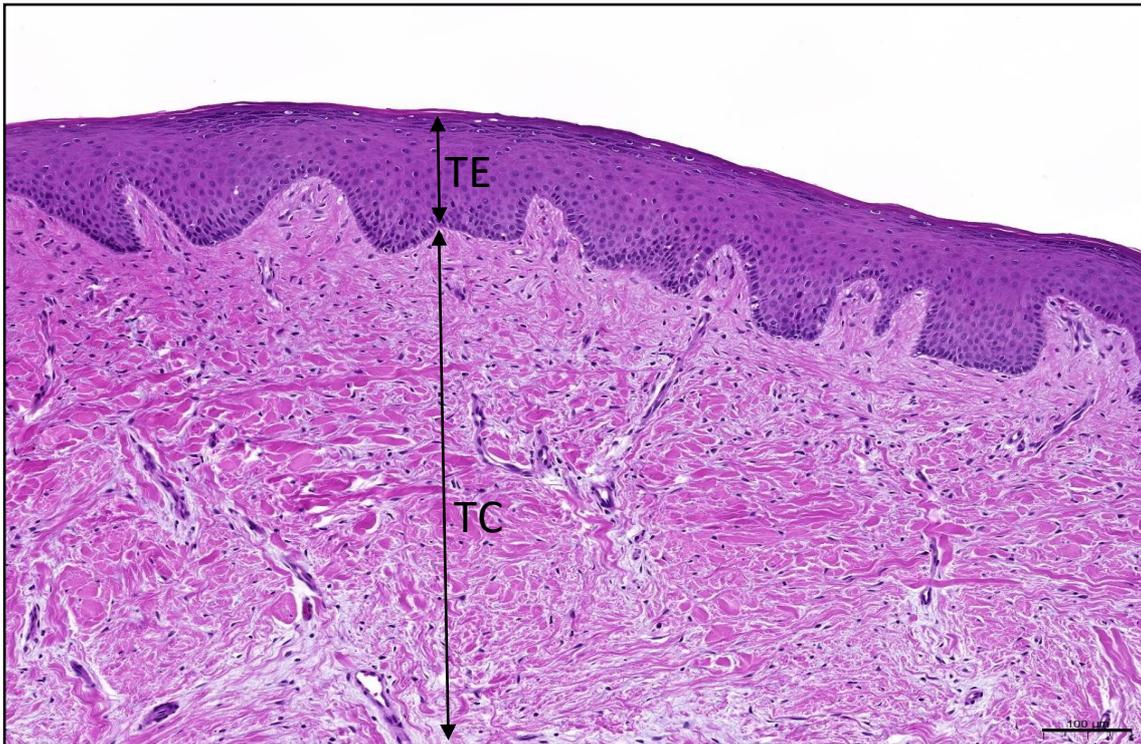


Figura 2. Imagen histológica de microscopía óptica de la estructura típica de la mucosa oral humana teñida con hematoxilina-eosina. En la parte superior de la muestra se observa el tejido epitelial (TE) de carácter basófilo unido al tejido conectivo (TC) subyacente de carácter acidófilo mediante la membrana basal. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## 2.2 Tejido epitelial de la mucosa oral humana

En los siguientes apartados, se describirá de manera concisa las generalidades, funciones, composición y organización del tejido epitelial de la mucosa oral humana.

### 2.2.1 Generalidades y funciones del tejido epitelial

El tejido epitelial es aquel que se encuentra tapizando la cavidad oral partiendo en embriogénesis del ectodermo. Además, se encuentra en íntimo contacto con la superficie libre de la cavidad oral siendo un tejido avascular compuesto mayoritariamente por células que recubren y tapizan las superficies externas del organismo, así como las cavidades y conductos internos cerrados. Funcionalmente, el tejido epitelial ejerce como barrera natural y estructural que protege contra el estrés mecánico como es el caso del movimiento masticatorio y la entrada de sustancias externas o microorganismos patógenos. A su vez, el tejido epitelial tiene la capacidad de servir como una barrera impermeable que evita la pérdida de fluidos del interior del organismo. Por otro lado, el tejido epitelial participa como porción secretora de las

glándulas salivares y en la recepción sensorial del gusto debido a células epiteliales especializadas localizadas en las papilas gustativas [2, 3].

### **2.2.2 Composición y organización del tejido epitelial**

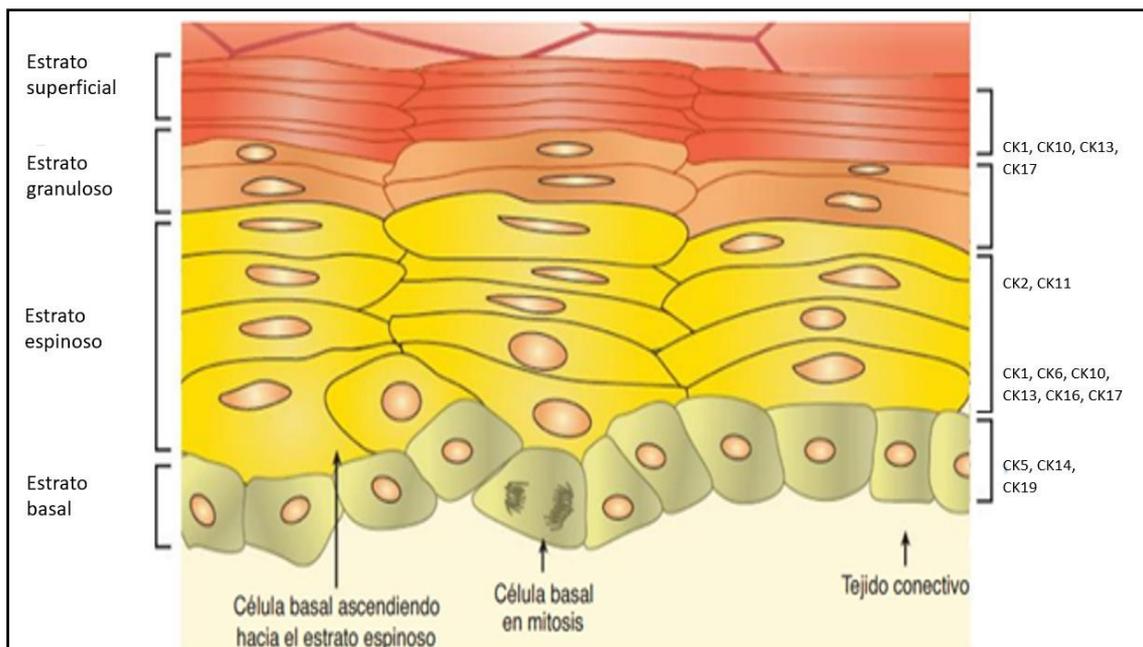
En este apartado se describirán los diversos tipos celulares existentes en el tejido epitelial, profundizando en el grupo mayoritario, las células epiteliales, cuya proliferación da lugar a la organización del tejido epitelial en diferentes capas epiteliales.

De manera genérica, el tejido epitelial está compuesto aproximadamente en un 90% por células epiteliales y en un 10% por un grupo minoritario de células no epiteliales. El grupo de células minoritarias a su vez se puede clasificar en células permanentes, que conforman el 9% del total, y células transitorias, que conforman el 1% restante [2]. Pese a que las células no epiteliales son cuantitativamente secundarias, desempeñan funciones tan importantes como la protección contra los efectos nocivos de la luz ultravioleta y la protección inmunológica en el propio tejido epitelial. Más concretamente, dentro de las células permanentes se encuentran los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel. Los melanocitos se encargan de amortiguar el efecto negativo de la luz ultravioleta, las células de Langerhans de presentar antígenos en los nódulos linfáticos para dar lugar a la respuesta inflamatoria y las células de Merkel de la transducción de señales mecano-sensitivas y neuroendocrinas [6-8]. Por otro lado, dentro de las células transitorias se encuentran monocitos, linfocitos y granulocitos que forman parte de la respuesta inflamatoria ante patógenos externos y participan además en la reparación y regeneración de tejidos [9].

Sin embargo, pese a la importancia de las células no epiteliales debido a la función que cumplen, se describirán profundamente las células epiteliales que componen el 90% restante del total celular. En este sentido, las células epiteliales se encuentran estrechamente unidas entre sí dando lugar al tejido epitelial. Una de las principales funciones de las células epiteliales es la de crear las diferentes capas del tejido epitelial comenzando desde la capa más profunda denominada estrato basal, hasta las capas más superficiales denominadas en conjunto estratos suprabasales y más concretamente, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato superficial [2, 10] . Además, una de las principales características de las células epiteliales es que se ven sometidas constantemente a un proceso de queratinización a medida que van ascendiendo por las

diferentes capas del tejido epitelial [11, 12]. El proceso de queratinización consiste en la expresión y ensamblaje de unas proteínas que forman parte del citoesqueleto de las células epiteliales denominadas citoqueratinas (CK). Las CK son proteínas de filamento intermedio cuyos polipéptidos se clasifican en CK del tipo I y CK del tipo II atendiendo al peso molecular y punto isoeléctrico. Las CK del tipo I son aquellas que poseen un punto isoeléctrico ácido y varían desde los 40 hasta los 56,5 kilodaltons (KDa) encontrándose en dicho grupo la CK9, CK10, CK11, CK12, CK13, CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19 y CK20. Por otro lado, las CK del tipo II son aquellas con un punto isoeléctrico básico y un peso molecular que ronda entre los 52 a los 67 KDa encontrándose en este grupo la CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7 y CK8 [13, 14]. Como regla general, los polipéptidos de CK se ensamblan en parejas específicas, concretamente, un polipéptido de CK del tipo I se alinea y se ensambla con un polipéptido de CK del tipo II dando lugar a un heterodímero. Consecuentemente, tiene lugar una alineación y asociación de dos heterodímeros, dando lugar a tetrámeros. A su vez, los tetrámeros siguen uniéndose entre ellos formando protofilamentos cuya asociación dan lugar al filamento intermedio de queratina (FIQ), que puede llegar a tener entre 20000 y 30000 polipéptidos de CK. Todo este proceso de ensamblaje comienza en la envoltura nuclear siguiendo la elongación del FIQ en el citoplasma y en la membrana plasmática [14]. Además, son diversas las funciones que cumplen las CK en las células y se pueden clasificar en funciones mecano-estructurales y en no mecánicas. Dentro de las funciones mecano-estructurales destaca la influencia de las CK en la arquitectura, así como en la polaridad y forma celular de las células epiteliales ya que las CK proveen un andamio a las células epiteliales y a los tejidos donde se expresan para soportar y amortiguar el estrés mecánico y la presión hidrostática manteniendo la integridad celular [14]. Además, las CK permiten la unión permanente entre células epiteliales adyacentes mediante uniones complejas por desmosomas que favorecen la unión de las CK de una célula epitelial con su propio citoesqueleto y con otra CK de su célula vecina aumentando así la resistencia mecánica del tejido epitelial. Por otro lado, las funciones no mecánicas llevadas a cabo por las CK son la señalización, compartimentalización, transporte y diferenciación celular. Un claro ejemplo es la influencia de las CK en la actividad mitótica y proliferación de las células epiteliales ya que se ve controlada por la expresión de CK5 y CK14 que aumenta el estado proliferativamente activo de las células epiteliales, mientras que la expresión de CK10

produce el efecto contrario dando lugar a una inhibición de la proliferación celular [15]. Otro ejemplo es el de la expresión de CK17, que puede regular la síntesis proteica y el crecimiento celular en tejidos epiteliales dañados al unirse a moléculas señalizadoras [15] (Figura 3). Dadas las diversas funciones que cumplen las CK en el tejido epitelial, estudios recientes en mucosa oral han reportado la importancia del análisis de las CK y del patrón de expresión de CK en el tejido epitelial para el correcto entendimiento y caracterización de la mucosa oral humana y artificial producida por Ingeniería Tisular.

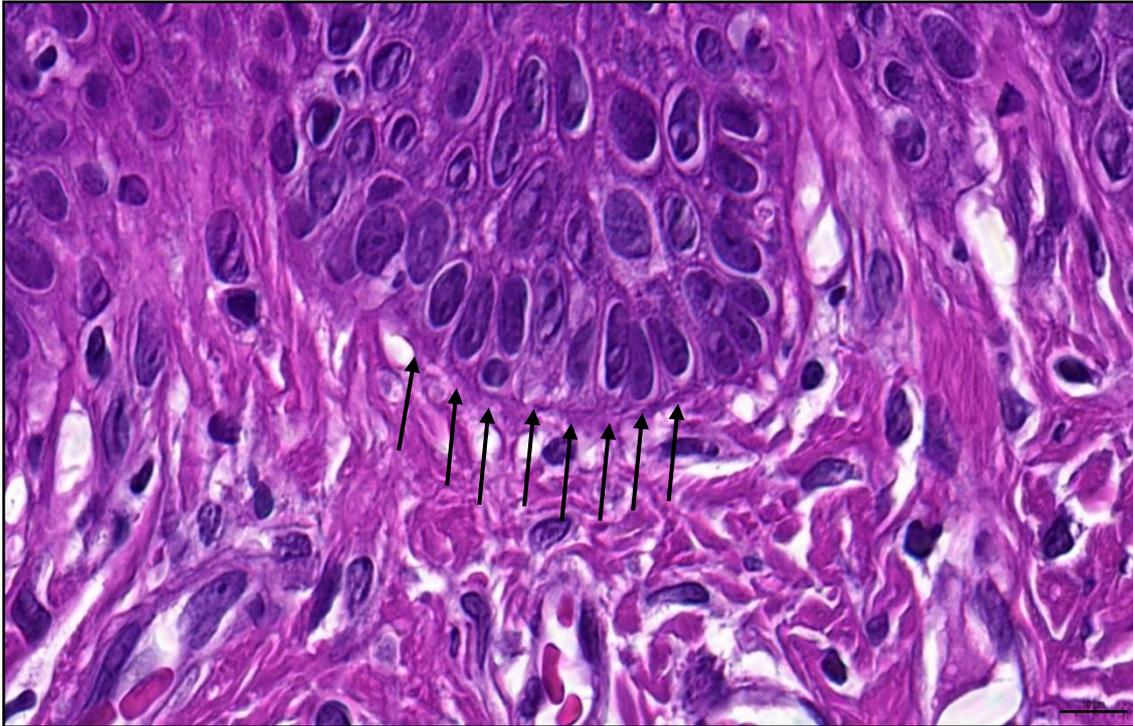


**Figura 3. Representación ilustrada de los diferentes estratos del tejido epitelial.** En la imagen se pueden observar los estratos comenzando desde el más profundo (estrato basal) hasta el más superficial (estrato superficial) con el patrón de expresión de CK característico de cada estrato del tejido epitelial. Imagen adquirida y modificada de Gómez ME, Campos A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 4ª ed: Panamericana; 2019.

A medida que las células epiteliales del estrato basal comienzan a proliferar y a ascender por el tejido epitelial, sufren una transformación fenotípica marcada por su morfología celular y por la expresión de diferentes CK y proteínas a través de las diferentes capas del tejido epitelial, desde la más profunda a la más superficial. Concretamente y en este orden, son el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato superficial. Como se ha comentado anteriormente, las células epiteliales comienzan a proliferar activamente en el estrato basal, a partir del cual van ascendiendo a estratos más superficiales por la fuerza de empuje originada por la proliferación y generación de nuevas células epiteliales del estrato basal. Respecto a esto, el **estrato basal** está

formado por una capa de células epiteliales cúbicas o cilíndricas con núcleo redondo u ovalado y citoplasma altamente basófilo, indicador de una gran actividad metabólica dedicada a la síntesis proteica. Asimismo, cabe destacar el estado proliferativamente activo de las células epiteliales del estrato basal predominando su capacidad mitótica gracias a la acción de moléculas señalizadoras producidas por el continuo flujo multidireccional entre las células epiteliales y los fibroblastos del tejido conectivo subyacente [1, 2]. La alta capacidad proliferativa de las células epiteliales de la mucosa oral humana puede ser detectada mediante técnicas inmunohistoquímicas con los marcadores nucleares Ki67, p63 y PCNA. Además, el proceso de proliferación y diferenciación celular es determinado por la expresión de CK específicas en el estrato basal como la CK5 y la CK14. Por tanto, las células epiteliales del estrato basal tienen como función principal asegurar la autorrenovación del tejido epitelial y la reepitelización [12, 16], procesos que se llevan a cabo gracias a la migración y diferenciación de las células epiteliales del estrato basal. Sin embargo, las células basales también producen diferentes moléculas de señalización, como son la interleuquina-1 (IL-1) y la interleuquina-8 (IL-8), que activan la proliferación y la síntesis de proteínas tales como el colágeno I, prostaglandinas y metaloproteinasas en los fibroblastos del tejido conectivo subyacente [17, 18] (Figura 4).

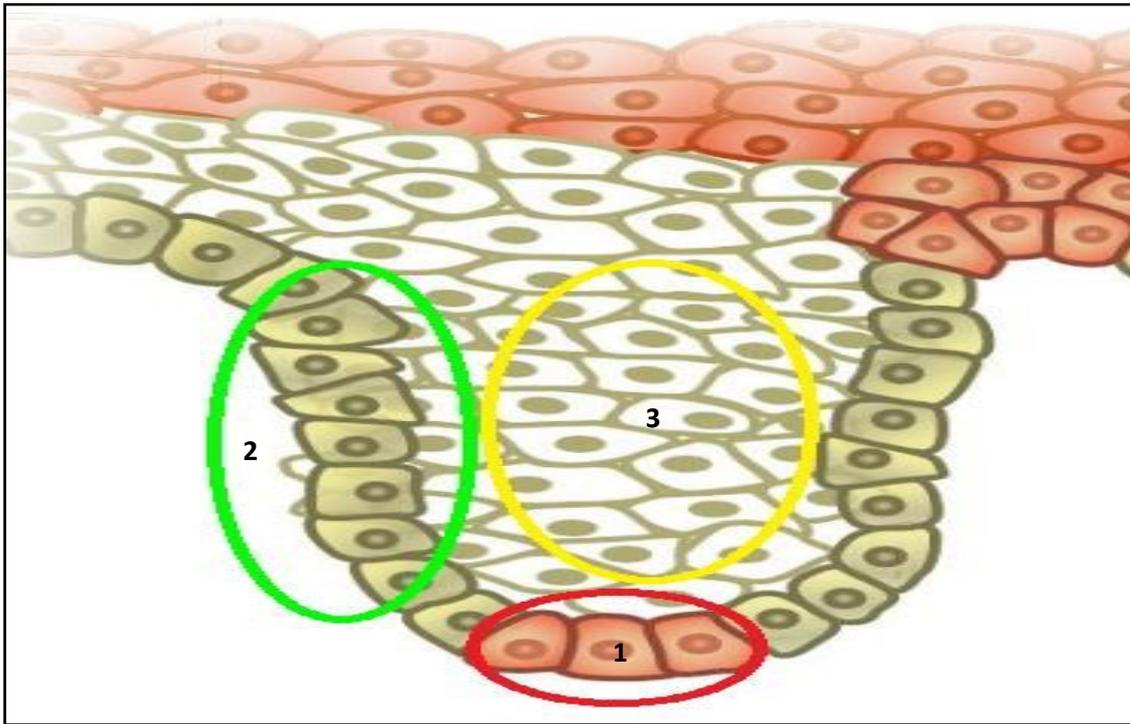
Por otro lado, las células epiteliales del estrato basal no se disponen linealmente, sino de una manera específica, haciendo que surjan del tejido epitelial unas proyecciones en forma de invaginaciones hacia el tejido conectivo denominadas crestas epiteliales que se encuentran en estrecho contacto con las papilas coriales del tejido conectivo que serán descritas en apartados posteriores [19]. Las crestas epiteliales constituyen un nicho de células madre epiteliales que permiten la autorrenovación del tejido epitelial. Dentro de la arquitectura de las crestas epiteliales se diferencian tres regiones en base a la capacidad de proliferación de las células epiteliales encontradas en cada una de las zonas (Figura 5). En primer lugar, se encuentra una región interpapilar debido a que se encuentra ubicada en el estrato basal entre dos papilas coriales manteniendo estrecha



**Figura 4. Imagen representativa de microscopía óptica del estrato basal del tejido epitelial de la mucosa oral humana teñido con hematoxilina-eosina.** Las células epiteliales del estrato basal han sido señaladas con flechas negras (cada flecha indica una célula epitelial basal). Las células epiteliales del estrato basal se presentan en una monocapa y típicamente mantienen una morfología cúbica o cilíndrica. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

relación con el tejido conectivo. En esta región interpapilar residen las células madre epiteliales cuya división celular es asimétrica, es decir, una célula madre da lugar a otra célula madre y a otra célula epitelial diferenciada, produciéndose esta división con un movimiento en vertical en el tejido epitelial. La segunda región del estrato basal es la región papilar, que como su nombre indica, es aquella con estrecha relación con las papilas coriales del tejido conectivo. En la región papilar se encuentran células que también se dividen con un movimiento en vertical. Por último, la tercera región la constituyen células epiteliales denominadas epibasales que residen en el estrato espinoso de la cresta epitelial y cuyo movimiento de división se da tanto en horizontal como en vertical. Estas divisiones celulares verticales son de gran importancia ya que son la fuerza de empuje que hace posible la renovación del tejido epitelial, mientras que las divisiones horizontales provocan el aumento de grosor de la cresta epitelial [20]. Además de esta importante función como almacén de células proliferativas, las crestas epiteliales aumentan la superficie de intercambio de nutrientes, moléculas de

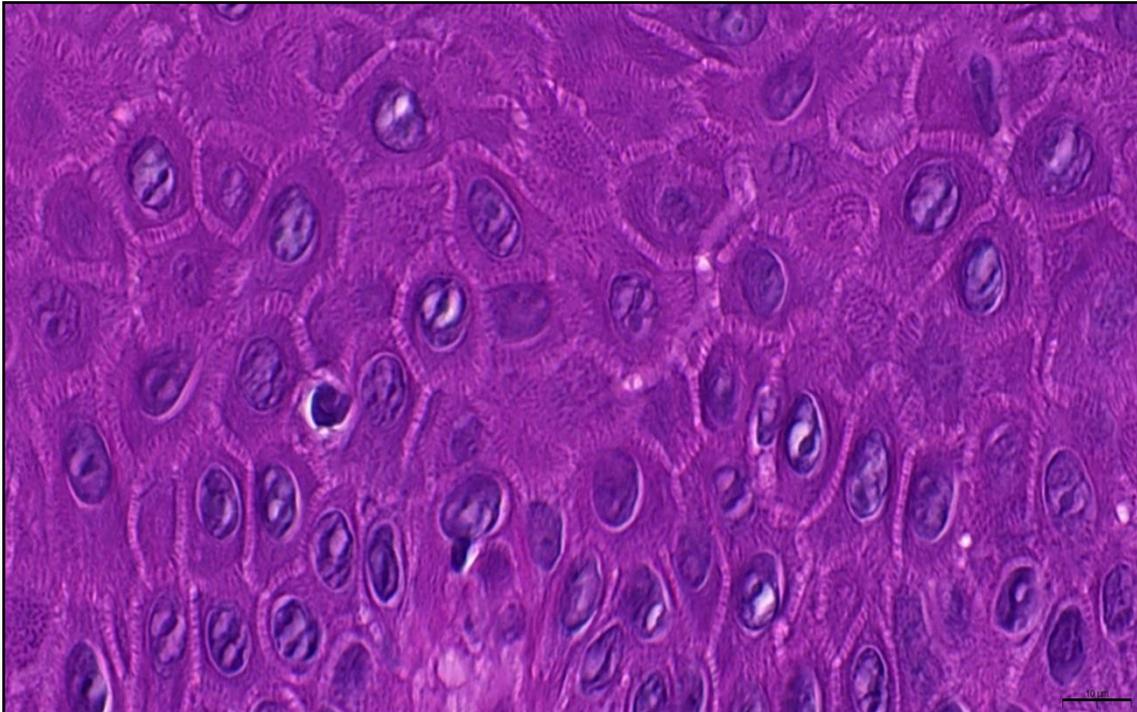
señalización y sustancias de desecho entre el tejido epitelial y el tejido conectivo subyacente. Específicamente, en la mucosa oral de aquellas zonas donde las células se someten al estrés mecánico producido por el movimiento masticatorio, las crestas epiteliales aumentan su longitud [21]. La morfogénesis de las crestas epiteliales comienza en embriogénesis y se ve favorecida por el movimiento de succión del embrión. Durante la embriogénesis temprana, el estrato basal del tejido epitelial se presenta como una monocapa rectilínea. A medida que se desarrolla el embrión y comienza a realizar movimientos de succión, se activan diferentes cascadas de señalización que conllevan a su vez con la activación de la proliferación celular y de enzimas en el estrato basal produciendo un remodelado de su estructura que inicia la morfogénesis de las crestas epiteliales proyectadas hacia el tejido conectivo. Profundamente, una de las cascadas activadas mecánicamente es la de las metaloproteinasas (MMPs). La cascada MMPs aumenta la expresión y actividad de enzimas como la metaloproteinasa 2 (MMP-2), la cual comienza a remodelar la matriz extracelular del tejido conectivo liberando factores de transcripción que aumentan la proliferación de células epiteliales. Este remodelado y el aumento de proliferación permite que las células epiteliales del estrato basal puedan avanzar en dirección al tejido conectivo. Paralelamente, también se activan otras cascadas como la de la proteína quinasa extracelular (ERK) y la de la proteína C (PC), que conllevan con el aumento de la proliferación de células epiteliales de la región interpapilar al expresarse diversos factores de expresión, y, por tanto, con el aumento de longitud de las crestas epiteliales [21, 22] (Figura 5). Por otro lado, la disposición de las crestas epiteliales provee una fuerza de enclavamiento que, junto a la presencia de una membrana basal bien definida la cual se describirá en apartados posteriores, permite una unión permanente entre el tejido epitelial y el tejido conectivo [19-22].



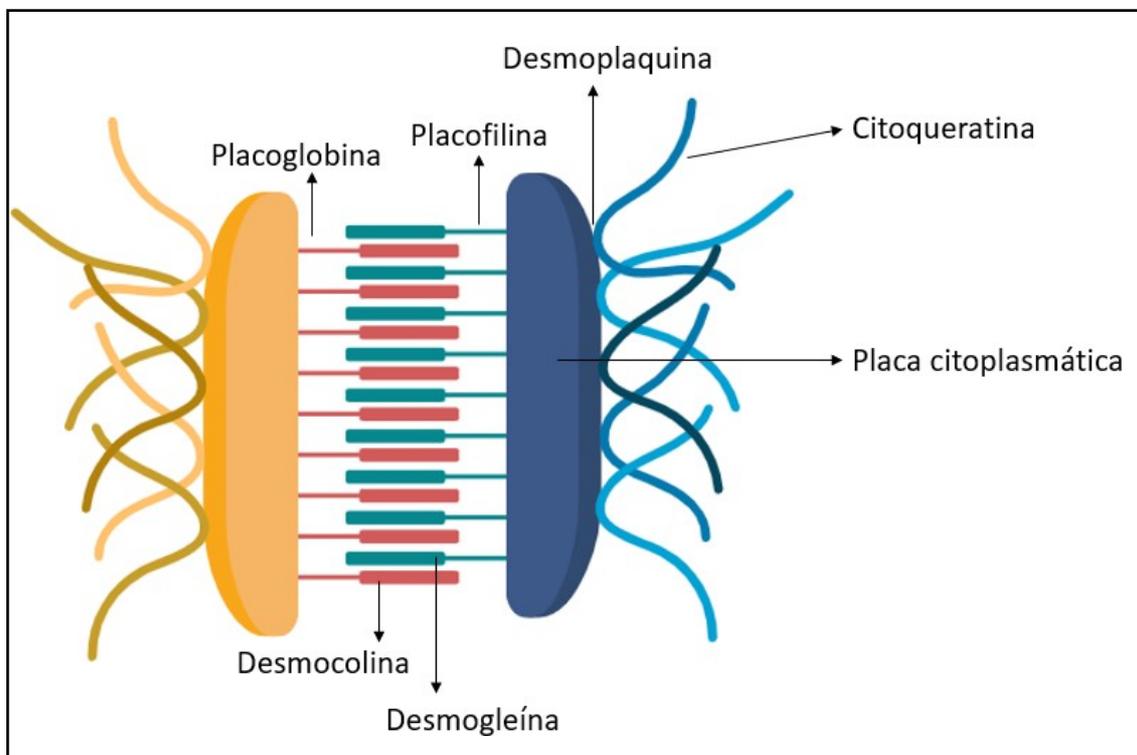
**Figura 5. Representación ilustrada de las diferentes regiones de las crestas epiteliales determinadas por la ubicación de las células proliferativas.** Se distinguen en rojo (1) la región interpapilar, en verde (2) la región papilar y en amarillo (3) las células epiteliales epibasales. Imagen adquirida y modificada de Gómez ME, Campos A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 4ª ed: Panamericana; 2019.

Siguiendo el mismo orden anterior, tras el estrato basal se encuentra el **estrato espinoso**, caracterizado por poseer diversas capas de células epiteliales poligonales, de núcleo redondo y citoplasma ligeramente basófilo con gran cantidad de inclusiones de glucógeno. Las células epiteliales del estrato espinoso se encuentran estrechamente unidas entre sí gracias a unas estructuras proteicas de unión intercelular denominadas desmosomas [2]. En este sentido, los desmosomas son uniones adherentes intercelulares, que integran mecánicamente células adyacentes gracias a los enlaces mediados por desmoplaquina a las CK del citoesqueleto y por la acción de cadherinas como desmogleína y desmocolina y proteínas de placa citoplasmáticas como son la placoglobina y la placofilina [23] (Figuras 6 y 7). Por otro lado, en el estrato espinoso las células epiteliales comienzan a expresar gran cantidad de CK1 y CK10, altamente relacionadas con el proceso de diferenciación de las células epiteliales. Las CK1 y CK10 inhiben los efectos proliferativos producidos por la CK5 y CK14 reduciendo en gran medida su alta capacidad de proliferación. Cabe destacar que también se expresan otras CK como son la CK2, CK6, CK11, CK16 y la CK17. En este sentido, la CK2 y CK11 se expresan en las capas superiores del estrato espinoso donde las células epiteliales se

encuentran en un estado avanzado de diferenciación. Además, la expresión de CK13 también es típica de células epiteliales de las diferentes capas suprabasales del tejido epitelial, indicando diferenciación y maduración celular [24].

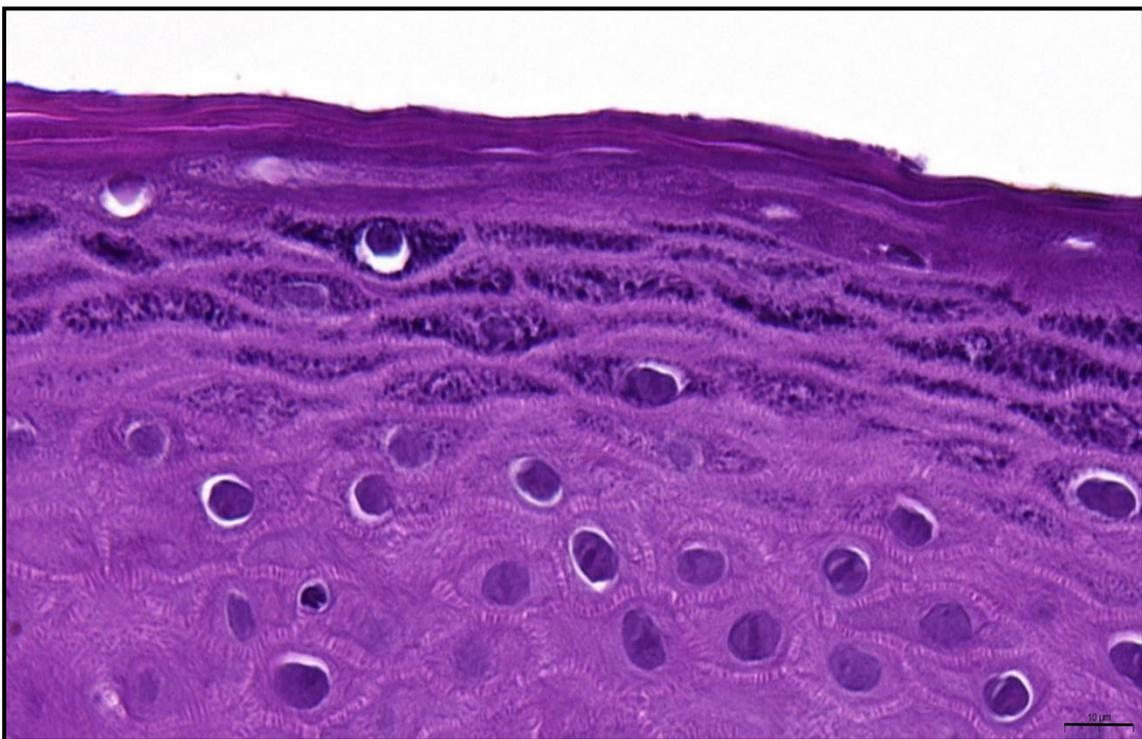


**Figura 6. Imagen representativa de microscopía óptica del estrato espinoso del tejido epitelial teñido con hematoxilina-eosina.** En la imagen se pueden observar células epiteliales del estrato espinoso con morfología poligonal. Barra de escala: 10  $\mu$ m.



**Figura 7. Representación ilustrada del esquema de un desmosoma.** En la imagen se puede observar la estructura típica del desmosoma encontrado en las membranas plasmáticas de las células epiteliales, además de todos los principales componentes que forman parte del desmosoma. Figura diseñada con el software BioRender.

Consecuentemente, tras el estrato espinoso se encuentra el **estrato granuloso**. El estrato granuloso se compone de capas de células epiteliales de morfología pavimentosa y con pequeño núcleo. Microscópicamente, se observa una acumulación de gránulos de queratohialina de carácter altamente basófilo. Los gránulos de queratohialina ayudan a ensamblar haces de CK con un alto grado de fosforilación y de puentes disulfuro que dan lugar a la máxima queratinización de células epiteliales [2]. Otra proteína de gran importancia encontrada en los gránulos de queratohialina es la filagrina que participa también en el ensamblaje de haces de CK ayudando a mantener la configuración final del citoesqueleto y a mantener la función protectora de la barrera epitelial con propiedades que ayudan al mantenimiento del pH, hidratación y funciones antimicrobianas de la misma [2, 25, 26]. Asimismo, las proteínas claudinas y ocludinas también son altamente expresadas formando parte de las uniones ocluyentes encargadas del control del transporte intercelular [27, 28] (Figura 8).

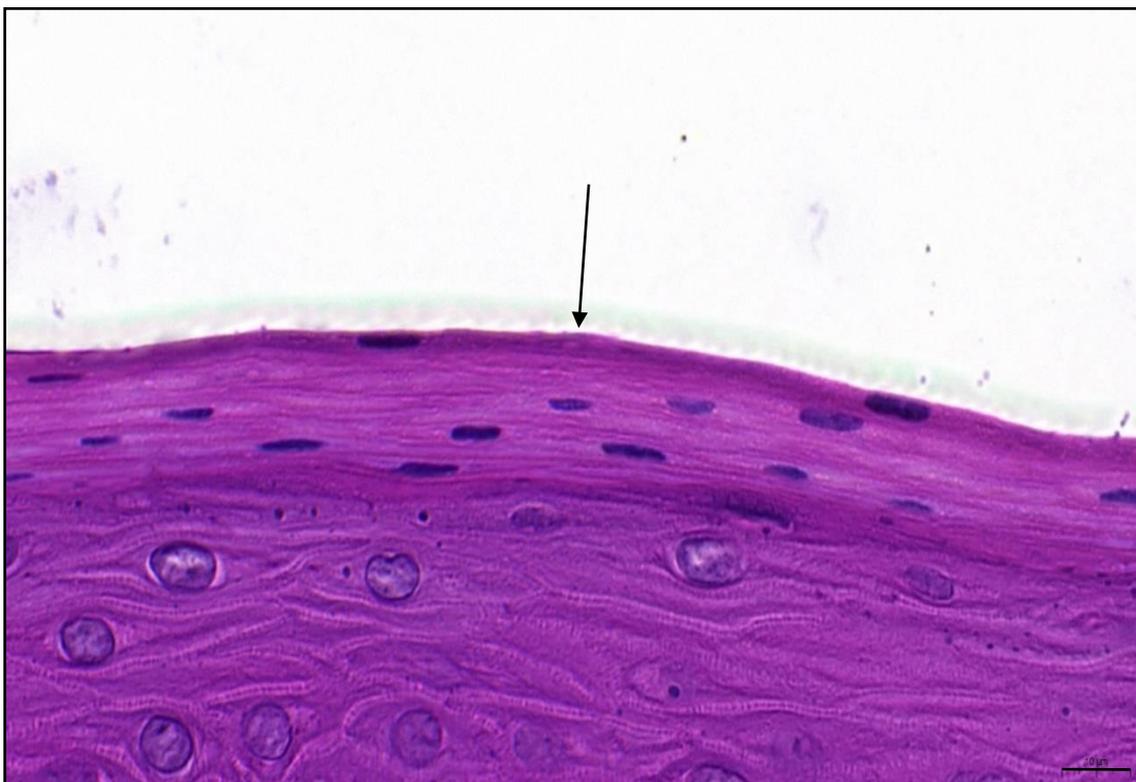


**Figura 8.** Imagen representativa de microscopía óptica del estrato granuloso del tejido epitelial de la mucosa oral humana teñido con hematoxilina-eosina. En la imagen se observan células epiteliales del estrato granuloso de morfología pavimentosa. En su citoplasma se pueden observar gránulos de queratohialina altamente basófilos. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

En el estrato granuloso se encuentra la barrera epitelial, una fina capa protectora de células compactadas entre sí y de una baja cantidad de matriz extracelular formada tanto por un componente proteico como lipídico, ambos sintetizados por células epiteliales. Por un lado, una envoltura proteica envuelve a las células epiteliales. Esta envoltura proteica es producida por la acción de enzimas que catalizan la unión de los precursores de la envoltura reticular tales como las proteínas loricrina e involucrina [29, 30]. Por otro lado, el componente lipídico es sintetizado gracias a la acción de los cuerpos de Odland, también denominados queratinosomas. Estos orgánulos contienen ácidos grasos, colesterol, esfingolípidos y fosfatasa ácida que liberan por exocitosis al espacio intercelular dando lugar a una barrera impermeable a sustancias solubles o agua [2, 31]. Un fenómeno notable ocurrido en el estrato granuloso es el inicio del proceso de transformación o cornificación de las células epiteliales donde comienzan con la destrucción de sus orgánulos y núcleo para convertirse en una célula escamosa superficial [2]. En este proceso, las células epiteliales del estrato granuloso comienzan a convertirse en células escamosas deshidratadas y anucleadas. Este proceso de cornificación es conceptualmente diferente al concepto de queratinización y no se deben confundir. Como se ha explicado anteriormente, la cornificación consiste en un proceso en el que la célula epitelial se prepara para ser descamada del tejido mediante su transformación y degeneración celular que comienza en el estrato granuloso y tiene su auge en el estrato superficial, mientras que la queratinización consiste en el proceso de expresión de polipéptidos de CK de las células epiteliales y su ensamblaje hasta la formación de los FIQ [2].

Por último, en la zona más superficial se encuentra el **estrato superficial**, caracterizado por células epiteliales completamente cornificadas con citoplasma altamente acidófilo y morfología escamosa. Debido al proceso de cornificación, en el interior de las células cornificadas se encuentran filamentos altamente empacados sintetizados a partir de los tonofilamentos de CK y recubiertos por un material proteico procedente del gránulo de queratohialina. Profundizando, este material proteico está compuesto por las proteínas involucrina, filagrina, desmoplaquina, loricrina y elafina, además de otras ricas en prolina [2]. Por otro lado, es destacable mencionar que las uniones intercelulares comienzan a modificarse para permitir la correcta descamación del tejido epitelial, y con

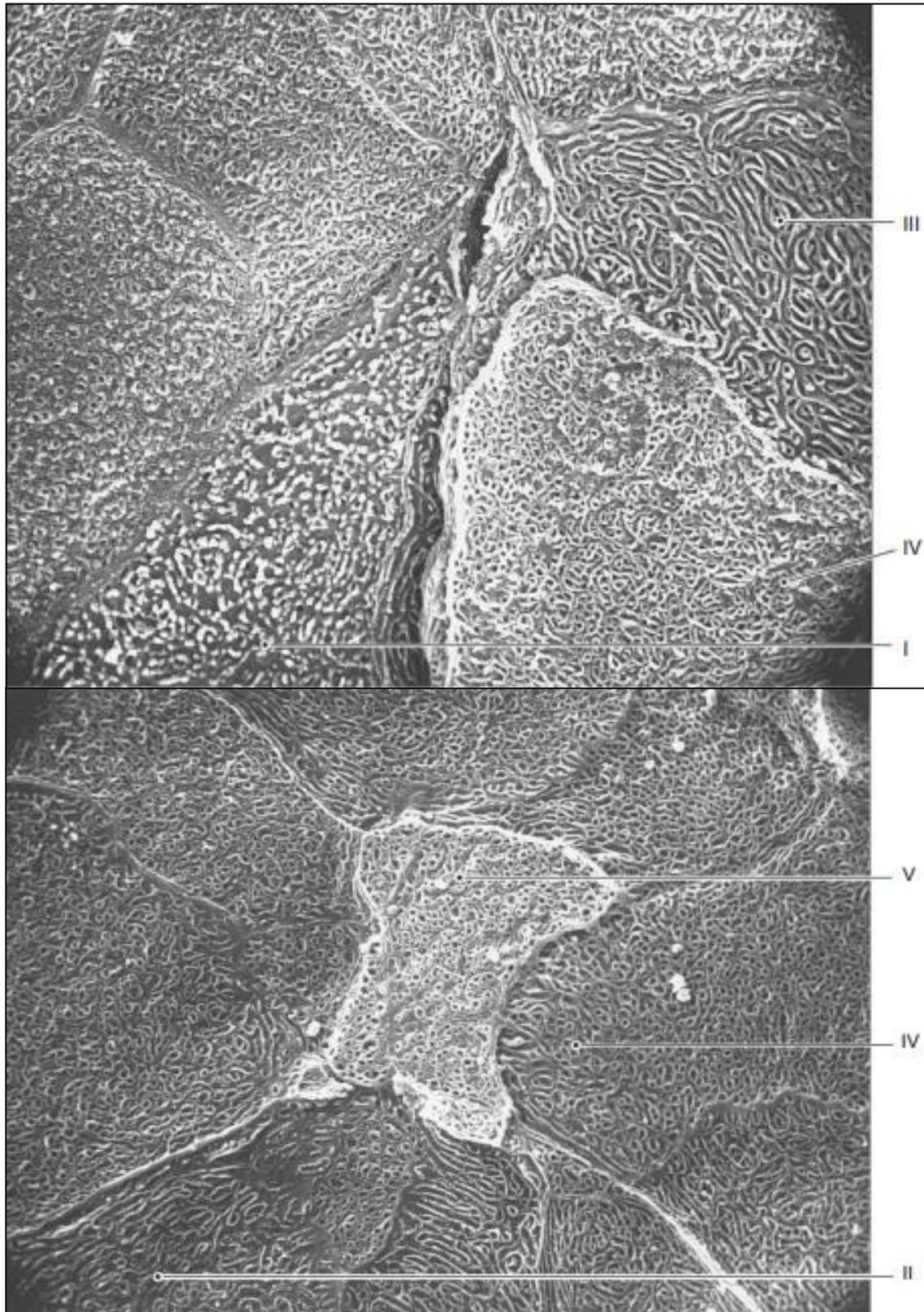
ello, la autorrenovación de este. Los desmosomas degeneran y las células se conectan entre sí mediante interdigitaciones [2, 32]. A diferencia del tejido epitelial de la piel, donde el estrato más superficial es denominado estrato córneo, en la mucosa oral se denomina estrato superficial. Esto es debido a que las células epiteliales del tejido epitelial de la mucosa oral humana no forman un verdadero estrato córneo ya que, a diferencia de lo que ocurre en la piel, estas células epiteliales pueden ser eliminadas individualmente sin que se forme una membrana que actúe a modo de barrera impermeable [2] (Figura 9).



**Figura 9.** Imagen representativa de microscopía óptica del estrato superficial de la mucosa oral humana teñida con hematoxilina-eosina. En la imagen se pueden observar las células epiteliales cornificadas del estrato superficial con morfología escamosa señaladas por una flecha negra. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

El desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) ha permitido el estudio de las capas más superficiales de la mucosa oral humana analizando imágenes en tres dimensiones (3D) que han permitido, por un lado, analizar las diferencias existentes en los patrones de superficie de las diferentes regiones anatómicas de la cavidad oral, y, por otro lado, el diagnóstico de ciertas alteraciones de la mucosa oral humana como son las lesiones malignas [33-35]. En este contexto, se han descrito diversos patrones morfológicos de superficie en la mucosa oral humana. En primer lugar, se encuentra el **patrón tipo I** donde predomina la presencia de microvellosidades

en la membrana plasmática de las células epiteliales. Este patrón I es característico de células epiteliales indiferenciadas como las del estrato basal y espinoso. En segundo lugar, se encuentra el **patrón tipo II** donde predomina la presencia de microplicas definidas como crestas superficiales rectilíneas formadas por el plegamiento de la membrana plasmática. Este patrón II es característico de células epiteliales diferenciadas. En tercer lugar, se encuentra el **patrón tipo III** caracterizado por la presencia de microplicas curvas con un patrón curvilíneo en los extremos terminales. El patrón III también es característico de células epiteliales diferenciadas. En cuarto lugar, se encuentra el **patrón tipo IV** con presencia de microplicas circulares, ramificadas y confluentes siendo característico de células epiteliales diferenciadas. En quinto y último lugar, se encuentra el **patrón tipo V** predominando la presencia de poros en superficie bien definidos por una sobreelavación marginal siendo característico del estrato superficial (Figura 10).



**Figura 10. Imagen representativa de microscopía electrónica de barrido de los patrones de superficie celular encontrados en las células epiteliales de la mucosa oral humana. En la imagen A se observan los patrones I, III y IV, mientras que en la imagen B se observan los patrones II, IV y V. Imagen adquirida de Gómez ME, Campos A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 4ª ed: Panamericana; 2019.**

En base a todo lo descrito con anterioridad, en la mucosa oral humana se pueden distinguir tres tipos de tejido epitelial plano estratificado atendiendo al grado de maduración de las células epiteliales y a las características mostradas por el estrato superficial [2, 10, 36].

En primer lugar, se encuentra el **tejido epitelial paraqueratinizado** en el que se distinguen núcleos de carácter picnótico en el estrato superficial hasta que la célula es descamada del tejido epitelial. Los núcleos picnóticos son aquellos núcleos cuya cromatina sufre una condensación irreversible debido a la apoptosis sufrida por la célula. En el tejido epitelial paraqueratinizado se observan células poco acidófilas. Además, el tejido epitelial paraqueratinizado presenta un estrato granuloso menos definido y sin la existencia de gránulos de queratohialina.

En segundo lugar, se encuentra el **tejido epitelial ortoqueratinizado** caracterizado por la pérdida y ausencia de núcleos en las células que forman parte del estrato superficial. En el tejido epitelial ortoqueratinizado las células epiteliales del estrato superficial son altamente acidófilas. Además, el tejido epitelial ortoqueratinizado presenta un estrato granuloso con células epiteliales que poseen en su citoplasma un alto número de gránulos de queratohialina bien condensados.

Por último, se encuentra el **tejido epitelial no queratinizado** caracterizado por únicamente poseer un estrato basal, un estrato intermedio y un estrato superficial. El estrato superficial del tejido epitelial no queratinizado es más grueso que el del tejido epitelial queratinizado.

Aunque se conocen ciertas diferencias histológicas entre ellos, hoy en día, son pocos los estudios enfocados a la caracterización completa de cada tipo de tejido epitelial de la cavidad oral que marquen contundentemente las diferencias histológicas existentes entre cada uno de ellos y que, por tanto, ayuden a diferenciarlos de una manera clara y concisa. Por ello, la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio histológico del tejido epitelial paraqueratinizado y ortoqueratinizado con el fin de marcar las características y diferencias entre ambos tipos de tejidos epiteliales ayudando a entender mejor las patologías que los afectan, así como a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas,

como es la producción de tejidos artificiales de mucosa oral por Ingeniería Tisular que biomimeten con la mucosa oral humana.

## 2.3 Membrana basal de la mucosa oral humana

En los siguientes apartados, se describirá de manera concisa la membrana basal de la mucosa oral humana, primordial para la correcta unión del tejido epitelial al tejido conectivo subyacente, en base a sus generalidades, funciones, composición y organización.

### 2.3.1 Generalidades y funciones de la membrana basal

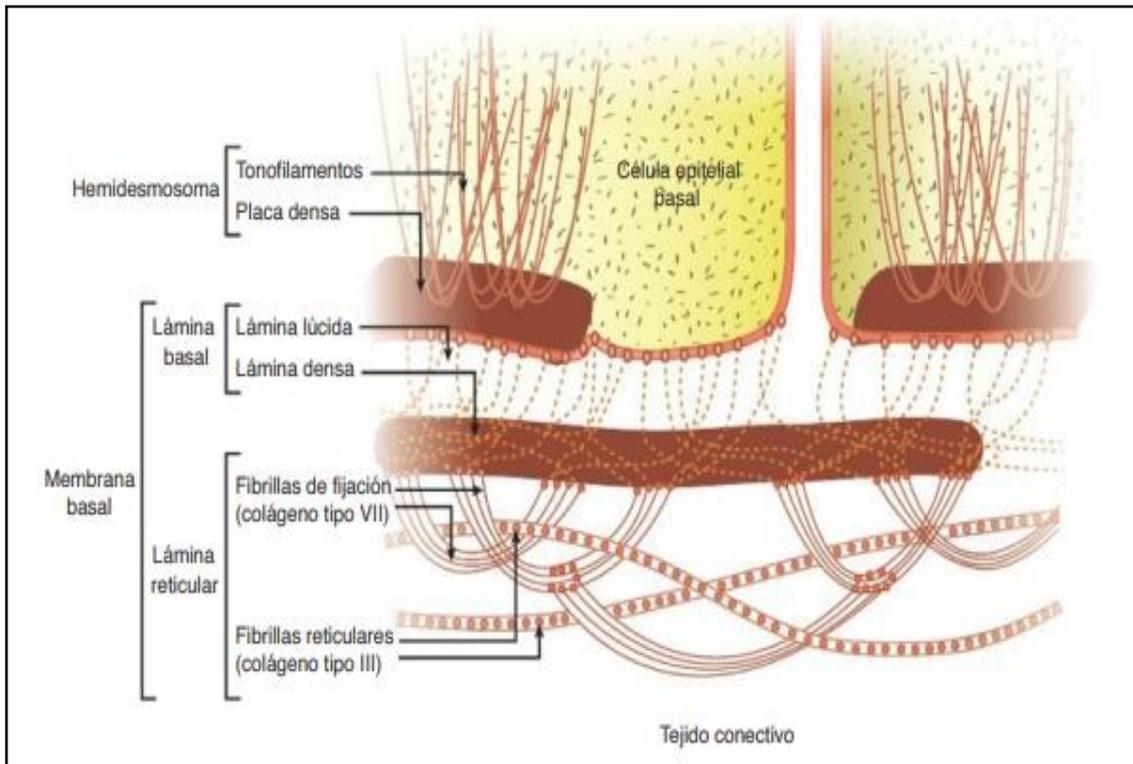
El tejido epitelial se encuentra fuertemente unido al tejido conectivo a través de una estructura molecular denominada membrana basal. La membrana basal se define como una capa densa y amorfa situada en el estrato basal del tejido epitelial, la cual es sintetizada a partir de las células epiteliales del estrato basal y a partir de los fibroblastos del tejido conectivo que se detallarán en apartados posteriores. En este sentido, la membrana basal participa activamente en mantener una unión permanente entre el tejido epitelial y el tejido conectivo, además de servir como una barrera contra moléculas cargadas negativamente y de actuar como guía en la migración celular en el proceso de reepitelización. Asimismo, constituye un reservorio de factores de crecimiento que ejercen su acción sobre diferentes funciones celulares como la proliferación de células epiteliales y fibroblastos. Además, la membrana basal sirve como sitio de anclaje de las células epiteliales del estrato basal gracias a unas estructuras proteicas denominadas hemidesmosomas que se detallarán en el siguiente apartado [2, 37].

### 2.3.2 Composición y organización de la membrana basal

Como se ha mencionado con anterioridad, la membrana basal es una estructura molecular y acelular formada por distintos tipos de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos. Debido a esta razón, la composición y la organización de la membrana basal van estrechamente relacionadas debido a que la forma en la que sus componentes se agrupan da lugar a una organización específica en la que se pueden diferenciar dos principales zonas. En este sentido, en la membrana basal se distinguen dos zonas diferenciadas, la **lámina basal**, sintetizada por células epiteliales, y la **lámina reticular**, sintetizada por fibroblastos del tejido conectivo [2]. A su vez, la lámina basal

queda dividida en dos estratos. El primer estrato se denomina lámina lúcida, compuesta principalmente por laminina 1 y, en menor proporción, laminina 5, además de colágeno XVII. El segundo estrato se conoce por lámina densa y se compone principalmente por una red de colágeno IV, glicoproteínas como la fibronectina y la entactina y proteoglicanos como heparán sulfato, entre los que destaca el perlecano, condroitín sulfato y dermatán sulfato, los cuales juegan un papel fundamental regulando el paso de iones a través de la membrana basal debido a su carga negativa. De manera más profunda, las lamininas, glicoproteínas de alto peso molecular que forman parte de la lámina basal, son las encargadas de unir a la célula epitelial del estrato basal a la membrana basal. La unión es producida gracias a la asociación de las lamininas a las integrinas del hemidesmosoma de la superficie de la célula epitelial, y a la red de colágeno IV y perlecano de la lámina densa con la ayuda de la entactina, una proteína de pequeño peso molecular. De hecho, el ascenso de las células epiteliales del estrato basal por el resto de capas suprabasales comienza con la separación de una integrina de superficie del hemidesmosoma de la célula epitelial del estrato basal, de la laminina 5 de la membrana basal [2]. Además, la unión de la célula epitelial a la membrana basal es reforzada gracias a la fibronectina, una proteína dimérica que posee sitios de unión tanto para integrinas como para el colágeno IV. Gracias a la red de colágeno IV, la membrana basal puede ser detectada por técnicas inmunohistoquímicas haciendo uso de anticuerpos primarios contra el colágeno IV, componente principal y abundante de la lámina densa [38].

Finalmente, se encuentra la lámina reticular que se compone de una matriz formada por glucosaminoglucanos y dos tipos de fibras, las fibras de fijación de colágeno VII que se unen en las placas de anclaje de la lámina densa y las fibras reticulares de reticulina, un trímero de colágeno III, distribuidas entre las fibras de anclaje [2, 36, 37, 39, 40]. Gracias a la matriz de glucosaminoglucanos, la membrana basal puede ser fácilmente detectada por la técnica histoquímica del ácido peryódico de Schiff (PAS) pese a su tamaño nanométrico. En este sentido, el ácido peryódico oxida los azúcares que forman parte de los glucosaminoglucanos de la lámina reticular, dando lugar a aldehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff, provocando una coloración violácea que permite la visualización de la membrana basal por microscopía óptica [41] (Figura 11).



**Figura 11. Representación ilustrada del esquema de la estructura y organización de la membrana basal.** En la imagen se distinguen tanto la lámina basal como la lámina reticular, mostrándose las uniones entre las diferentes láminas que permiten la unión del tejido epitelial con el tejido conectivo. Cedida de Gómez ME, Campos A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 4ª ed: Panamericana; 2019.

## 2.4 Tejido conectivo de la mucosa oral humana

Vistos el tejido epitelial y la membrana basal, se describirá a continuación el tejido conectivo, fundamental para el correcto funcionamiento de la mucosa oral humana, en base a sus generalidades, funciones, composición y organización.

### 2.4.1 Generalidades y funciones del tejido conectivo

El tejido conectivo es aquel que parte en embriogénesis de la hoja embrionaria intermedia, también denominada mesodermo. Genéricamente, consta de células y de matriz extracelular (MEC) y forma un compartimento continuo por todo el cuerpo humano quedando delimitado por las membranas basales del tejido epitelial, células musculares y nervios. Concretamente, el tejido conectivo de la mucosa oral humana está situado subyacente al tejido epitelial y, al contrario del tejido epitelial, presenta una abundante matriz extracelular rica en diversas moléculas.

Funcionalmente, destaca la función estructural debido a que el tejido conectivo es el responsable del establecimiento y el mantenimiento de la configuración corporal debido al conjunto de moléculas en su matriz extracelular que conectan y unen las células,

brindando sostén al resto de tejidos y órganos debido a que aporta un soporte al cuerpo humano. Esto es debido a que el tejido conectivo presenta diversas moléculas altamente hidratadas que favorecen la función de servir como apoyo y sostén mecánico en aquellos tejidos sometidos a movimientos [42]. También, el tejido conectivo sirve como un reservorio fundamental de factores de crecimiento y hormonas, con efecto en las propias células del tejido conectivo y en la de los tejidos circundantes, como el tejido epitelial, aumentando o inhibiendo la proliferación y diferenciación de las células epiteliales. Por ejemplo, el factor de crecimiento de células epiteliales (KGF) y prostaglandinas (PGLs) estimulan la proliferación y diferenciación de células epiteliales [2, 43] en condiciones no patológicas y patológicas, asimismo permitiendo la correcta regeneración de los tejidos y la reparación de heridas. Además, en el tejido conectivo tiene lugar el intercambio de nutrientes, oxígeno y sustancias de desecho entre los vasos sanguíneos que irrigan el tejido y las células del propio tejido y de los tejidos circundantes. Por último, otra función por destacar es la de servir como línea de defensa ante patógenos y sustancias extrañas debido al alto número de células que están asociadas con el sistema de defensa del cuerpo humano y las respuestas inflamatorias, que serán descritas posteriormente.

#### **2.4.2 Composición y organización del tejido conectivo**

El tejido conectivo está compuesto por una gran variedad de células. Las células que forman parte del tejido conectivo pueden dividirse en dos grupos principales, células transitorias, que emigran desde la sangre hacia el tejido conectivo debido a estímulos específicos, y células permanentes, que residen en el tejido y muestran poco movimiento [2, 42]. Dentro del grupo de las células transitorias destacan los linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, células que en su conjunto se encargan principalmente de detectar diversos patógenos y de llevar a cabo la respuesta inflamatoria. Por otro lado, el grupo de células permanentes se compone de macrófagos, adipocitos, mastocitos, células madre adultas y fibroblastos [42]. Los macrófagos se encargan de llevar a cabo la actividad fagocítica, es decir, digerir células o patógenos y excretar sustancias que den comienzo a la respuesta inflamatoria. Los adipocitos son células encargadas de producir y acumular una alta cantidad de ácidos grasos de carga neutra y secretar diferentes hormonas y factores de crecimiento. Los

mastocitos son células con abundantes microvellosidades y pliegues en superficie y gránulos en su citoplasma, encargados de secretar diversas sustancias almacenadas en sus gránulos a la MEC que desencadenan la respuesta inflamatoria. Las células madre adultas encontradas en la MEC del tejido conectivo, son las células madre mesenquimatosas, que se encargan de regenerar el tejido y repararlo, incluso de dar lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Finalmente, se encuentran también los fibroblastos. Los fibroblastos son las células más abundantes del tejido conectivo con morfología fusiforme y que debido a su origen mesenquimático contienen al marcador mesenquimático vimentina en su citoplasma fácilmente detectable por técnicas inmunohistoquímicas [44]. Por una parte, se encargan de producir factores de crecimientos que regulan la proliferación y diferenciación de diversas células, como son las células epiteliales. Por otra parte, se dedican a la síntesis de diversas moléculas como son el colágeno, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos y glicoproteínas que forman parte de la MEC del tejido conectivo. Debido a su alta capacidad metabólica, presentan en su citoplasma un retículo endoplasmático rugoso y un complejo de Golgi muy desarrollado. De hecho, la principal composición del tejido conectivo se debe a los fibroblastos, ya que un solo fibroblasto es capaz de producir los diversos tipos de componentes que forman parte de la MEC [42] (Figura 12).



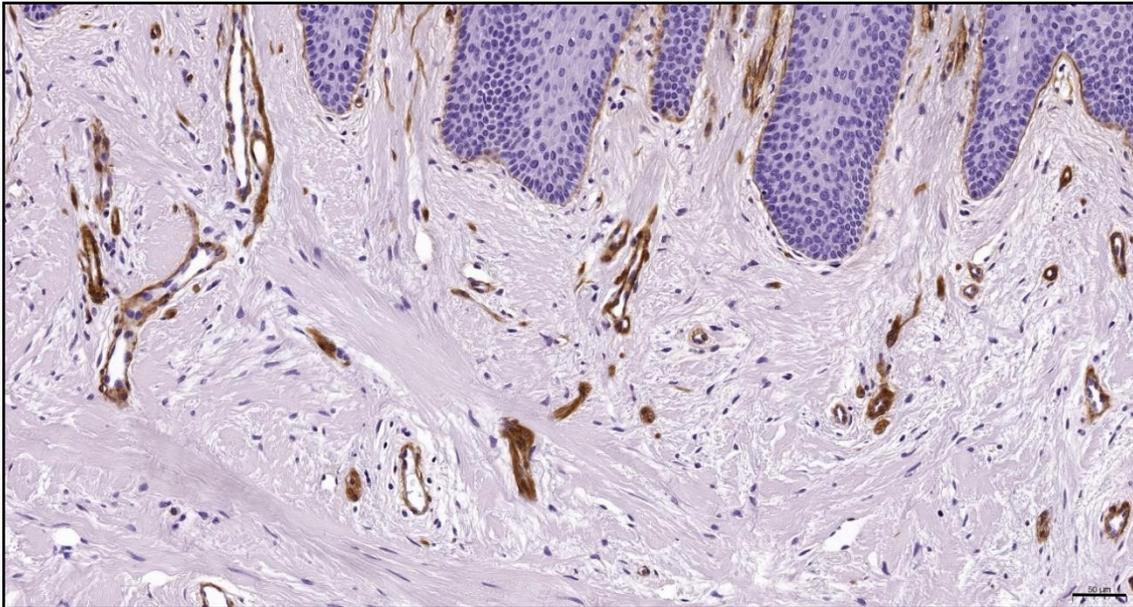
**Figura 12.** Imagen de microscopía óptica de un fibroblasto del tejido conectivo. En la imagen se observa un fibroblasto de morfología fusiforme marcado con un anticuerpo primario contra vimentina por técnica inmunohistoquímica indicado con una flecha negra. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

Por esta razón, la MEC consiste en una red macromolecular de proteínas, fibras y diversas moléculas que sirve como andamiaje arquitectónico y microambiente dinámico para las células, modulando el comportamiento celular y proporcionando características biomecánicas dentro de los tejidos [45]. La red macromolecular que compone la MEC puede dividirse en un componente proteico fibrilar, como son el colágeno, las fibras elásticas y las fibras reticulares, y en un componente no fibrilar denominado sustancia fundamental, formado principalmente por proteoglicanos, glucosaminoglicanos y glicoproteínas. Estas moléculas de la MEC y sus interacciones con los componentes celulares orquestan y guían los procesos de reparación, mantenimiento y regeneración de los tejidos [45]. En más detalle, los tipos de colágenos encontrados en la MEC de la mucosa oral humana son varios y cumplen principalmente una función estructural [42, 45]. En primer lugar, se encuentran los colágenos que forman fibrillas largas, como son el colágeno tipo I, II, III, V y IX, los cuales tienden a agregarse entre sí para dar lugar a fibrillas de mayor tamaño. En estas fibrillas de colágeno se encuentran asociados otros colágenos como son el colágeno tipo IX y XII que se encargan de unir colágenos entre sí para dar lugar a las fibrillas de colágeno. En segundo lugar, se encuentra el colágeno que forma redes como el colágeno tipo IV, que como se describió en la membrana basal, se encarga de filtrar el paso de moléculas e iones y de adherir diversas estructuras con ayuda del colágeno de anclaje tipo VII. En tercer lugar, se encuentra el colágeno tipo III que da lugar a fibras reticulares al unirse a proteoglicanos y glicoproteínas, para formar una red estructural, que, a diferencia de las fibrillas de colágeno, presenta flexibilidad [42, 45]. Sin embargo, en la MEC se encuentran un tipo de fibras mucho más flexibles denominadas fibras elásticas que están formadas por fibras ricas en elastina, las cuales se distienden fácilmente al ser traccionadas. Por otro lado, la sustancia fundamental se encuentra situada en los espacios remanentes entre células y fibras, sirviendo genéricamente como lubricante del tejido conectivo y como barrera ante el paso de microorganismos. De manera más profunda, la sustancia fundamental la forman los glucosaminoglicanos (GAG), aquellos polímeros lineales de disacáridos formados por ácido urónico unido a una hexosamina [42, 45]. Destacan el dermatán sulfato, el condroitín sulfato, queratán sulfato y el heparán sulfato. Todos ellos poseen una alta carga negativa que atrae moléculas de agua, además de servir como sostén de células a las que se unen. Otro tipo de GAG de gran importancia es el ácido hialurónico que

destaca por su alta capacidad de atraer y retener moléculas de agua manteniendo al tejido conectivo altamente hidratado. Los diversos GAG, a excepción del ácido hialurónico, se unen a un eje proteico dando lugar a diversos proteoglicanos, los cuales tienen la capacidad de actuar como polianiones y, por ello, se encuentran también altamente hidratados [42, 45]. De manera genérica, los proteoglicanos anclan células a la MEC y se unen a factores de crecimiento que actuarán en las células diana. Ejemplos de proteoglicanos son el sindecano, que une células a fibras de colágeno, a fibronectina y a tenascina, el versicano, que participa en la interacción célula-célula y célula-MEC, y la decorina que participa activamente en la síntesis de fibras de colágeno uniendo moléculas de colágeno entre sí y orientando las fibras. Por último, en la sustancia fundamental se encuentran las glucoproteínas, donde núcleos proteicos se unen a glúcidos altamente ramificados mediando la unión de células a la MEC y a otras estructuras [42, 45]. Ejemplos de glucoproteínas son la fibronectina y la tenascina, esta última con capacidad de adherir las células a la MEC. En este sentido, la MEC del tejido conectivo puede ser caracterizada gracias a las fibras de colágeno I y III las cuales pueden ser detectadas a través de la técnica histoquímica Picrosirius Red donde dichas fibras quedan teñidas de color rojo intenso [43], mientras que los proteoglicanos ácidos pueden detectarse haciendo uso de la técnica Alcian Blue donde quedan teñidos de color azul cielo [44].

Por otro lado, el tejido conectivo es un tejido altamente vascularizado donde existen numerosos vasos sanguíneos que irrigan constantemente al tejido conectivo para favorecer el intercambio de nutrientes, de oxígeno y de sustancia de desecho entre las células y los vasos sanguíneos [2]. A su vez, los vasos sanguíneos encargados de irrigar el tejido conectivo pueden variar en su calibre. Por ello, los vasos sanguíneos de pequeño calibre como son los capilares sanguíneos presentan células endoteliales con una glucoproteína de membrana característica, el marcador CD34, haciendo que dichos capilares sean fácilmente detectables y caracterizados mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas a través de anticuerpos contra el marcador CD34. También, los vasos sanguíneos, además de poseer una capa de tejido endotelial, presentan una membrana basal abrazando a la capa de tejido endotelial. Como se describió con anterioridad en el apartado de la membrana basal, uno de los principales constituyentes

de esta estructura es el colágeno tipo IV. Por otro lado, los vasos sanguíneos de mayor calibre están rodeados por una capa de músculo esquelético liso, donde las fibras musculares que la constituyen contienen una proteína que participa en la contracción y relajación de dicha capa muscular, denominada actina de músculo liso (SMA). Por esto, los vasos sanguíneos de mayor calibre pueden ser detectados y analizados haciendo uso de técnicas inmunohistoquímicas mediante anticuerpos contra SMA [46, 47] (Figura 13).



**Figura 13.** Imagen de microscopía óptica representativa del tejido conectivo de la mucosa oral humana. En la imagen se observan vasos sanguíneos de diferente calibre del tejido conectivo marcados con colágeno IV por técnica inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Vista la principal composición del tejido conectivo, se describirá como se organiza el tejido conectivo de la mucosa oral. En la mucosa oral humana el tejido conectivo se organiza en dos capas diferenciadas que se denominan área papilar y área subpapilar. En primer lugar, se encuentra el **área papilar** que es aquel situado debajo de las crestas epiteliales y que mantiene una estrecha relación con ellas a través de unas estructuras denominadas papilas coriales. Las papilas coriales son unas proyecciones del tejido conectivo hacia el tejido epitelial que permite aumentar la unión entre el tejido epitelial y el tejido conectivo además de que facilitan el intercambio de sustancias entre el tejido epitelial y el tejido conectivo. Este intercambio se da gracias al alto número de vasos sanguíneos de pequeño calibre encontrado en las papilas coriales, aportando oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento y eliminando sustancias de desecho del tejido epitelial. Por otro lado, y de manera subyacente, se encuentra el **área subpapilar**, aquella que se encuentra por debajo del área papilar. El área subpapilar se caracteriza

por poseer una matriz extracelular rica en componentes fibrilares. En base al porcentaje de fibras encontradas en la matriz extracelular, el tejido conectivo puede clasificarse en denso si posee un alto porcentaje fibrilar, semidenso o laxo si posee un bajo porcentaje fibrilar. Además, también se encuentran numerosos vasos sanguíneos, incluyendo los vasos sanguíneos de mayor calibre en comparación con los encontrados en la capa papilar [2, 39, 47] (Figura 14).



**Figura 14. Imagen representativa de microscopía óptica de la mucosa oral humana teñida con hematoxilina-eosina.** En la imagen se puede observar en el tejido conectivo el área papilar (P) delimitada entre líneas negras y de manera subyacente, el área subpapilar (SP). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## 2.5 Submucosa de la mucosa oral humana

En último lugar, se describirán las generalidades, funciones, composición y organización de la submucosa la cual se encuentra subyacente al tejido conectivo.

### 2.5.1 Generalidades y funciones de la submucosa

La submucosa es aquella capa de tejido conectivo laxo, es decir, con bajo porcentaje de fibras, existente debajo de la mucosa oral. La principal función de la submucosa es la de servir como puente de unión entre el tejido conectivo y los tejidos subyacentes en aquellas zonas expuestas al movimiento masticatorio amortiguando el estrés producido. Sin embargo, la submucosa se ausenta en aquellas regiones anatómicas de la cavidad oral donde apenas existe movimiento masticatorio. Además, dadas las características de la submucosa, participa en la lubricación de la cavidad oral y digestión a través de la

producción de saliva, además de participar en el aporte de nutrientes, en la movilidad y en la sensibilidad oral, entre otros [2, 43].

### 2.5.2 Composición y organización de la submucosa

La submucosa está compuesta principalmente por tejido conectivo laxo y puede existir como una capa bien definida, o estar ausente en zonas donde el tejido conectivo se une firmemente a la estructura ósea. En la submucosa se encuentran diversas glándulas salivares, vasos sanguíneos, nervios e incluso, tejido adiposo. Realmente, no tiene una organización clara y marcada como el tejido epitelial y el tejido conectivo, debido a que en la submucosa se encuentran mezclados diferentes tejidos como puede ser el tejido conectivo laxo, el tejido adiposo, el tejido vascular, el tejido muscular y el tejido nervioso [2, 43, 48] (Figura 15).

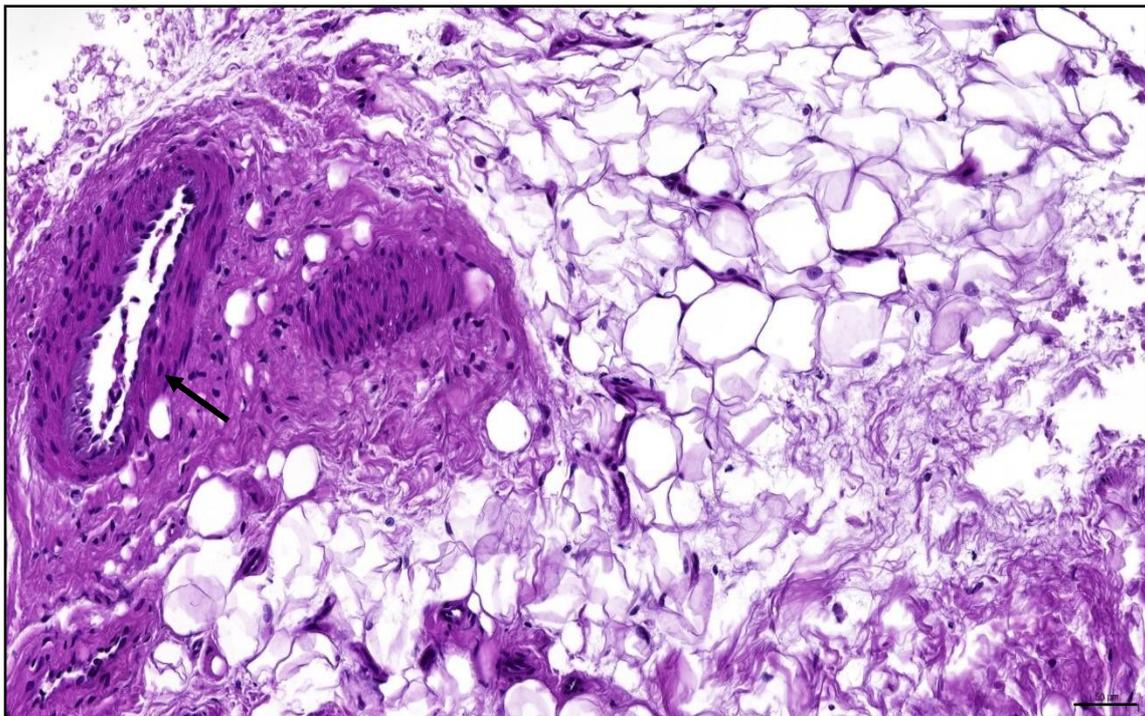


Figura 15. Imagen representativa de microscopía óptica de la submucosa de la mucosa oral humana teñida con hematoxilina-eosina. En la imagen puede observarse tejido adiposo y un vaso sanguíneo de mayor calibre (señalado con una flecha negra). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

### 3. Clasificación de la mucosa oral humana

Para terminar con la introducción, se procederá a describir los tres principales tipos de mucosa oral humana existentes en la cavidad oral humana. Atendiendo a la localización anatómica dentro de la cavidad oral, la mucosa oral humana es clasificada en tres tipos, cada tipo con unas características histológicas y funcionales específicas [2, 49].

En primer lugar, se encuentra la **mucosa oral de revestimiento**. La principal función de la mucosa oral de revestimiento es la de servir como protección de la cavidad oral actuando como barrea contra el paso de sustancias extrañas. Además, abundan las fibras elásticas permitiendo la contracción y relajación del tejido. La mucosa oral de revestimiento se encuentra en labios, paladar blando, mejillas, zona ventral de la lengua y el suelo de la boca. El tejido epitelial encontrado es del tipo no queratinizado. Específicamente, el suelo de la boca expresa CK4, CK5, CK6, CK13, CK14, CK16 y CK19, los labios y mejillas expresan CK1, CK4, CK5, CK13 y CK14, la zona ventral de la lengua expresa las CK4, CK5, CK6, CK13, CK14 y CK16 y el paladar blando expresa CK7, CK8, CK18 y CK19. El tejido conectivo de la mucosa oral de revestimiento puede ser laxo o semidenso y posee una submucosa bien definida con glándulas salivares, tejido adiposo y fibras de músculo estriadas.

En segundo lugar, se encuentra la **mucosa oral especializada**. La mucosa oral especializada puede tener una función gustativa y una función defensiva dependiendo del área anatómica en la que se encuentre en la cavidad oral, o bien en el dorso de la lengua, o bien en las amígdalas. En el caso de mucosa oral especializada con función gustativa, específicamente en el dorso de la lengua y botones gustativos, destaca el tejido epitelial paraqueratinizado. El dorso de la lengua expresa las CK1, CK2, CK4, CK5, CK6, CK13, CK14, CK15, CK16 y CK17 mientras que los botones gustativos expresan CK1, CK2, CK4, CK10, CK11, CK13 y CK16 además de CK8, CK18 y CK19 expresadas en las papilas gustativas. En el caso de mucosa oral especializada con función defensiva, como es el caso de las amígdalas linguales, destaca el tejido epitelial no queratinizado con expresión de CK5, CK6, CK7, CK13 y CK14. La mucosa oral especializada posee un tejido conectivo y submucosa fusionados y unidos al músculo.

Por último, se encuentra la **mucosa oral masticatoria**, principal objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. La mucosa oral masticatoria juega un papel fundamental de

soporte ya que la mucosa oral masticatoria tapiza aquellos órganos encargados en la masticación y la generación mecánica del bolo alimenticio. Es debido a esto que la mucosa oral masticatoria es de los tres tipos descritos aquella que se ve más sometida a mayor estrés mecánico debido a las intensas fuerzas de presión y fricción del movimiento masticatorio. Además, en comparación con la mucosa oral de revestimiento y especializada, la mucosa oral masticatoria es la que menor elasticidad posee, debido a la necesidad de un tejido firme que soporte y amortigüe la presión masticatoria [21]. En este sentido, la mucosa oral masticatoria se ubica principalmente en encía y paladar duro. Histológicamente, la mucosa oral masticatoria está constituida por un tejido epitelial paraqueratinizado en la encía y un tejido epitelial ortoqueratinizado en el paladar duro. Estas diferencias histológicas se ven también reflejadas en la expresión específica de CK. Concretamente, el tejido epitelial de la encía expresa CK1, CK2, CK4, CK5, CK6, CK8, CK10, CK11, CK13, CK14, CK16, CK18 y CK19 mientras que el de paladar duro expresa CK1, CK6, CK10, CK13 y CK16. Además, el tejido epitelial de la mucosa oral masticatoria muestra crestas epiteliales de mayor longitud en comparación con la mucosa de revestimiento. Por otro lado, el tejido conectivo de la mucosa oral masticatoria puede variar entre denso o semidenso. En el caso particular de la encía, existe escasa submucosa, mientras que el paladar duro presenta una marcada submucosa con tejido adiposo y glandular.

## HIPÓTESIS

La cavidad oral humana está sujeta a diversos estímulos de tipo mecánico, químico y microbiológico. Dichos estímulos conducen a un notable grado de variación de las características histológicas de la mucosa oral en las diferentes regiones de la cavidad oral. En este sentido, las investigaciones han demostrado que la mucosa oral masticatoria, sometida a importantes fuerzas biomecánicas, muestra notables diferencias a nivel histológico en la relación a la mucosa oral que reviste otras regiones de la cavidad oral. Sin embargo, en la actualidad son escasos los estudios histológicos que describan en detalle las características histológicas de la mucosa oral masticatoria. Por tanto, la presente Tesis Doctoral pretende realizar una caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica que determine las principales características microscópicas de la mucosa oral paraqueratinizada (MOP) y mucosa oral ortoqueratinizada (MOO). El desarrollo de un estudio de caracterización histológico de la mucosa oral masticatoria aumentaría el conocimiento histológico y, por ende, contribuiría a la comprensión y abordaje de diferentes patologías que afectan la mucosa oral masticatoria. Además, el estudio detallado de la mucosa oral masticatoria podría suponer el desarrollo de nuevos protocolos para la fabricación de mucosa oral artificial con características específicas de paraqueratinización y ortoqueratinización, lo cual supondría un alto impacto social y sanitario en el área de la cirugía oral y maxilofacial.

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** caracterizar los diferentes tipos de mucosa oral masticatoria humana para determinar patrones histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos como base para la generación de tejidos mediante Ingeniería Tisular.

### Objetivos específicos:

- Caracterizar el tejido epitelial de la MOP y MOO a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico utilizando marcadores específicos de diferenciación epitelial.
- Determinar la estructura, la ultraestructura y los componentes de la membrana basal de la MOP y MOO a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico.
- Caracterizar el tejido conectivo de la MOP y MOO a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico utilizando marcadores específicos de tejido conectivo.
- Establecer patrones de caracterización para los diferentes tipos de MOP y MOO para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

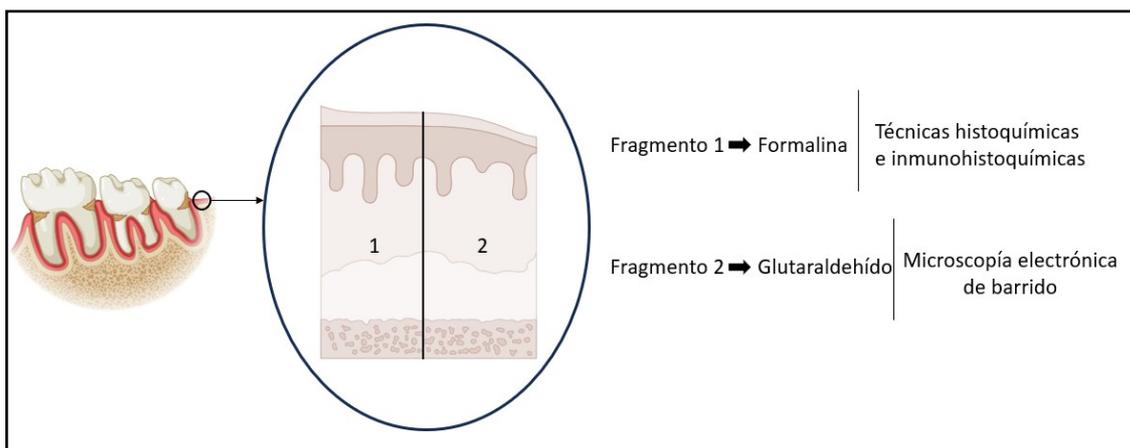
## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Obtención de muestras de mucosa oral humana masticatoria

Para dar comienzo a la realización de la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, se comenzó con la recepción de muestras de mucosa oral humana masticatoria, tanto de MOP como de MOO. Para ello, se obtuvieron biopsias de MOP y MOO de 20 pacientes sanos tras someterse a intervención quirúrgica bajo anestesia local. Todas las biopsias fueron extraídas de las áreas de la encía y paladar duro de la cavidad oral clasificándose como mucosa oral masticatoria. El tamaño medio de los fragmentos fue de alrededor de 5 x 5 mm. Todos los fragmentos fueron lavados en solución salina amortiguada e inmediatamente trasladados al laboratorio para su evaluación. Este estudio fue aprobado por el Comité Coordinador de Ética de Investigación Biomédica ref. 0116-N-19, aprobado el día 29 de mayo de 2019 y ref. 2044-n-22, aprobado el día 13 de febrero de 2023. Todas las muestras biológicas se obtuvieron con el consentimiento informado de todos los pacientes que participaron en el presente estudio.

### 2. Análisis histológico

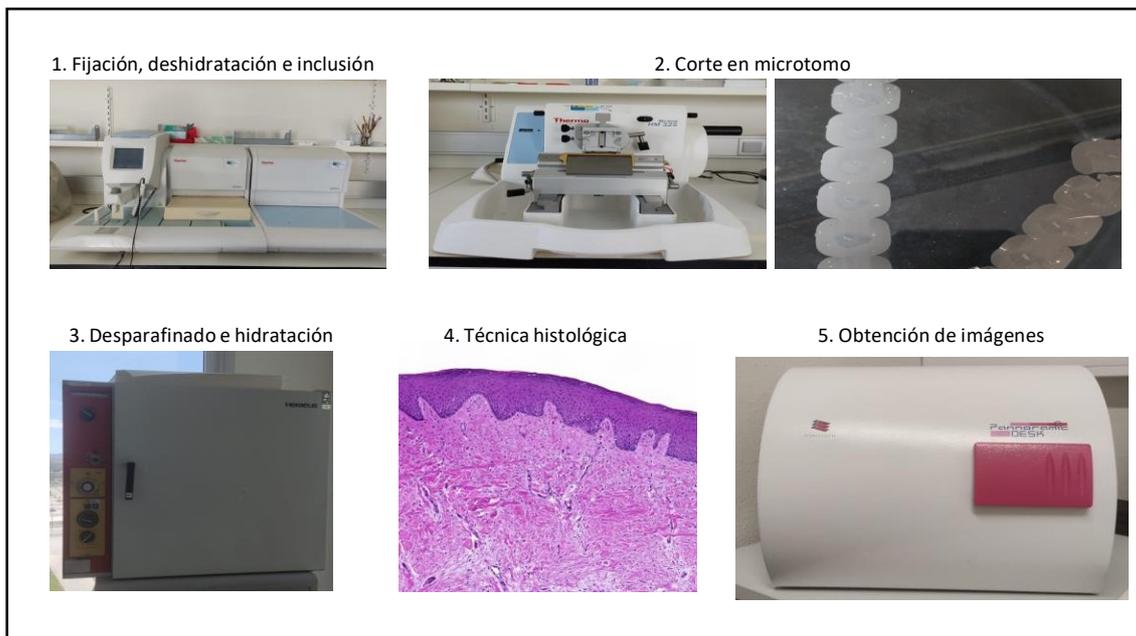
Todas las muestras de mucosa oral humana fueron divididas en dos fragmentos los cuales fueron sometidos a diferentes soluciones fijadoras. Para microscopía óptica, uno de los fragmentos fue fijado en buffer de formalina neutra al 4% (p/v) (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). Para microscopía electrónica de barrido, el fragmento restante fue fijado en tampón cacodilato al 2,5% de glutaraldehído (Figura 16).



**Figura 16. Representación ilustrada del esquema de los diferentes fijadores utilizados para el análisis histológico.** En la imagen se muestra la ubicación de procedencia de las biopsias, los dos tipos de fijadores utilizados y el destino de las muestras con relación a la fijación usada. Esquema realizado con el software Biorender.

## 2.1 Microscopía óptica

Las muestras fijadas en formalina fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (70, 90, 96 y 100%) y aclaradas en xileno para finalmente ser embebidas en bloques de parafina siguiendo el protocolo rutinario histológico. Posteriormente, haciendo uso del microtomo, se obtuvieron secciones de tejido de 3  $\mu\text{m}$  de grosor de cada muestra. Las secciones de mucosa oral humana se desparafinaron por acción del del xileno, rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 90 y 70%) y agua para someterlas a la tinción rutinaria de hematoxilina-eosina (HE). Se obtuvieron imágenes de las secciones teñidas con HE usando el escáner PANNORAMIC® Flash DESK DX (3DHISTECH, Hungría) con el fin de identificar las muestras de MOP y MOO (Figura 17).

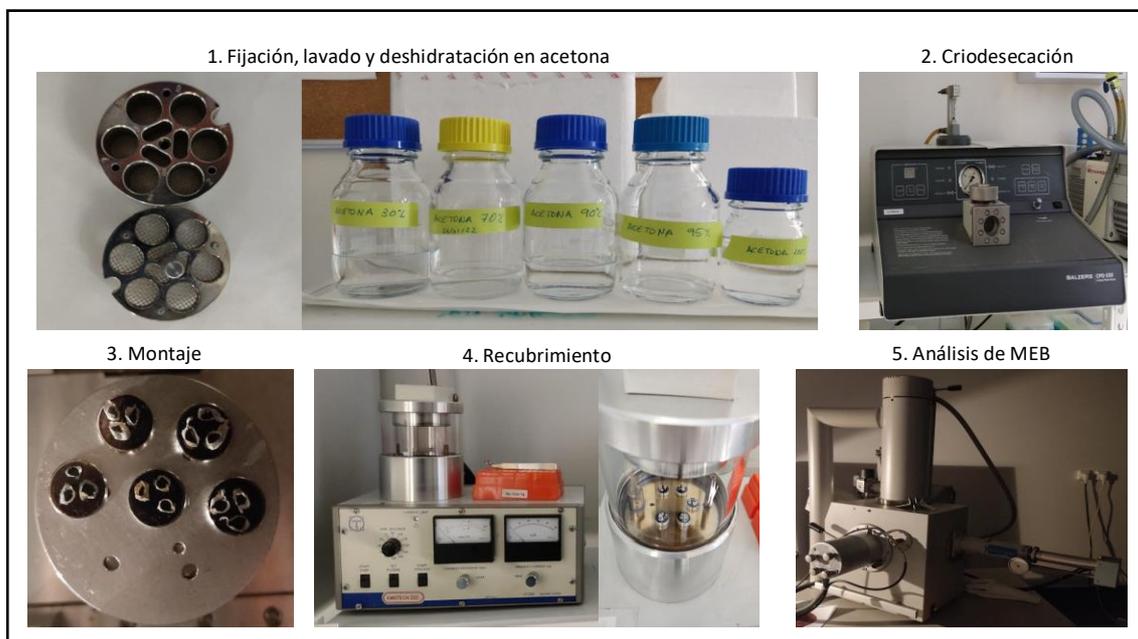


**Figura 17. Representación ilustrada del esquema del procesamiento histológico de las muestras de mucosa oral humana fijadas en formalina para el análisis de microscopía óptica.** En primer lugar, las muestras se fijan, se deshidratan y se incluyen en bloques de parafina (1). Después, se obtienen los cortes histológicos con el microtomo (2). Una vez desparafinadas e hidratadas (3) tiene lugar la técnica histológica, o bien una técnica histoquímica, o bien una inmunohistoquímica (4). Finalmente, se obtienen las imágenes de microscopía óptica (5).

## 2.2. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras de mucosa oral humana fijadas en glutaraldehído al 2,5% fueron procesadas para el análisis de MEB siguiendo protocolos previamente estandarizados [50]. Una vez fijadas durante 24h, fueron lavadas en tampón cacodilato. Posteriormente, fueron colocadas en sus respectivos grids y se deshidrataron en

concentraciones crecientes de acetona (30, 70, 90, 95 and 100%) para ser sometidas a criodeseccación por el método del punto crítico, donde cualquier resto de acetona y agua fue sustituido por CO<sub>2</sub> líquido a baja temperatura [51]. Posteriormente, se aumentó la temperatura progresivamente para evaporar todo el CO<sub>2</sub> incorporado a los tejidos. Una vez desecadas, fueron recubiertas con partículas de oro haciendo uso de un pulverizador catódico. Finalmente, todas las muestras fueron analizadas con un microscopio de barrido FEI-Quanta 200 (FEI, Eindhoven, Países Bajos). Las imágenes obtenidas fueron utilizadas para describir los patrones predominantes de diferenciación superficial en las muestras de MOP y MOO (Figura 18).



**Figura 18.** Representación ilustrada del esquema del procesamiento histológico de las muestras de mucosa oral humana fijadas en glutaraldehído para el análisis de microscopía electrónica. En primer lugar, las muestras se fijan en glutaraldehído, se lavan en tampón cacodilato y se introducen en concentraciones crecientes de acetona (1). Después, se desecan por punto crítico (2). Una vez montadas en sus respectivos grids (3) tiene lugar el recubrimiento catódico con partículas de oro (4) para finalmente analizarlas por microscopía electrónica de barrido (MEB) (5).

### 3. Análisis histoquímico

Los principales componentes de la MEC del tejido conectivo y de la membrana basal fueron detectados y analizados mediante técnicas de tinción histoquímica. Una vez que se obtuvieron las secciones de MOP y MOO, se sometieron a diferentes técnicas histoquímicas.

En primer lugar, para la identificación de componentes fibrilares de la MEC del tejido conectivo, las diferentes secciones se tiñeron haciendo uso de las técnicas histoquímicas Picrosirius Red, Verhoeff y reticulina de Gomori [47, 52, 53]. La técnica **Picrosirius Red** (PS) se basa en la capacidad de dos colorantes aniónicos de diferente tamaño molecular de unirse selectivamente a diferentes estructuras que forman parte de los tejidos. En primer lugar, el primer colorante de pequeño tamaño, el ácido pícrico, penetra rápidamente por todas las zonas de los tejidos interactuando con todos los sitios de unión catiónicos de las proteínas. En segundo lugar, el colorante de mayor tamaño molecular, el ácido Rojo Sirio F3B, solamente puede penetrar en las zonas tisulares más permeables y menos densas, donde se encuentra el colágeno. Debido al mayor tamaño molecular y al número de cargas negativas dadas por los grupos de ácido sulfónico del colorante Rojo Sirio F3B, compete selectivamente con el ácido pícrico en los sitios de unión del colágeno, siendo el colorante de mayor tamaño el que presenta mucha mayor afinidad. Es por esto, que finalmente el colágeno tisular queda teñido de color rojo intenso gracias al colorante Rojo Sirio F3B, mientras que el resto de las estructuras tisulares como citoplasmas, quedan teñidas de color amarillo por acción del ácido pícrico [54]. Por este motivo, las secciones de mucosa oral humana se incubaron durante 30 min en el colorante ácido Rojo Sirio F3B siendo contrastadas con hematoxilina de Harris durante 5 min. Finalmente, las fibras de colágeno quedaron teñidas y pudieron ser visualizadas por microscopía óptica identificándose por un color rojo intenso. Por otro lado, la técnica de **Verhoeff** (VR) se fundamenta en la capacidad de la solución de Verhoeff, una mezcla de un complejo de hematoxilina, cloruro férrico, yodo y yoduro de potasio, de teñir las fibras de elastina de los tejidos. Concretamente, parte de los iones férricos oxidan a la hematoxilina formando hemateína, la cual forma un complejo negro oscuro con el resto de los iones de hierro. El complejo hierro-hemateína se une a la elastina a través de fuerzas de van der Waals [54]. Por ello, las secciones de mucosa oral humana se incubaron durante 10 min en la solución de Verhoeff y se diferenciaron durante 15 seg en una solución de cloruro férrico al 2%. La técnica VR permite la visualización de las fibras elásticas de un color negro intenso en microscopía óptica. Finalmente, se llevó a cabo la técnica de la **reticulina de Gomori** (RG). El fundamento de esta tinción se basa en la capacidad de la reticulina, formada principalmente por la asociación de colágeno tipo III con glucoproteínas que poseen un alto porcentaje de

azúcares tipo hexosas, de reducir el ion diamina de plata en plata metálica. Concretamente, los grupos hidroxilos de las hexosas son oxidados a aldehídos por acción del permanganato de potasio. Consecuentemente, los iones aldehídos reducen al ion diamina de plata, produciendo la precipitación de la plata metálica. Debido a que en esta reacción no se precipita toda la plata metálica, un paso posterior llevado a cabo por el formaldehído con ayuda de la plata metálica precipitada como catalizador, da lugar a la completa reducción del ion diamina de plata restante, precipitando de nuevo la plata metálica en los sitios donde se encuentran las hexosas de la reticulina y dando lugar a la impregnación metálica de dicha reticulina, quedando teñida de una coloración negra intensa [54]. Por ello, las secciones de mucosa oral humana se incubaron en permanganato de potasio al 1% para ser oxidadas, seguidas de una incubación en metabisulfito de sodio al 2% para blanquear las secciones y de un paso de sensibilización con alumbre de hierro al 2% permitiendo que la plata se una a las fibras reticulares en un paso posterior. Tras la sensibilización, las secciones se sometieron a una solución de plata amoniacal preparada en fresco durante 1 h a 60°C en estufa, y a formaldehído al 20% con el fin de reducir y precipitar la plata unida a las fibras de reticulina de las secciones. Las secciones fueron diferenciadas en cloruro de oro al 2% con el fin de aumentar la coloración negra de la plata precipitada unida a las fibras de reticulina y lavadas en tiosulfato al 2% para eliminar el exceso de plata precipitada no unida a las fibras de reticulina. Finalmente, las secciones fueron contrastadas usando el colorante Rojo Nuclear. La técnica RG permite la visualización por microscopía óptica de las fibras de reticulina de los tejidos de un color negro intenso mientras que el resto del tejido queda teñido levemente de un color rosa claro.

En segundo lugar, los componentes no fibrilares de la sustancia fundamental de la MEC fueron detectados haciendo uso de las técnicas histoquímicas Alcian Blue y del ácido peryódico de Schiff. La técnica **Alcian Blue** (AB) se basa en la ionización de los grupos carboxilos y sulfatos de los proteoglicanos a pH 2,5 para que interaccionen electrostáticamente con el colorante Azul Alcían, compuesto principalmente por una molécula que posee un átomo central de cobre y cuatro grupos básicos cargados positivamente de isotiouronio, quedando los proteoglucanos teñidos de una coloración azul cielo [54]. Por ello, las diferentes secciones de mucosa oral humana fueron

incubadas en una solución ácida de Azul Alcían a pH 2,5 durante 30 min. Tras esta incubación, las secciones fueron contrastadas con solución de Rojo Nuclear por 1 min. La técnica AB permite la visualización de proteoglicanos ácidos por microscopía óptica de las secciones de mucosa oral humana teñidos de un color azul cielo. Por último, la técnica del **Ácido Peryódico de Schiff (PAS)** se basa en la capacidad del ácido peryódico de oxidar los azúcares neutros de los carbohidratos y glucoproteínas de los tejidos, concretamente en los grupos hidroxilos unidos a átomos de carbono adyacentes, dando lugar a grupos aldehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff mediante la formación de un complejo que da lugar a una coloración púrpura en los azúcares [54]. Por ello, las secciones de mucosa oral humana fueron incubadas en una solución de ácido peryódico al 0,5% durante 5 min y posteriormente se incubaron en solución de Schiff durante 15 min. Finalmente, las secciones fueron contrastadas usando hematoxilina de Harris por 1 min. La técnica PAS permite la visualización de carbohidratos y glucoproteínas teñidas de un color púrpura por microscopía óptica.

#### **4. Análisis inmunohistoquímico**

Para la detección de las proteínas específicas de las diferentes capas del tejido epitelial, membrana basal y tejido conectivo se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas indirectas usando los anticuerpos primarios detallados en la Tabla 1. El fundamento de las técnicas inmunohistoquímicas se basa en la capacidad de detectar antígenos de interés en los tejidos a través del uso de anticuerpos primarios que se unen específicamente a los epítomos de los antígenos de interés. Una vez unido el anticuerpo primario al antígeno, un anticuerpo secundario ligado a una enzima peroxidasa se une al anticuerpo primario. Finalmente, al incubar las muestras con un sustrato formado por diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno, la enzima peroxidasa es capaz de reaccionar con el sustrato dando lugar a un precipitado marrón oscuro localizado en la zona tisular donde se encuentra el antígeno de interés. Este precipitado se puede visualizar por microscopía óptica mostrando la localización de nuestra proteína de interés en el tejido analizado.

En la presente Tesis Doctoral, se analizaron en primer lugar las proteínas específicas del tejido epitelial tales como CKAE1/AE3, CK5, CK8, CK10, CK13, CK14, CK17, filagrina (FLG),

involucrina (INV), desmoplaquina (DSP), claudina (CLDN) y Ki67. Después, se continuó el análisis de las proteínas específicas del tejido conectivo tales como versicano (VCAN) y decorina (DC). Además, con el fin de evaluar la red vascular de la MOP y MOO, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico haciendo uso de marcadores endoteliales como CD34 que detecta vasos sanguíneos de menor calibre y de actina de músculo liso (SMA) que detecta vasos sanguíneos de mayor calibre. Para la identificación de células del tejido conectivo y determinar su densidad y distribución en el mismo, se usó el marcador vimentina (VIM). Finalmente, para identificar la presencia de la membrana basal, se usó el marcador colágeno tipo IV (COLIV).

Para llevar a cabo la inmunodetección de las proteínas de interés, las secciones de MOP y MOO se desparafinaron y rehidrataron. Posteriormente se llevó a cabo una recuperación antigénica química a 95°C usando, o bien un módulo PT (Vitro, España) con tampón citrato (pH=6) o con tampón ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH=8), o bien una recuperación enzimática haciendo uso de enzimas tales como pepsina y condroitinasa, o combinando ambas técnicas tanto la recuperación química como la enzimática. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó incubando las muestras en peróxido de hidrógeno al 10% en metanol durante 10 min. El bloqueo de sitios de unión inespecíficos se realizó usando suero de caballo (Laboratorios Vector) y caseína. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 1h en una cámara húmeda. Una vez realizada la incubación de los anticuerpos primarios, los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano se incubaron por 30 min. La detección visual de las proteínas específicas se llevó a cabo usando DAB, que reacciona con la peroxidasa dando lugar a un precipitado de color marrón oscuro. Finalmente, las muestras se contrastaron con hematoxilina de Harris.

Anticuerpo	Referencia	Dilución	Recuperación antigénica
CKAE1/AE3	MAD-001000QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer EDTA (pH 8)
CK8	MAD-000683QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
CK5	MAD-000491QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
CK14	MAD-005103QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
CK13	MAD-000622QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
CK17	MAD-000734QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
CK10	MAD-000535QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
FLG	Ab221155; ABCAM, UK	1:5000	Buffer Citrato (pH 6)
INV	MAD-000164QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Proteínasa K; 37°C 10 min
DSP	AM09122SU-N; Acris Antibodies, Germany	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
CLDN	MAD-000523QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
Ki67	MAD-000310QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer EDTA (pH 8)
VCAN	Ab19345; ABCAM, UK	1:100	Condroitinasa; 37°C 60 min
DCN	AF143RD; R&D Systems, USA	1:500	Condroitinasa; 37°C 60 min
CD34	Ab81289; ABCAM, UK	1:2500	Buffer Citrato (pH 6)
SMA	MAD-001195QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer Citrato (pH 6)
VIM	V6389; Sigma-Aldrich, USA	1:200	Buffer Citrato (pH 6)
COLIV	MAD-000733QD; Vitro S.A., Spain	Prediluido	Buffer EDTA (pH 8) y Pepsina; 37°C 10 min

**Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en el estudio inmunohistoquímico de la mucosa oral humana.** La tabla muestra la dilución utilizada, la referencia junto a la casa comercial y las condiciones de recuperación antigénica para la detección de la proteína de interés.

## 5. Análisis cuantitativo

Para evaluar el grado de expresión de cada marcador se realizaron mediciones cuantitativas de la señal inmunohistoquímica usando el software ImageJ (versión 1.53k, National Institutes of Health, Bethesda, MD) [55-58]. Por un lado, las principales características histomorfológicas de la mucosa oral humana fueron cuantitativamente analizadas como se ha explicado anteriormente. En cada tipo de muestra, MOP y MOO, se analizó la longitud y el espesor epitelial, el área ocupada por cada célula epitelial en cada estrato del tejido epitelial, es decir, en el estrato basal, en el estrato espinoso, en el estrato granuloso y en el estrato superficial, y la longitud y espesor de las crestas epiteliales y las papilas coriales utilizando la herramienta "línea" del software ImageJ haciendo uso de una escala de referencia como control. Un total de 30 medidas fueron obtenidas por tipo de muestra y por cada parámetro. Además, los resultados obtenidos en el análisis histoquímico e inmunohistoquímico de los componentes de la MEC del tejido conectivo (PS, AB, VCAN y DCN) fueron cuantificados usando el mismo software. Para ello, en cada muestra se cuantificó la intensidad de señal obtenida en cada análisis usando la herramienta "cuadrado" del software (25  $\mu\text{m}$  x 25  $\mu\text{m}$ ) obteniendo un valor numérico expresado como unidad de intensidad de señal. Aleatoriamente, se seleccionaron 30 áreas del área papilar y subpapilar del tejido conectivo de la MOP y MOO, y los datos resultantes fueron procesados restándoles a dichos valores, los valores en blanco [56, 59, 60].

Además, el porcentaje de células positivas para Ki67 fue determinado en el estrato basal de las muestras de MOP y MOO, y el porcentaje de células positivas y negativas fue calculado para cada tipo de tejido. Para el análisis de vasos sanguíneos, cada tipo de muestra fue evaluado para los marcadores CD34 y SMA, y el número de vasos positivos para cada uno de estos marcadores fue determinado tanto en el área papilar como subpapilar del tejido conectivo para calcular el número de elementos vasculares positivos para cada marcador por  $\text{mm}^2$  de tejido conectivo. Para determinar el número de células del tejido conectivo en el área papilar y subpapilar, las muestras positivas para VIM fueron analizadas, y se calculó el número total de células VIM positivas por  $\text{mm}^2$  de tejido conectivo.

Finalmente, la intensidad de señal inmunohistoquímica obtenida para CKAE1/AE3, CK8, CK5, CK14, CK13, CK17, CK10, FLG e INV fue evaluada semicuantitativamente en los diferentes estratos del tejido epitelial de la MOP y MOO como fuertemente positiva (+++), positiva (++) , levemente positiva (+) o negativa (-) [47]. En resumen, las imágenes correspondientes a cada tipo de muestra fueron analizadas por tres histólogos independientemente, quienes calificaron la intensidad de señal de cada estrato haciendo uso de la anterior escala semicuantitativa. En caso de discordancia en un análisis específico, se recurrió a un cuarto histólogo para evaluar la intensidad de la señal.

## **6. Análisis estadístico**

Los resultados cuantitativos obtenidos para las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas PS, AB, VCAN, DCN, Ki67, CD34 y SMA fueron estadísticamente analizados para identificar diferencias estadísticas entre la MOP y MOO. Para cada análisis, primero se evaluó la normalidad de cada distribución haciendo uso del test Shapiro-Wilk. Como ninguna de las distribuciones cumplía con los criterios de normalidad, las comparaciones entre la MOP y MOO se llevaron a cabo haciendo uso del test no paramétrico Mann-Whitney. Las comparaciones fueron realizadas con el software Real Statistics Resource Pack (Release 7.2) (Dr. Charles Zaiontz, Purdue University, West Lafayette, IN, EEUU), disponible en [www.real-statistics.com](http://www.real-statistics.com). Un valor  $p$  ajustado por Bonferroni de 0,001 fue considerado como estadísticamente significativo para la corrección de pruebas múltiples.

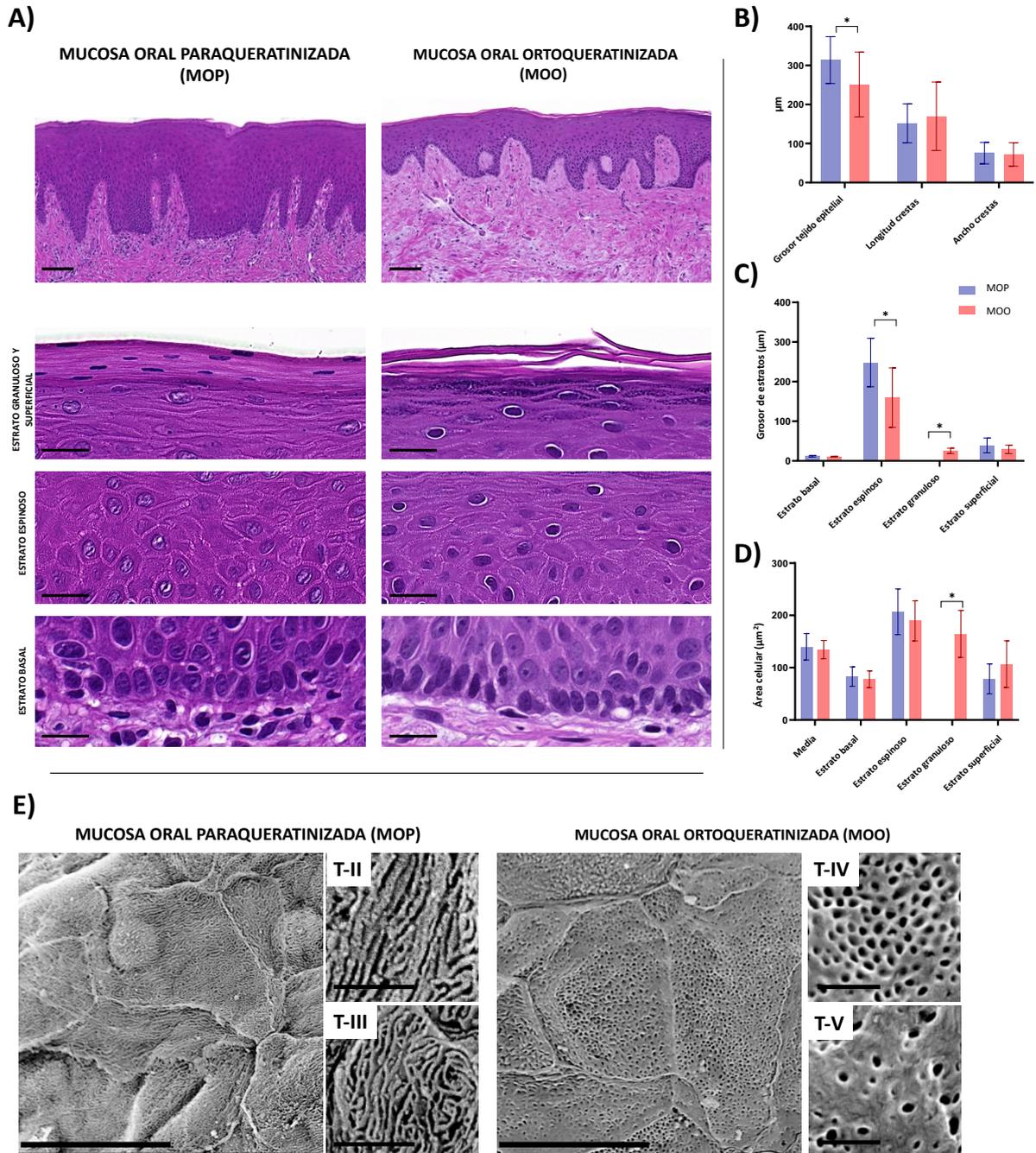
## RESULTADOS

### 1. Análisis histológico e histomorfológico del tejido epitelial de la mucosa oral humana

La evaluación histológica del tejido epitelial de la MOP y MOO teñido con hematoxilina y eosina reveló la presencia de un tejido epitelial bien desarrollado constituido por estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato superficial en las muestras de MOP y MOO (Figura 19A). Sin embargo, la MOO mostró un estrato granuloso bien desarrollado caracterizado por la presencia de gránulos de queratohialina, y un estrato superficial consistente de abundantes células escamosas planas anucleadas que muestran claros signos de cornificación y descamación, mientras que la MOP estaba desprovista de un estrato granuloso presentando un estrato superficial formado por células altamente adheridas entre sí con núcleos planos y elongados (Figura 19A). Cuando se cuantificaron las características histomorfológicas del tejido epitelial, se descubrió que el tejido epitelial de la MOP era significativamente más grueso que el observado en la MOO ( $p=0.0008$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el caso de la longitud y el ancho de las crestas epiteliales en cada tipo de tejido ( $p>0.05$ ) (Figura 19B y Tabla 2). Además, cuando se analizó específicamente el grosor de cada estrato del tejido epitelial (Figura 19C), se observó diferencia significativa en el estrato espinoso de MOP y MOO, siendo de mayor grosor el estrato espinoso de la MOP ( $p<0.0001$ ). El análisis del estrato granuloso confirmó la presencia exclusiva en la MOO ( $p<0.0001$ ). Por otra parte, se observaron diferencias no significativas en el grosor del estrato basal y superficial de la MOP y MOP ( $p>0.05$ ). Con respecto al área celular de cada estrato epitelial, únicamente había diferencias significativas entre la MOP y MOO en el estrato granuloso ( $p<0.0001$ ) (Figura 19D y Tabla 2), debido a que dicho estrato solo estaba presente en la MOO.

Por otro lado, el análisis de los patrones de superficie del tejido epitelial en la MOP y MOO reveló diferencias entre las muestras. Como se muestra en la Figura 19E, las células superficiales de la MOP mostraban de manera evidente la presencia de núcleos, mientras que las células de la MOO se mostraban como células planas y sin presencia nuclear. Además, un análisis a mayor magnificación mostró la presencia de un patrón de microplacas rectas de tipo II y microplacas curvas de tipo III en la superficie de las

muestras de MOP, mientras que en la MOO se observaban microplacas de tipo IV y tipo V (Figura 19E).



**Figura 19. Análisis histológico de la MOP y MOO.** A: caracterización histológica de muestras teñidas con HE mediante microscopía óptica. B: histograma correspondiente a los resultados del análisis cuantitativo del grosor del tejido epitelial y de la longitud y ancho de las crestas epiteliales. C: resultados del análisis cuantitativo del grosor de los estratos basal, espinoso, granuloso y superficial del tejido epitelial. D: resultados de la cuantificación del área celular en el tejido epitelial y en cada estrato del tejido epitelial. E: análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie de la MOP y MOO. Se muestran los patrones de superficie tipo II, III, IV y V (T-II, T-III, T-IV, T-V). Escala: 100 µm para imágenes de microscopía óptica, 20 µm para imágenes de la MEB y 2,5 µm para imágenes aumentadas. Diferencias estadísticamente significativas se muestran como asteriscos en los histogramas (\*).

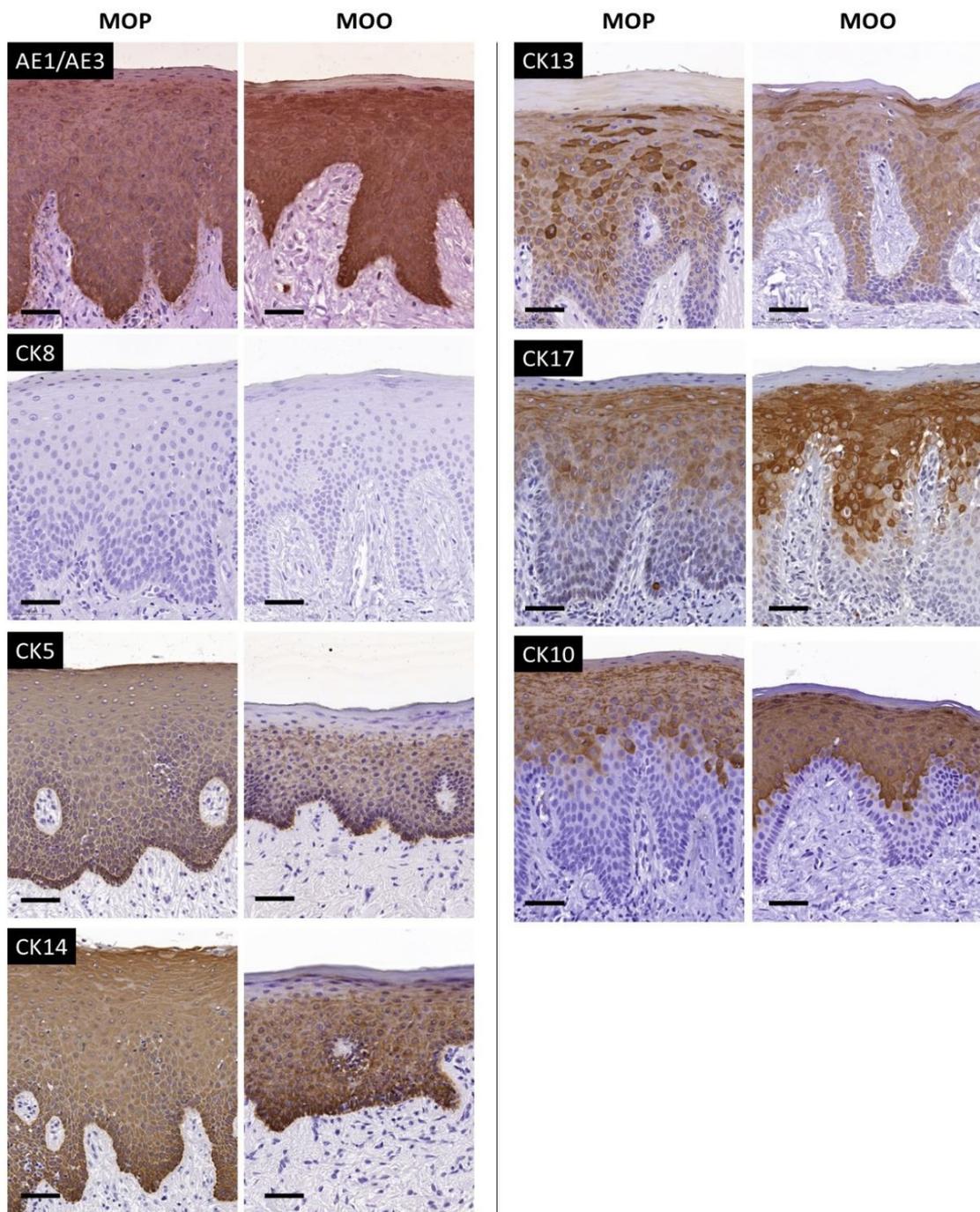
		MOP	MOO	Valor p
Análisis histomorfológico del tejido epitelial de la mucosa oral masticatoria	Grosor epitelial ( $\mu\text{m}$ )	313.69±60.08	245.89±78.05	0.0008*
	Longitud de las crestas epiteliales ( $\mu\text{m}$ )	151.82±50.07	169.85±87.73	0.5619
	Ancho de las crestas epiteliales ( $\mu\text{m}$ )	75.43±27.48	71.88±29.83	0.3817
	Grosor del estrato basal ( $\mu\text{m}$ )	11.38±1.57	10.68±1.25	0.0797
	Grosor del estrato espinoso ( $\mu\text{m}$ )	247.98±61.08	159.62±74.94	0.0000*
	Grosor del estrato granuloso ( $\mu\text{m}$ )	0±0	25.44±6.59	0.0000*
	Grosor del estrato superficial ( $\mu\text{m}$ )	39.13±18.73	28.91±10.54	0.0591
	Área total de las células epiteliales ( $\mu\text{m}$ )	139.93±25.26	134.61±17.42	0.5039
	Área de las células del estrato basal ( $\mu\text{m}^2$ )	83.07±18.55	77.77±15.9	0.2794
	Área de las células del estrato espinoso ( $\mu\text{m}^2$ )	206.83±43.6	189.56±38.5	0.0995
	Área de las células del estrato granuloso ( $\mu\text{m}^2$ )	0±0	164.37±44.88	0.0000*
	Área de las células del estrato superficial ( $\mu\text{m}^2$ )	78.5±28.64	106.74±44.49	0.0105
Análisis histoquímico e inmunohistoquímico de los componentes de la MEC del tejido conectivo de la mucosa oral humana masticatoria	PS (tejido conectivo papilar) (intensidad de píxel media)	92.66±18.27	143.56±23.31	0.0000*
	PS (tejido conectivo subpapilar) (intensidad de píxel media)	99.91±17.75	135.31±22.99	0.0000*
	AB (tejido conectivo papilar) (intensidad de píxel media)	48.7±5.45	52.57±9.57	0.0611
	AB (tejido conectivo subpapilar) (intensidad de píxel media)	56.03±12.57	69.77±9.59	0.0000*
	VCAN (tejido conectivo papilar) (intensidad de píxel media)	73.45±12.48	105.46±31.45	0.0000*
	VCAN (tejido conectivo subpapilar) (intensidad de píxel media)	96.73±8.22	128.77±13.31	0.0000*
	DCN (tejido conectivo papilar) (intensidad de píxel media)	88.39±24.6	104.2±13.78	0.0076
	DCN (tejido conectivo subpapilar) (intensidad de píxel media)	68.79±15.4	71.77±7.84	0.4671
Análisis de los vasos sanguíneos y densidad celular en el tejido conectivo de la mucosa oral humana masticatoria	Vasos sanguíneos CD34 positivos (tejido conectivo papilar) (número de vasos sanguíneos/ $\text{mm}^2$ )	356.96±217.59	272.15±91.44	0.7197
	Vasos sanguíneos CD34 positivos (tejido conectivo subpapilar) (número de vasos sanguíneos positivos/ $\text{mm}^2$ )	68.18±49.7	62.73±39.49	0.9314
	Vasos sanguíneos SMA positivos (tejido conectivo papilar) (número de vasos sanguíneos/ $\text{mm}^2$ )	405±377.29	229.85±139.95	0.7396
	Vasos sanguíneos SMA positivos (tejido conectivo subpapilar) (número de vasos sanguíneos/ $\text{mm}^2$ )	100.44±80.39	80.15±74.39	0.5045
	Células VIM positivas (tejido conectivo papilar) (células positivas/ $\text{mm}^2$ )	12.7±2.72	16.7±3.47	0.0002*
	Células VIM positivas (tejido conectivo subpapilar) (células positivas/ $\text{mm}^2$ )	9.4±2.91	10.1±3.31	0.6842

**Tabla 2. Análisis cuantitativo de los principales parámetros analizados.** Para cada parámetro, la media y desviación estándar son mostradas para la MOP y MOO. Los valores de *p* corresponden a la comparación estadística de los resultados obtenidos en la MOP vs. los resultados obtenidos en la MOO. Diferencias estadísticamente significativas se muestran como asteriscos (\*).

## **2. Caracterización inmunohistoquímica de los componentes epiteliales de la mucosa oral humana**

El patrón de expresión de CK del tejido epitelial de la mucosa oral se analizó a partir de técnicas inmunohistoquímicas (Figura 20 y Tabla 3), que revelaron la existencia de diferencias entre la MOP y MOO. Primero, el análisis del perfil de expresión de CKAE1/AE3 mostró una señal intensa de dicho marcador en todos los estratos del tejido epitelial de la MOP y MOO, aunque la expresión era menor en el estrato superficial de la MOO. Asimismo, se observó que todas las muestras eran negativas para el marcador de tejido epitelial simple CK8. La detección inmunohistoquímica de CK5 y CK14 reveló una fuerte expresión positiva en el estrato basal de la MOP y MOO y una expresión positiva en los estratos espinoso y estrato superficial de la POM y del estrato espinoso de la MOO, siendo los estratos granuloso y superficial de la MOO levemente positivos (Figura 20 y Tabla 3). Para el marcador de queratinización CK10, los resultados mostraron una expresión positiva en los estratos espinoso y superficial de la MOP y una fuerte expresión positiva en los estratos espinoso y granuloso de la MOO. El análisis de CK13 y CK17 mostró que los estratos basal y superficial de la MOP y MOO eran negativos para ambos marcadores, mientras que el estrato espinoso de la MOP y MOO y el estrato granuloso de la MOO variaban entre positivos y fuertemente positivos CK13 y CK17.

El análisis de expresión de la proteína INV, un marcador de células epiteliales bien diferenciadas, mostró una fuerte expresión positiva en el estrato espinoso, y una leve expresión positiva en el estrato superficial de la MOP. En la MOO, se mostró una fuerte señal positiva en los estratos espinoso y estrato granuloso y una señal levemente positiva en el estrato superficial. Para el análisis de expresión de FLG, también relacionada a la diferenciación epitelial, se observó una baja expresión en el estrato espinoso de la MOP y una señal positiva en el estrato granuloso de la MOO (Figura 21A y Tabla 3).



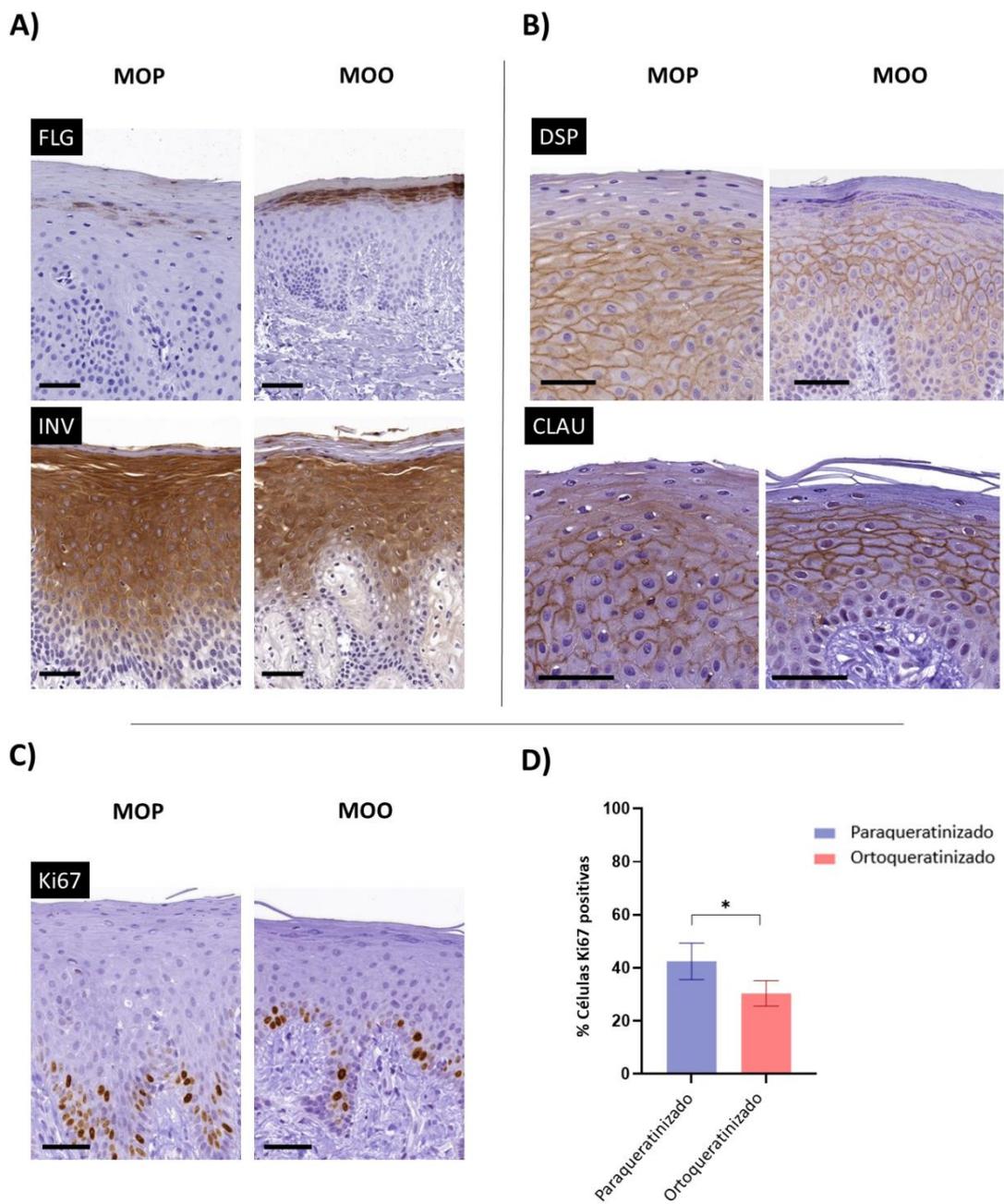
**Figura 20. Análisis del perfil de expresión de las diferentes CK de la MOP y MOO.** Análisis inmunohistoquímico para la identificación de CKAE1/AE3, CK13, CK8, CK17, CK5, CK10 y CK14. Escala: 50  $\mu$ m.

	MOP			MOO			
	Estrato basal	Estrato espinoso	Estrato superficial	Estrato basal	Estrato espinoso	Estrato granuloso	Estrato superficial
CK AE1/AE3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
CK 8	-	-	-	-	-	-	-
CK 5	+++	++	++	+++	++	+	+
CK 14	+++	++	++	+++	++	+	+
CK 10	-	++	++	-	+++	+++	-
CK 13	-	++/+++	-	-	++/+++	++/+++	-
CK 17	-	++/+++	-	-	++/+++	++/+++	-
Involucrina	-	+++	+	-	+++	+++	+
Filagrina	-	+/-	-	-	-	++	-
Desmoplaquina	+	++	-	+	++	+	-
Claudina	+	++	-	+	++	+	-

**Tabla 3. Análisis inmunohistoquímico semicuantitativo de los marcadores epiteliales de cada estrato epitelial de la MOP y MOO.** Expresión en el estrato basal, espinoso, granuloso y superficial. La intensidad de señal fue semicuantitativamente determinada como fuertemente positiva (+++), positiva (++), levemente positiva (+) o negativa (-).

Además, el análisis inmunohistoquímico de las proteínas de unión intercelular tales como DSP y CLDN mostró una expresión en la periferia celular en la mayoría de las células epiteliales. En ambos tipos de muestras, MOP y MOO, se mostró una leve señal positiva en el estrato basal y una señal positiva en el estrato espinoso, siendo el estrato superficial negativo para ambos marcadores. En el caso de la MOO, el estrato granuloso fue levemente positivo (Figura 21B y Tabla 3).

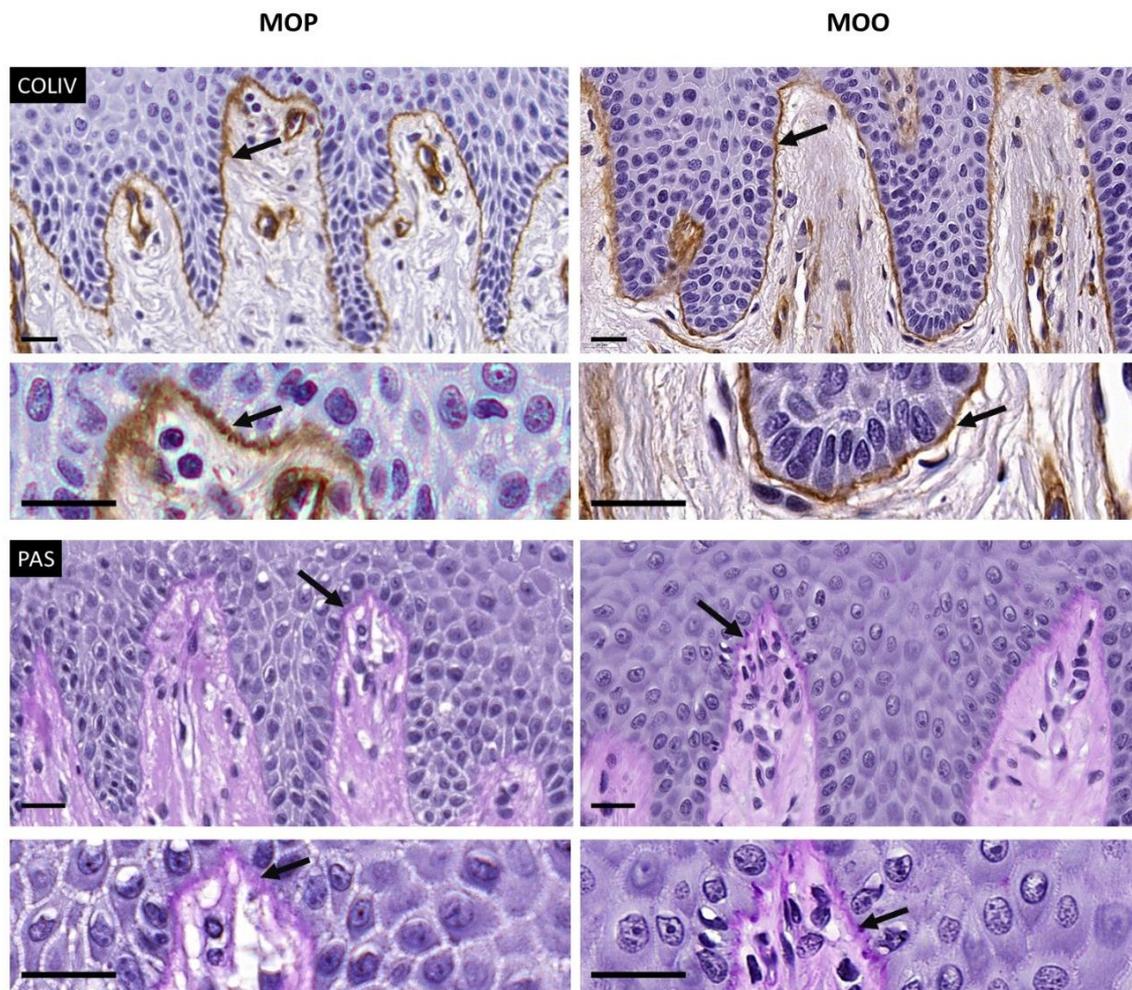
Por otro lado, se utilizó el marcador Ki67 para determinar el porcentaje de células epiteliales con actividad proliferativa en cada tipo de mucosa oral. Como muestra la Figura 21C y 21D, el porcentaje de células Ki67 positivas en la capa basal fue significativamente mayor en MOP en comparación con MOO ( $p=0.0002$ ).



**Figura 21.** Análisis inmunohistoquímico de los marcadores de diferenciación epitelial filagrina (FLG) e involucrina (IVL), marcadores de unión célula-célula desmoplaquina (DSP) y claudina (CLDN) y del marcador de proliferación Ki67 en el tejido epitelial de la MOP y MOO. El panel D muestra el análisis cuantitativo de células con expresión positiva de Ki67 en cada tipo de mucosa oral, expresado como porcentaje de células positivas. Diferencias estadísticamente significativas entre la MOP y MOO se muestran como un asterisco (\*). Escala = 50  $\mu$ m.

### 3. Caracterización de la membrana basal de la mucosa oral humana

Con el fin de identificar la membrana basal en la MOP y MOO, se utilizó el marcador inmunohistoquímico COLIV y la técnica histoquímica PAS (Figura 22). Los resultados mostraron que la membrana basal era positiva a través de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas tanto en la MOP como en la MOO, sin diferencias entre ambos tipos de mucosa oral. Los dos tipos de mucosa oral mostraron una membrana basal bien definida entre el tejido epitelial y el tejido conectivo de la mucosa oral.

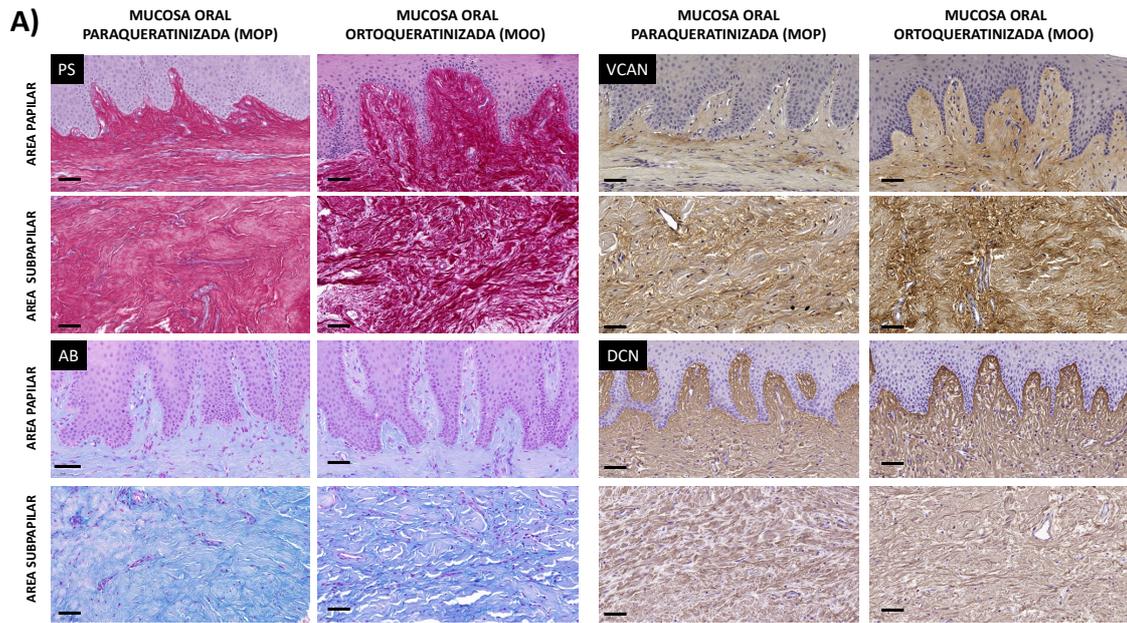


**Figura 22. Análisis de la membrana basal de la MOP y MOO.** El análisis inmunohistoquímico fue usado para la identificación de colágeno tipo IV (COLIV), mientras que los carbohidratos y glicoproteínas de la membrana basal fueron teñidos con la técnica histoquímica del Ácido Peryódico de Schiff (PAS). Las flechas indican las áreas con señal positiva para cada método analítico. Escala = 20 µm.

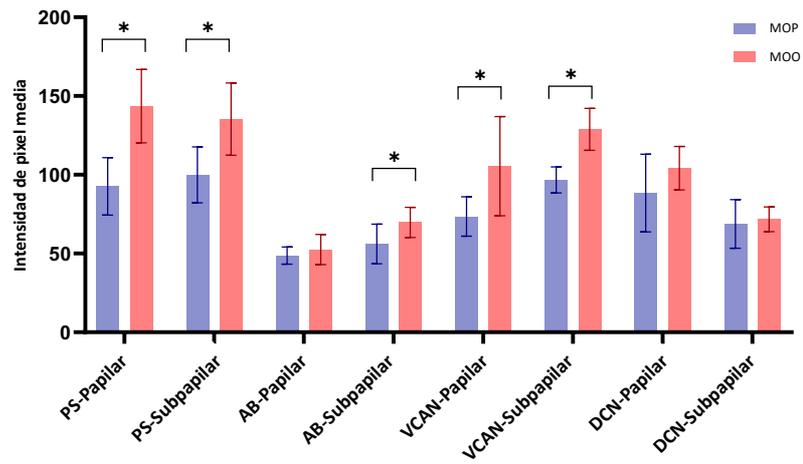
#### 4. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico de los componentes de la matriz extracelular en el tejido conectivo de la mucosa oral humana

En primer lugar, se determinó la presencia de los principales componentes fibrilares del tejido conectivo de la mucosa oral haciendo uso de las técnicas histoquímicas PS, VR y RG. Para la técnica PS, los resultados mostraron que el tejido conectivo de la MOP y MOO eran muy ricos en fibras de colágeno, y la red de colágeno se encontraba anisotrópicamente distribuida por todo el tejido conectivo (Figura 23A). Los análisis cuantitativos de la técnica PS revelaron que la intensidad de señal histoquímica de colágeno era significativamente mayor en la MOO en comparación con la MOP en el área papilar y subpapilar del tejido conectivo ( $p < 0.0001$  para cada área del tejido conectivo) (Figura 23B y Tabla 2). Para las técnicas de VR y RG, los resultados mostraron una completa ausencia de señal tanto en la MOP como en la MOO, sugiriendo que las fibras reticulares y elásticas no estaban presentes en el tejido conectivo de la mucosa oral humana masticatoria.

En segundo lugar, el análisis de los componentes no fibrilares de la MEC haciendo uso de la técnica AB mostró que la MOO contenía significativamente mayor cantidad de proteoglicanos en el área subpapilar del tejido conectivo que la MOP ( $p < 0.0001$ ), a pesar de que las diferencias entre la MOP y MOO en el área papilar no eran significativas ( $p > 0.05$ ). El análisis específico de dos proteoglicanos haciendo uso de técnicas inmunohistoquímicas confirmó que estos componentes tendían a ser más abundantes en la MOO que en la MOP, con diferencias estadísticamente significativas para VCAN (tanto en el área papilar como subpapilar del tejido conectivo, con  $p < 0.0001$  en ambos casos), pero no para DCN ( $p = 0.0076$  para el área papilar del tejido conectivo y  $p > 0.05$  para el área subpapilar) (Figura 23B y Tabla 2).



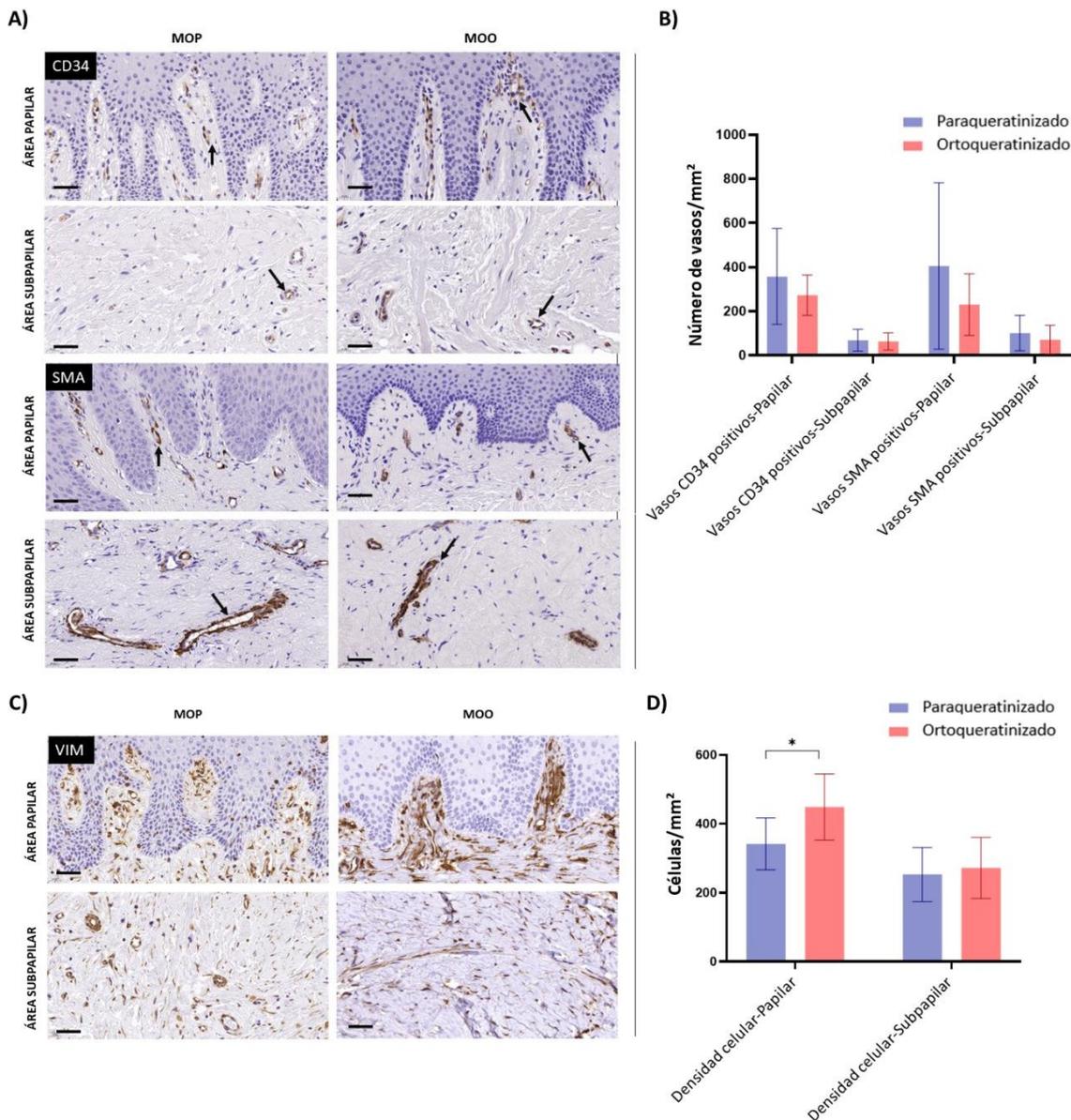
**B)**



**Figura 23. Análisis de los componentes de la matriz extracelular (MEC) del tejido conectivo de la MOP y MOO.** A) Fibras de colágeno y proteoglicanos identificados con las técnicas histoquímicas Picrosirius Red (PS) y Alcian Blue (AB) respectivamente en el área papilar y subpapilar del tejido conectivo, e identificación de los proteoglicanos versicano (VCAN) y decorina (DCN) por inmunohistoquímica. B) Análisis cuantitativo de la señal positiva de los componentes de la MEC analizados en cada área de la MOP y MOO. Las diferencias estadísticamente significativas entre la MOP y MOO se muestran como un asterisco (\*). Escala = 50  $\mu$ m.

## 5. Análisis de los vasos sanguíneos y de la densidad celular del tejido conectivo de la mucosa oral humana

El análisis de vasos sanguíneos que mostraban señal positiva para el marcador endotelial CD34 reveló que el tejido conectivo de ambos tipos de mucosa oral contenía abundantes vasos sanguíneos de pequeño calibre, especialmente en el área papilar (Figura 24A). Sin embargo, la cuantificación de estas estructuras reveló que las diferencias entre la MOP y MOO no eran significativas ni en el área papilar ni subpapilar (Figura 24B y Tabla 2). El mismo patrón fue observado cuando se cuantificó la expresión en vasos sanguíneos de mayor calibre positivos para el marcador SMA, sin diferencias significativas entre la MOP y MOO. Además, en la presente Tesis Doctoral se cuantificó el número de células del tejido conectivo localizadas en las áreas papilar y subpapilar tras realizarse la técnica inmunohistoquímica del marcador VIM. Tal y como se muestra en las Figuras 24C, 24D y Tabla 2, se observó que las células estaban localizadas preferentemente en el área papilar del tejido conectivo. Cuando el número de células del tejido conectivo era comparado entre la MOP y la MOO, se observó que el número de células era significativamente mayor en la MOO en comparación con la MOP solamente en el área papilar ( $p=0.0002$ ), sin observarse diferencias significativas entre ambas mucosas en el área subpapilar ( $p>0.05$ ).



**Figura 24. Análisis inmunohistoquímico de los vasos sanguíneos y celular densidad del tejido conectivo de la MOP y MOO.** A) Análisis de vasos sanguíneos positivos para CD34 y SMA mediante técnicas inmunohistoquímicas. Las flechas muestran vasos positivos en el área papilar y subpapilar. B) Análisis cuantitativo del número de vasos sanguíneos positivos por  $\text{mm}^2$  de tejido conectivo en cada área del tejido conectivo de la MOP y MOO. C) Identificación de células del tejido conectivo positivas para vimentina mediante técnicas inmunohistoquímicas. D) Estudio cuantitativo del número de células vimentina positivas por  $\text{mm}^2$  de tejido conectivo. Las diferencias estadísticamente significativas entre la MOP y MOO se muestran como un asterisco (\*). Escala =  $40 \mu\text{m}$ .

## DISCUSIÓN

A pesar del papel fundamental que juega la mucosa oral en la cavidad oral [61-63], hoy en día las características específicas de la MOP y de la MOO no están bien definidas dificultando su comprensión y, por ende, el tratamiento de las diversas patologías que afectan a la mucosa oral humana. En la presente Tesis Doctoral, se han llevado a cabo estudios comparativos entre ambos tipos de mucosa oral masticatoria con el fin de determinar las principales características de la MOP y MOO a nivel del tejido epitelial, de la membrana basal y del tejido conectivo haciendo uso de diversas técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas que podrían contribuir a determinar las principales características de cada tipo de mucosa oral y a elaborar un estándar de calidad que elucide los requisitos mínimos necesarios a la hora de producir por Ingeniería Tisular sustitutos artificiales de MOP y MOO. En general, los resultados ponen en relieve que ambos tipos de mucosa oral, MOP y MOO, comparten grandes similitudes, aunque también se han detectado importantes diferencias específicas a nivel histológico.

Como se esperaba, los análisis histológicos confirman que ambos tipos de mucosa oral están formados por un tejido epitelial bien definido anclado a un tejido conectivo denso a través de la membrana basal y de numerosas crestas epiteliales y papilas coriales entre ambos tejidos de mucosa oral [2, 64]. Además, los análisis histomorfológicos confirman la presencia de núcleos en todas las capas epiteliales de la MOP, así como la ausencia de núcleos en el estrato superficial de la MOO, como está reportado en la literatura (58). Por otro lado, las crestas epiteliales de la MOP y MOO mantienen una longitud sin diferencias significativas debido a que ambos tipos de mucosa oral pertenecen a la mucosa oral masticatoria, la cual se somete a fuerzas mecánicas por el movimiento masticatorio. En este sentido, el movimiento masticatorio estimula el crecimiento de las crestas epiteliales, siendo la longitud de las crestas epiteliales de la mucosa oral masticatoria mayor en comparación con la longitud de las crestas epiteliales de la mucosa oral de revestimiento y de la mucosa oral especializada, equiparándose los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral con los de otro grupo de investigación [19]. Además, se ha observado que el tejido epitelial era significativamente más grueso en la MOP, y que estas diferencias son debidas a la presencia de un estrato

espinoso mucho más desarrollado, sin evidenciar diferencias entre el estrato basal y el estrato superficial. A pesar de que estudios previos han reportado que el estrato espinoso es el más grueso del tejido epitelial oral [11, 63], estas diferencias existentes entre la MOP y MOO no habían sido hoy en día descritas en la literatura. Además, el grupo de investigación ha demostrado previamente resultados similares en piel humana, donde se observaron diferencias significativas cuando se comparaba la piel de la palma de la mano y de la planta del pie con la piel del dorso de las manos [47].

En el caso de la mucosa oral, el alto número de células en el estrato espinoso de la MOP podría implicar que este tipo de mucosa masticatoria podría estar sujeta a mayores requisitos funcionales debido a su papel como barrera protectora hermética, ya que las células del estrato espinoso presentan numerosas uniones intercelulares [10]. En este sentido, se ha demostrado que el microbioma nativo de la mucosa oral en su estado no patológico presenta diferencias regionales [65], y, por tanto, se podría hipotetizar que estas regiones sometidas a leves fuerzas masticatorias cubiertas con MOP podrían ser colonizadas por una población más abundante de microorganismos, ya que las regiones tapizadas con MOO presentan una población microbiana mucho más reducida debido a la continua descamación epitelial asociada a la masticación. Sin embargo, nace la necesidad de llevar a cabo futuras investigaciones para confirmar estos resultados.

Cabe destacar también que el análisis de la presencia de uniones intercelulares no reveló diferencias significativas entre la MOP y MOO, lo que podría explicar que ambos tipos de tejidos contienen células altamente unidas entre sí por fuertes uniones célula-célula, y que la diferencia notable entre ambos tipos de mucosas es el grosor del estrato espinoso, pero no la estructura o composición del estrato espinoso. Estos hallazgos, junto con los resultados que muestran que las células mantienen un tamaño similar en todas las capas del tejido epitelial, concuerdan con trabajos previos que sugieren que la MOP y MOO son estructuralmente similares, y que sus células contienen la misma estructura y orgánulos, a pesar de que podrían existir diferencias respecto al contenido de tonofilamentos [11].

Además, los análisis de expresión de Ki67 muestran que existe una diferencia significativa en la expresión de Ki67 entre ambos tipos de mucosa oral, siendo la MOP aquella con un mayor porcentaje de células proliferativamente activas. Estos datos

podrían correlacionarse con el mayor número celular encontrado en la MOP y con la mayor necesidad de este tejido para regenerarse, ya que dicha relación entre la función y la actividad proliferativa ha sido previamente demostrada en diversos tipos de tejido epitelial [66].

Cabe destacar que los resultados de la presente Tesis Doctoral mostraron que la MOP carecía de un estrato granuloso bien definido, mientras que en la MOO el estrato granuloso es claramente identificable, como se ha reportado en la literatura [67]. Se sabe que el estrato granuloso es el paso previo a la queratinización terminal y cornificación, y que su presencia se asocia estrictamente al estrato superficial ortoqueratinizado. A pesar de que la ausencia del estrato granuloso en la MOP ha sido brevemente reportada por la literatura, se ha demostrado que la MOO sometida a crioterapia experimenta un proceso de reversión histológica hacia la MOP, y que dicha modificación estaba asociada a la disminución de grosor del estrato granuloso [68]. Además, se ha reportado que el tejido epitelial ortoqueratinizado contiene un alto número de gránulos electrodensos de queratohialina, que son característicos del estrato granuloso, mientras que otros tipos de tejido epitelial contienen otros tipos de gránulos [62]. Estos hallazgos están en concordancia con la presencia en la MOO de microplacas de tipo IV y V que se asocian a un patrón de superficie diferenciado, especialmente en el caso del tejido epitelial ortoqueratinizado, mientras que otros tipos de tejido epitelial normalmente muestran otros tipos de patrones de diferenciación de superficie [2, 11, 33, 35, 69].

Tras caracterizar el tejido epitelial de la mucosa oral a un nivel histomorfológico, se llevaron a cabo diversos análisis inmunohistoquímicos de marcadores de tejido epitelial y se observó que el tejido epitelial de la MOP y MOO expresa una alta cantidad de CK. Las CK son proteínas de filamento intermedio que juegan un papel fundamental en las funciones de las células epiteliales, como son la diferenciación celular, la adhesión celular, la resistencia a fuerzas de estrés mecánico y la formación de una barrera protectora funcional [70-72] cuyas alteraciones han sido asociadas a diferentes patologías. En la presente Tesis Doctoral, se observó la presencia de CK en todas las capas epiteliales, especialmente en el estrato espinoso y en el estrato granuloso. La CK8 es un marcador de tejidos epiteliales simples, y normalmente solo se expresa en el

urotelio humano [73], epidídimo [74] y otros tipos de tejidos epiteliales simples. Sin embargo, el resto de las CK analizadas mostraron una alta expresión positiva tanto en la MOP como en la MOO, a pesar de que estos patrones de expresión mostraron diferencias entre ambos tipos de mucosa oral.

Cuando se analizó el estrato basal, se encontró una señal inmunohistoquímica positiva para CKAE1/AE3, CK5 y CK14, y una señal negativa para el resto de las CK estudiadas, sin diferencias entre la MOP y MOO. A excepción de la CKAE1/AE3, la CK5 y CK14 se expresan en tejidos epiteliales proliferativos, y han sido usadas como marcadores de células epiteliales proliferativas [75, 76]. La expresión de CK5 y CK14 en el estrato basal, junto con la ausencia del resto de CK asociadas a la diferenciación de células epiteliales, confirmó la naturaleza de célula madre de las células epiteliales localizadas en este estrato, sin diferencias entre la MOP y MOO.

Respecto al estrato espinoso, el análisis de expresión de CK reveló que el estrato espinoso era funcionalmente muy similar en la MOP y MOO. En realidad, las células epiteliales del estrato espinoso expresaron todas las CK a excepción de la CK8, y el patrón de expresión era muy similar en ambos tipos de mucosa oral. La única excepción se dio en la CK10, la cual se expresó con mayor intensidad en la MOO en comparación con la MOP. De hecho, estos resultados concuerdan ya que se conoce que la CK10 es un mediador de la diferenciación terminal de células epiteliales presente en las capas suprabasales del tejido epitelial de la mucosa oral humana asociándose su presencia fundamentalmente al tejido epitelial ortoqueratinizado sometido a un gran estrés biomecánico [77]. Sucesivamente, la expresión de la CK13 y CK17 en este estrato también es un resultado esperado ya que estos marcadores se encuentran en la mucosa oral humana. En este sentido, la CK13 se expresa en el tejido epitelial, y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de las diferentes capas del tejido epitelial. Su alteración se asocia a diversos tipos de disfunciones del tejido epitelial de la mucosa oral humana [78]. De manera similar, la CK17 se expresa en el tejido epitelial de la mucosa oral, y su sobreexpresión o desregulación se ha descrito como un marcador para el diagnóstico de enfermedades, entre las cuales destaca el carcinoma oral de células escamosas [79].

Adicionalmente, el análisis del estrato granuloso encontrado en la MOO mostró un patrón de expresión de CK muy similar con la MOP, a excepción de la menor expresión de CK5 y CK14 en la MOO, relacionándose estos marcadores con la indiferenciación celular, con el carácter de célula madre y con la proliferación activa. Estos resultados podrían confirmar porqué el estrato granuloso es funcionalmente similar al estrato espinoso, con la diferencia de que las células epiteliales del estrato granuloso podrían tener menor capacidad proliferativa y un mayor grado de diferenciación que las células epiteliales del estrato espinoso. Además, la literatura reporta que la CK5 y CK14, a pesar de estar relacionadas con células mitóticamente activas, también pueden expresarse en células epiteliales suprabasales que no hayan comenzado con el proceso de diferenciación [15]. Por esto, se observó expresión de CK5 y CK14 en capas suprabasales en la MOP y MOO. Además, se observó mayor expresión de CK5 y CK14 en todo el estrato espinoso de la MOP en comparación con el estrato granuloso de la MOO, correlacionándose con los resultados obtenidos del patrón de diferenciación de superficie de microplacas tipo II y tipo III y con la menor expresión de marcadores de diferenciación tales como CK10 y filagrina en la MOP en comparación con la MOO, que ponen de manifiesto el menor grado de diferenciación de las células epiteliales de la MOP en comparación con las células epiteliales de la MOO.

Finalmente, el estrato superficial del tejido epitelial de la mucosa oral mostró diversas diferencias entre ambos tipos de mucosa oral. Mientras que el estrato superficial de la MOP expresaba CKAE1/AE3, CK5, CK14 y CK10, la MOO expresaba niveles inferiores de estas CK. En este sentido, se ha demostrado que el estrato superficial de tejidos epiteliales terminalmente diferenciados como el de la MOO, consiste principalmente en diversas capas de células epiteliales escamosas que contienen abundantes lípidos [61], en los cuales el citoesqueleto experimenta un colapso estructural asociado a la agregación de F1Q y a la disrupción de proteínas intracelulares en aminoácidos básicos [80]. Por esta razón, el estrato superficial de la mucosa oral humana típicamente muestra una menor expresión de algunas CK en comparación con otros estratos del mismo tejido epitelial, como se demostró previamente en piel humana [47].

Otros marcadores típicos de tejido epitelial bien diferenciado son la filagrina e involucrina, que se asocian a la diferenciación terminal y juegan un papel crucial en la

formación de una barrera estructural protectora en tejidos epiteliales diferenciados [81]. Su presencia en la MOP y MOO podría contribuir a proteger los tejidos más profundos del ambiente potencialmente peligroso encontrado en la cavidad oral [61, 63]. En la presente Tesis Doctoral, no se han observado diferencias en la expresión de involucrina entre ambos tipos de mucosa oral. Sin embargo, la filagrina se expresaba positivamente en el estrato granuloso de la MOO, y se expresó en muy bajos niveles en las capas más superficiales del estrato espinoso de la MOP. Las células epiteliales del estrato granuloso se conocen por contener abundantes gránulos de queratohialina mayormente compuestos por filagrina y profilagrina [81], y la intensa expresión de filagrina ha sido anteriormente reportada en el estrato granuloso del tejido epitelial humano [29, 82].

Por otro lado, el estudio de la membrana basal de la MOP y MOO reveló que no existían diferencias entre ambos tipos de mucosa oral. Se ha demostrado que la presencia de una membrana basal bien diferenciada es crucial para la fisiología del tejido epitelial y la unión con el tejido conectivo subyacente [83]. La razón por la que ambos tipos de mucosa oral tienen una membrana basal bien estructurada podría asociarse a la necesidad del tejido epitelial, sometido a grandes fuerzas masticatorias, a estar firmemente sujeto al tejido conectivo y a prevenir la invasión de microorganismos [84]. En realidad, la interacción tejido epitelial-tejido conectivo mediada por la membrana basal es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de una mucosa oral funcional [85-87].

Además del tejido epitelial y de la membrana basal, el tejido conectivo es un componente fundamental para la mucosa oral humana. En este sentido, el tejido conectivo provee de un soporte estructural y fisiológico al tejido epitelial y es responsable, parcialmente, de la función que la mucosa oral humana cumple como barrera externa [88, 89]. En la presente Tesis Doctoral, se encontraron diferencias entre el tejido conectivo de la MOP y MOO. Respecto a los componentes fibrilares del tejido conectivo de la mucosa oral, los resultados mostraron diferencias significativas en la presencia de colágeno, expresándose mayor cantidad de colágeno en la MOO que en la MOP. Las fibras de colágeno juegan un papel fundamental en el control de las propiedades biomecánicas de los tejidos, y su presencia se asocia normalmente a un

aumento en la resistencia y resiliencia a las fuerzas que inciden sobre ellos [90, 91]. A pesar de ser necesario un análisis biomecánico para confirmar esta hipótesis, estos resultados que muestran que la MOO es rica en fibras colágenas tanto en el área papilar como subpapilar, sugieren que el tejido conectivo de la MOO podría mostrar una mayor resistencia a fuerzas físicas en comparación con la MOP, lo cual concuerda con las funciones específicas de cada tipo de tejido.

Por otro lado, los proteoglicanos son componentes no fibrilares importantes de la sustancia fundamental de la MEC debido a que pueden interactuar con otros componentes como fibras de colágeno para formar una red entrecruzada que provee de fuerza elástica aumentando la resistencia física del tejido [91, 92]. En la presente Tesis Doctoral, se observó que la MOO contiene más proteoglicanos identificados por la técnica AB en el área subpapilar en comparación con la MOP, a pesar de que no existan diferencias significativas en el área subpapilar. De nuevo, estos resultados podrían explicar la mayor capacidad biomecánica de la MOO en comparación con la MOP, y su mayor capacidad de soportar diferentes tipos de fuerzas físicas [91]. Además, se observó que VCAN era más abundante en el tejido conectivo de la MOO en comparación con el de la MOP. El VCAN es un proteoglicano cargado negativamente capaz de atraer iones cargados positivamente, como iones de sodio, creando un gradiente osmótico que atrae moléculas de agua a la MEC, y, por tanto, aportando al tejido conectivo una consistencia de gel capaz de resistir fuerzas de compresión y de absorber fuerzas de choque [93].

Otro hallazgo interesante de la presente Tesis Doctoral fue la mayor presencia de células del tejido conectivo en el área papilar de la MOO en comparación con el de la MOP. En este sentido, es importante mencionar que VIM no solo es un marcador de fibroblastos del tejido conectivo, sino que también lo es de macrófagos, células plasmáticas, mastocitos y linfocitos, los cuales juegan un papel crucial en la protección de la mucosa oral frente a patógenos externos que podrían entrar en la mucosa oral para colonizarla [94, 95]. A pesar de que el mayor número de células del tejido conectivo en la MOO pudiese estar relacionado con el desarrollo de una MEC más madura y compleja como la que se encuentra en la MOO, también es compatible con la necesidad de una mayor defensa por parte de células inmunitarias para protegerse de microorganismos capaces

de colonizar el tejido conectivo de la mucosa oral debido al tejido epitelial más delgado que posee la MOO.

Además, los vasos sanguíneos son componentes importantes del tejido conectivo de la mucosa oral, debido a que aportan oxígeno y nutrientes relacionándose con la homeostasis, reparación y regeneración del tejido [96]. En la presente Tesis Doctoral se pone de manifiesto que el tejido conectivo de la mucosa oral es rico en vasos sanguíneos de pequeño calibre detectados por la técnica inmunohistoquímica CD34, y en vasos de mayor calibre que contienen pared muscular detectados por la técnica inmunohistoquímica SMA. Los resultados mostraron que el área papilar de ambos tipos de tejidos presenta una mayor concentración de ambas estructuras en comparación con el área subpapilar, probablemente para favorecer en gran medida el transporte de nutrientes y oxígeno hacia el tejido epitelial el cual se encuentra sin vascularizar y metabólicamente activo [97]. A pesar de lo anterior, no se encontraron diferencias entre la MOP y MOO, sugiriendo que ambos tipos de tejidos están bien irrigados, y que la disponibilidad de oxígeno y nutrientes podría ser similar en ambos tipos de mucosa oral.

Por otro lado, la selección de los métodos de microscopía apropiados es crucial para elucidar las características histológicas, celulares y moleculares de los tejidos. En la presente Tesis Doctoral se ha empleado un enfoque multidisciplinario combinando el análisis de la microscopía óptica con las técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas además de la microscopía óptica de barrido para la identificación específica de marcadores en la MOP y MOO. Este enfoque ha permitido visualizar y evaluar la localización, intensidad y distribución de estos marcadores, proporcionando información valiosa sobre la composición celular y los procesos de diferenciación del tejido epitelial y del tejido conectivo. En primer lugar, el uso de la microscopía electrónica de barrido ha permitido identificar los patrones de superficie tridimensionales específicos que no pueden ser detectados usando otros métodos microscópicos. Por otro lado, la microscopía óptica ha sido utilizada con el fin de caracterizar la estructura de los principales componentes de la mucosa oral humana masticatoria, mientras que las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas han proporcionado información valiosa de la composición y características histofuncionales de dichos tejidos. En conjunto, la combinación de estas técnicas ha permitido la

profunda caracterización de la mucosa oral humana masticatoria. La integración de diferentes técnicas microscópicas, junto con la inclusión de imágenes de gran relevancia, han favorecido la caracterización histológica de los tipos de mucosa oral masticatoria, ayudando a la comprensión de la histoarquitectura y la función en el tejido sano y proporcionando una base sólida para futuras investigaciones de este tejido en condiciones patológicas.

En resumen, la presente Tesis Doctoral ha demostrado que la MOP y MOO comparten diversas similitudes desde un punto de vista histológico. Sin embargo, existen importantes diferencias histomorfológicas y estructurales entre ambos tipos de mucosa oral a nivel de tejido epitelial y de tejido conectivo, y estas diferencias podrían estar relacionadas a las diferentes necesidades biomecánicas de ambos tejidos. Estos resultados podrían contribuir a un mejor entendimiento de las condiciones patológicas que afectan a la mucosa oral masticatoria humana, como los diferentes tipos de neoplasias [98]. Además, estos hallazgos podrían ser útiles para la generación de diferentes tipos de mucosa oral por Ingeniería Tisular, ya que fijan un estándar de calidad para producir por Ingeniería Tisular sustitutos artificiales de MOP y MOO [33]. Sin embargo, deberían llevarse a cabo futuras investigaciones para confirmar los presentes resultados a un nivel genético y biomecánico.

Por ende, la presente Tesis Doctoral ha permitido caracterizar y analizar histológicamente la MOP y MOO de manera profunda. Esto ayudará a entender cómo pueden afectar las diversas patologías de la mucosa oral a la histoarquitectura y la funcionalidad, así como el desarrollo de nuevos tratamientos que eliminen o disminuyan los efectos adversos causados por las patologías. Además, permitirá producir tejidos artificiales de MOP y MOO que biomimeten con la mucosa oral humana, estableciendo un estándar de calidad de requisitos que deben cumplir los tejidos artificiales de MOP y MOO.

## CONCLUSIONES

1. La metodología utilizada en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha permitido la caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica de diferentes tipos de mucosa oral masticatoria humana, paraqueratinizada y ortoqueratinizada, mostrando diferentes patrones histológicos a nivel del tejido epitelial y del tejido conectivo.
2. El análisis histológico de la mucosa oral masticatoria reveló diferencias a nivel del tejido epitelial entre la mucosa oral paraqueratinizada y ortoqueratinizada. La mucosa oral paraqueratinizada mostró un estrato espinoso más grueso y una mayor expresión del marcador de proliferación celular Ki67 en comparación con la mucosa oral ortoqueratinizada. Esta correlación entre un mayor número de células y la expresión del marcador Ki67 sugieren una mayor actividad proliferativa y, por ende, una mayor capacidad de regeneración.
3. El análisis inmunohistoquímico del tejido epitelial de la mucosa oral masticatoria reveló que ambos tipos de mucosa oral, ortoqueratinizada y paraqueratinizada, fueron positivos a todos los marcadores analizados de diferenciación epitelial propios de la mucosa oral. Sin embargo, se encontraron diferencias específicas en los patrones de expresión para filagrina y citoqueratina 5, 10 y 14. Concretamente, se observó un mayor grado de expresión de filagrina y citoqueratina 10 en la mucosa oral ortoqueratinizada acompañado de un menor grado de expresión de citoqueratina 5 y 14. Estos hallazgos confirman las diferencias en la maduración y la función de las células epiteliales de los diferentes tipos de mucosa oral masticatoria.

4. El análisis histoquímico e inmunohistoquímico del tejido conectivo de la mucosa oral masticatoria mostró variaciones en la composición y distribución de las fibras de colágeno y los proteoglicanos entre la mucosa oral paraqueratinizada y ortoqueratinizada. Concretamente, se detectó un mayor grado de expresión de colágeno y proteoglicanos, como el versicano, en el área papilar y subpapilar de la mucosa oral ortoqueratinizada comparado con la mucosa oral paraqueratinizada. Estos resultados podrían relacionarse con una mayor resistencia biomecánica de la mucosa oral ortoqueratinizada, lo que podría afectar a su integridad estructural y a su capacidad de regeneración.
  
5. Los resultados generados en la presente Tesis Doctoral ponen de relieve la importancia de la utilización de diferentes técnicas histológicas avanzadas para proporcionar una comprensión detallada de los patrones histológicos de la mucosa oral masticatoria paraqueratinizada y ortoqueratinizada. Estos hallazgos son cruciales para el diseño de nuevos sustitutos artificiales de mucosa oral masticatoria paraqueratinizada y ortoqueratinizada. El nuevo conocimiento generado en la presente Tesis Doctoral resultará fundamental para el diseño de sustitutos de mucosa masticatoria como terapia avanzada capaces de mejorar la regeneración de lesiones de la cavidad oral.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barry, G. and B. Moxham, *Oral Anatomy, Histology and Embryology*. . 4 ed. 2009.
2. Gómez, M.E. and A. Campos, *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 4ª ed. 2019: Panamericana. 464.
3. Kamrani, P. and N.M. Sadiq, *Anatomy, Head and Neck, Oral Cavity (Mouth)*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
4. Kinikoglu, B., O. Damour, and V. Hasirci, *Tissue engineering of oral mucosa: a shared concept with skin*. *J Artif Organs*, 2015. **18**(1): p. 8-19.
5. Mackenzie, I.C. and W.H. Binnie, *Recent advances in oral mucosal research*. *J Oral Pathol*, 1983. **12**(6): p. 389-415.
6. Collin, M. and P. Milne, *Langerhans cell origin and regulation*. *Curr Opin Hematol*, 2016. **23**(1): p. 28-35.
7. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. *Nature*, 2007. **445**(7130): p. 843-50.
8. Munde, P.B., et al., *Pathophysiology of merkel cell*. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2013. **17**(3): p. 408-12.
9. Wynn, T.A. and K.M. Vannella, *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 450-462.
10. Groeger, S. and J. Meyle, *Oral Mucosal Epithelial Cells*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 208.
11. Adams, D., *Keratinization of the oral epithelium*. *Ann R Coll Surg Engl*, 1976. **58**(5): p. 351-8.
12. Zhang, L., *Keratin*. 2018, London: IntechOpen.
13. Rao, R.S., S. Patil, and B.S. Ganavi, *Oral cytokeratins in health and disease*. *J Contemp Dent Pract*, 2014. **15**(1): p. 127-36.
14. Smack, D.P., B.P. Korge, and W.D. James, *Keratin and keratinization*. *J Am Acad Dermatol*, 1994. **30**(1): p. 85-102.
15. Bragulla, H.H. and D.G. Homberger, *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia*. *J Anat*, 2009. **214**(4): p. 516-59.
16. Kramer, E., et al., *Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study*. *Isr Med Assoc J*, 2014. **16**(4): p. 229-32.
17. Postlethwaite, A.E., et al., *Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta*. *J Cell Biol*, 1988. **106**(2): p. 311-8.
18. Yen, H.T., et al., *The expression of cytokines by an established basal cell carcinoma cell line (BCC-1/KMC) compared with cultured normal keratinocytes*. *Arch Dermatol Res*, 1996. **288**(3): p. 157-61.
19. Wu, T., et al., *Morphogenesis of rete ridges in human oral mucosa: a pioneering morphological and immunohistochemical study*. *Cells Tissues Organs*, 2013. **197**(3): p. 239-48.
20. Seery, J.P. and F.M. Watt, *Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium*. *Curr Biol*, 2000. **10**(22): p. 1447-50.
21. Xiong, X., T. Wu, and S. He, *Physical forces make rete ridges in oral mucosa*. *Med Hypotheses*, 2013. **81**(5): p. 883-6.
22. McKelvey, K., C.J. Jackson, and M. Xue, *Activated protein C: A regulator of human skin epidermal keratinocyte function*. *World J Biol Chem*, 2014. **5**(2): p. 169-79.
23. Kowalczyk, A.P. and K.J. Green, *Structure, function, and regulation of desmosomes*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013. **116**: p. 95-118.

24. Zhang, Y.N., P.C. Lie, and X. Wei, *Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells*. *Cytotherapy*, 2009. **11**(5): p. 548-58.
25. Cepelak, I., S. Dodig, and I. Pavic, *Filaggrin and atopic march*. *Biochem Med (Zagreb)*, 2019. **29**(2): p. 020501.
26. Freeman, S.C. and S. Sonthalia, *Histology, Keratohyalin Granules*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
27. Ouban, A., *Claudin-1 role in colon cancer: An update and a review*. *Histol Histopathol*, 2018. **33**(10): p. 1013-1019.
28. Ouban, A. and A. Ahmed, *Analysis of the distribution and expression of claudin-1 tight junction protein in the oral cavity*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2015. **23**(6): p. 444-8.
29. Ishitsuka, Y. and D.R. Roop, *Loricrin: Past, Present, and Future*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(7).
30. Watt, F.M., *Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation*. *J Invest Dermatol*, 1983. **81**(1 Suppl): p. 100s-3s.
31. Joshi, R., *Learning from eponyms: George F. Odland and Odland bodies*. *Indian Dermatol Online J*, 2014. **5**(3): p. 334-8.
32. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2003. **121**(2): p. 231-41.
33. Alaminos, M., et al., *Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(5): p. 350-9.
34. Kullaa-Mikkonen, A., *Scanning electron microscopy in oral mucosal research: a review*. *Scanning Microsc*, 1987. **1**(3): p. 1145-55.
35. Moreu, G., et al., *Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach*. *Histol Histopathol*, 1993. **8**(1): p. 47-50.
36. Winning, T.A. and G.C. Townsend, *Oral mucosal embryology and histology*. *Clin Dermatol*, 2000. **18**(5): p. 499-511.
37. Wilson, S.E., A.A.M. Torricelli, and G.K. Marino, *Corneal epithelial basement membrane: Structure, function and regeneration*. *Exp Eye Res*, 2020. **194**: p. 108002.
38. Kadono, G., et al., *Immunohistochemical localization of type IV collagen alpha chains in the basement membrane of the pancreatic duct in human normal pancreas and pancreatic diseases*. *Pancreas*, 2004. **29**(1): p. 61-6.
39. Chandra S., C.S., Chandra M., Chandra G. and Chandra N., *Textbook of Dental and Oral Histology with Embryology and Multiple Choice Questions. 2nd edition*. 2010.
40. Groeger, S.E. and J. Meyle, *Epithelial barrier and oral bacterial infection*. *Periodontol* 2000, 2015. **69**(1): p. 46-67.
41. Lattouf, R., et al., *Picosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues*. *J Histochem Cytochem*, 2014. **62**(10): p. 751-8.
42. Wojciech, P., *ROSS. HISTOLOGÍA: TEXTO Y ATLAS*. 7 ed. 2015: LIPPINCOTT WILLIAMS AND WILKINS. WOLTERS KLUWER HEALTH.
43. Garzón I, *Estudio de marcadores de diferenciación epitelial en mucosa oral construida por ingeniería tisular*, in *Departamento de histología*. 2009, Universidad de Granada.
44. Sudo, T., et al., *Expression of mesenchymal markers vimentin and fibronectin: the clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2013. **20 Suppl 3**: p. S324-35.
45. Junqueira, L. and J. Carneiro, *Histología básica. Texto y atlas*. 6 ed. 2005.
46. Blanco-Elices, C., et al., *Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential*. *J Periodontal Res*, 2021. **56**(6): p. 1116-1131.

47. Vela-Romera, A., et al., *Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis*. *Histochem Cell Biol*, 2019. **151**(1): p. 57-73.
48. Wang, Y., R.A. Goulart, and L. Pantanowitz, *Oil red O staining in cytopathology*. *Diagn Cytopathol*, 2011. **39**(4): p. 272-3.
49. Ibáñez, M. and I. Garzón, *Study of the histological and anatomical characteristics of the human oral mucosa. A step towards the development of tailored-artificial oral mucosa*. *Actual Med*, 2021. **106**(813): p. 177-187.
50. Sanchez-Quevedo, M.C., et al., *Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium*. *Histol Histopathol*, 1994. **9**(1): p. 149-53.
51. Fernandez-Segura, E., et al., *Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis*. *Exp Cell Res*, 1999. **253**(2): p. 454-62.
52. Sanchez-Porras, D., et al., *Generation of a Biomimetic Substitute of the Corneal Limbus Using Decellularized Scaffolds*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(10).
53. García del Moral, R., *MANUAL DE LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA*. 1993: MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA.
54. Kiernan, J.A., *Histological and histochemical methods. Theory and practice*. 5 ed. 2015.
55. Carriel, V., et al., *Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. **11**(2): p. 553-563.
56. Ortiz-Arrabal, O., et al., *Generation and Evaluation of Novel Biomaterials Based on Decellularized Surgeon Cartilage for Use in Tissue Engineering*. *Biomedicines*, 2021. **9**(7).
57. Rodriguez-Pozo, J.A., et al., *Evaluation of myopic cornea lenticules. A histochemical and clinical correlation*. *Exp Eye Res*, 2020. **196**: p. 108066.
58. Ruiz-Lopez, J., et al., *Optical Behavior of Human Skin Substitutes: Absorbance in the 200-400 nm UV Range*. *Biomedicines*, 2022. **10**(7).
59. Chato-Astrain, J., et al., *Peripheral nerve regeneration through nerve conduits evokes differential expression of growth-associated protein-43 in the spinal cord*. *Neural Regen Res*, 2023. **18**(8): p. 1852-1856.
60. Ortiz-Arrabal, O., et al., *Fibrin and Marine-Derived Agaroses for the Generation of Human Bioartificial Tissues: An Ex Vivo and In Vivo Study*. *Mar Drugs*, 2023. **21**(3).
61. Dawson, D.V., et al., *Organization, barrier function and antimicrobial lipids of the oral mucosa*. *Int J Cosmet Sci*, 2013. **35**(3): p. 220-3.
62. Moore, W.J., *Current Concepts of the Histology of the Oral Mucosa*. *J Anat*, 1972. **111**: p. 471-472.
63. Wang, S.S., et al., *The maintenance of an oral epithelial barrier*. *Life Sci*, 2019. **227**: p. 129-136.
64. Ciano, J. and B.L. Beatty, *Regional quantitative histological variations in human oral mucosa*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2015. **298**(3): p. 562-78.
65. Uzunoglu, B., et al., *Mucoadhesive bilayered buccal platform for antifungal drug delivery into the oral cavity*. *Drug Deliv Transl Res*, 2021. **11**(1): p. 318-327.
66. Hill, M.W., J.H. Berg, and I.C. Mackenzie, *Quantitative evaluation of regional differences between epithelia in the adult mouse*. *Arch Oral Biol*, 1981. **26**(12): p. 1063-7.
67. Sawa, Y., et al., *Expression of SARS-CoV-2 entry factors in human oral tissue*. *J Anat*, 2021. **238**(6): p. 1341-1354.
68. Tal, H., M.A. Cohen, and J. Lemmer, *Clinical and histological changes following cryotherapy in a case of widespread oral leukoplakia*. *Int J Oral Surg*, 1982. **11**(1): p. 64-8.
69. Worawongvasu, R., *A comparative study of the surfaces of normal oral epithelia and inflammatory hyperplasias by scanning electron microscopy*. *Ultrastruct Pathol*, 2007. **31**(4): p. 283-92.

70. Jacob, J.T., et al., *Types I and II Keratin Intermediate Filaments*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).
71. Kuburich, N.A., et al., *Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together*. Semin Cancer Biol, 2022. **86**(Pt 3): p. 816-826.
72. Szeverenyi, I., et al., *The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases*. Hum Mutat, 2008. **29**(3): p. 351-60.
73. Gaston, K.E. and H.B. Grossman, *Proteomic assays for the detection of urothelial cancer*. Methods Mol Biol, 2010. **641**: p. 303-23.
74. Pinel, L., M. Mandon, and D.G. Cyr, *Tissue regeneration and the epididymal stem cell*. Andrology, 2019. **7**(5): p. 618-630.
75. Bucchieri, F., et al., *Medium-term culture of normal human oral mucosa: a novel three-dimensional model to study the effectiveness of drugs administration*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(34): p. 5421-30.
76. Thomsen, A.R., et al., *Biopsy-derived oral keratinocytes - A model to potentially test for oral mucosa radiation sensitivity*. Clin Transl Radiat Oncol, 2022. **34**: p. 51-56.
77. Bauer, K., et al., *P-cadherin controls the differentiation of oral keratinocytes by regulating cytokeratin 1/10 expression via C/EBP-beta-mediated signaling*. Differentiation, 2012. **84**(5): p. 345-54.
78. Qiao, Y., et al., *White Sponge Nevus Caused by Keratin 4 Gene Mutation: A Case Report*. Genes (Basel), 2022. **13**(12).
79. Kitamura, R., et al., *Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(8): p. 1299-310.
80. Rawlings, A.V., et al., *Stratum corneum moisturization at the molecular level*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(5): p. 731-41.
81. Furue, M., *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, 2020. **21**(15).
82. Makino, T., et al., *The expression profile of filaggrin-2 in the normal and pathologic human oral mucosa*. Arch Dermatol Res, 2016. **308**(3): p. 213-7.
83. Breitkreutz, D., N. Mirancea, and R. Nischt, *Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?* Histochem Cell Biol, 2009. **132**(1): p. 1-10.
84. Salonen, J., et al., *Immunohistochemical characterization of the basement membranes of the human oral mucosa*. Arch Oral Biol, 1984. **29**(5): p. 363-8.
85. Liu, J., J.J. Mao, and L. Chen, *Epithelial-mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(1): p. 25-31.
86. Rich, A.M. and P.C. Reade, *Epithelial-mesenchymal interactions in experimental oral mucosal carcinogenesis*. J Oral Pathol Med, 2001. **30**(7): p. 389-97.
87. Sharpe, P.M. and M.W. Ferguson, *Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems*. J Cell Sci Suppl, 1988. **10**: p. 195-230.
88. Kullage, S., et al., *Qualitative analysis of connective tissue stroma in different grades of oral squamous cell carcinoma: A histochemical study*. Indian J Dent Res, 2017. **28**(4): p. 355-361.
89. Omori, H., et al., *The Origin of Stroma Influences the Biological Characteristics of Oral Squamous Cell Carcinoma*. Cancers (Basel), 2021. **13**(14).
90. Chang, S.W. and M.J. Buehler, *Molecular biomechanics of collagen molecules*. Mater Today, 2014. **17**: p. 70-76.
91. Silver, F.H., N. Kelkar, and T. Deshmukh, *Molecular Basis for Mechanical Properties of ECMs: Proposed Role of Fibrillar Collagen and Proteoglycans in Tissue Biomechanics*. Biomolecules, 2021. **11**(7).
92. de Mattos Pimenta Vidal, C., et al., *Role of proteoglycans on the biochemical and biomechanical properties of dentin organic matrix*. Arch Oral Biol, 2017. **82**: p. 203-208.

93. Orgel, J.P., et al., *Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7028.
94. Maquart, F.X. and J.C. Monboisse, *Extracellular matrix and wound healing*. Pathol Biol, 2014. **62**: p. 91-95.
95. Waasdorp, M., et al., *The Bigger Picture: Why Oral Mucosa Heals Better Than Skin*. Biomolecules, 2021. **11**(8).
96. Naumova, E.A., et al., *The oral mucosal surface and blood vessels*. Head Face Med, 2013. **9**: p. 8.
97. Paulsen, F. and A. Thale, *Epithelial-connective tissue boundary in the oral part of the human soft palate*. J Anat, 1998. **193 ( Pt 3)**(Pt 3): p. 457-67.
98. Karantza, V., *Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers*. Oncogene, 2011. **30**(2): p. 127-38.