

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ACEITE DE
OLIVA VIRGEN EN PIEL GENERADA MEDIANTE INGENIERÍA
TISULAR**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular



Tesis Doctoral de:

Olimpia Ortiz Arrabal

Realizado bajo la dirección de:

Carolina Gómez Llorente

Miguel Alaminos Mingorance

2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Olimpia Ortiz Arrabal
ISBN: 978-84-1195-553-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/97425>

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, financiada por los siguientes proyectos de investigación y co-financiada por fondos FEDER (Unión Europea):

1. Generación de nuevos modelos de piel medicalizada a partir de la piel artificial de fibrina-agarosa ensayada clínicamente en grandes quemados. Funcionalización con fármacos y nuevos procesos de biofabricación (PE-0395-2019). Consejería de Salud y Familias. Junta de Andalucía.
2. Mucosa palatina humana generada mediante ingeniería tisular para el tratamiento de la fisura palatina (BIOCLEFT ICI19/00024). Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.
3. Fabricación y caracterización de córneas artificiales humanas altamente biomiméticas para el tratamiento regenerativo de la ceguera corneal (FIS PI23/00335). Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).
4. Optimización de modelos de piel artificial humana con propiedades físicas y biológicas mejoradas para su utilización como productos de terapias avanzadas (C-CTS-032-UGR23). Consejería de Universidad, Investigación e Innovación (Junta de Andalucía), Universidad de Granada y FEDER (UE).

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en los siguientes artículos científicos originales:

- **Ortiz-Arrabal, O.**, Chato-Astrain, J., Crespo, P.V., Garzón, I., Mesa-García, M.D., Alaminos, M., & Gómez-Llorente, C. (2022). Biological Effects of Maslinic Acid on Human Epithelial Cells Used in Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:876734. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.876734>. **Factor de impacto: 5.7; Cuartil: Q1; Percentil: 78.8.**
- **Ortiz-Arrabal, O.**, Bermejo-Casares, F., Garzón, I., Mesa-García, M.D., Gómez-Llorente, C., & Alaminos, M. (2023). Optimization of human skin keratinocyte culture protocols using bioactive molecules derived from olive oil. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 164:115000. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115000>. **Factor de impacto: 6.9; Cuartil: Q1; Percentil: 80.5.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Departamento de Histología de la Universidad de Granada la oportunidad de poder desarrollar el comienzo de mi carrera investigadora con ellos, por todos los conocimientos que he podido adquirir a lo largo de estos años y por dejarme ser parte de todos los logros tan importantes que se han alcanzado.

Dar las gracias enormemente a mi directora de Tesis Carolina Gómez Llorente, por querer formar parte de esta etapa tan bonita, por el apoyo que he recibido de su parte y por su buena disposición siempre que lo he necesitado. De igual forma, agradecer a María Dolores Mesa García su implicación tan importante en esta Tesis, por sus consejos y por las palabras tan bonitas que siempre ha tenido hacia mí.

Agradecer en especial a mi otro director de Tesis, Miguel Alaminos Mingorance, por ser mi mentor, por estar desde el primer día conmigo desde que entré al Máster en Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas, por transmitirme sus conocimientos, por su dedicación y su paciencia, por entenderme y apoyarme, por tener siempre buenas palabras hacia mí y una sonrisa a pesar de los contratiempos y, sobre todo, por creer en mí.

Al profesor Antonio Campos Muñoz por poner la primera piedra para crear este grupo de Ingeniería Tisular tan maravilloso que tantos éxitos está cosechando y por la sabiduría, entusiasmo y pasión que transmite.

Al resto de profesores y compañeros del Departamento de Histología, Ingrid, Migue, Sebas, Óscar, Fernando, Jesús, Paula, Miguel, David, Paloma... Gracias por tenderme la mano en cualquier momento y por brindarme vuestros conocimientos y consejos. En especial, quiero agradecer el apoyo y el cariño que siempre he recibido de Fabi y de Miguel Ibáñez. No solo han sido unos grandes compañeros de trabajo, sino que son unos grandes amigos. Gracias por estar en los mejores momentos, pero sobre todo en los peores, por sacarme a flote cuando estaba hundida y por hacer cada ratito en el laboratorio más especial e inolvidable.

A mis amigos, Ely, Jorge, Juanfran, Ana... por poder contar con ellos en cualquier momento a pesar de la distancia, por sentirnos tan orgullosos de todas las metas que estoy alcanzando y por celebrarlas como si fuesen vuestras.

A mis compañeros del Máster que tantas risas y buenos momentos me dieron. Nunca olvidaré esa etapa tan especial en mi vida y que fue posible porque tenía a cada uno de vosotros a mi lado.

A mi pareja, Álex, que ha sido mi sustento, una persona que ha confiado en mí y ha visto mi valía desde el primer momento, mi salvavidas en los momentos más difíciles, mi apoyo incondicional. Gracias por celebrar cada éxito y por ser una pieza fundamental e imprescindible en mi camino. Una parte de esta Tesis es tuya.

Por último, y no menos importante, a mi familia. En especial a mis padres, Olimpia y Manuel. Todo lo que he conseguido ha sido posible gracias a vuestro esfuerzo y dedicación. Gracias por creer siempre en mí, por estar a mi lado, por vuestro cariño. Soy la persona que soy gracias a vosotros. Igualmente, un pedacito de esta Tesis también es vuestra.

Gracias papá por enseñarme que se puede resurgir de las cenizas como el ave Fénix. Es lo que me ha dado fuerzas para seguir adelante.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	21
LA PIEL.....	22
<i>Origen embrionario y formación de la piel</i>	23
<i>Histología de la piel</i>	24
INGENIERÍA TISULAR.....	30
<i>Ingeniería Tisular de la piel</i>	31
<i>Compuestos bioactivos empleados para la mejora de la proliferación celular</i>	33
ACEITE DE OLIVA.....	35
<i>Composición del aceite de oliva</i>	35
<i>Propiedades del aceite de oliva</i>	36
<i>Propiedades de los compuestos bioactivos presentes en el aceite de oliva</i>	37
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ACEITE DE OLIVA.....	46
2. CULTIVOS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	46
3. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	48
4. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	48
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	49
6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS SOBRE LA EFICIENCIA EN LA GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE QUERATINOCITOS DE LA PIEL HUMANA.....	51
7. GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DE PIEL HUMANA DE FIBRINA-AGAROSA FUNCIONALIZADOS CON COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	52
8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL HUMANA.....	54
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	56
RESULTADOS.....	57
1. EFECTO DE LOS DIFERENTES COMPONENTES BIOACTIVOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS QUERATINOCITOS DE LA PIEL HUMANA MANTENIDOS EN CULTIVOS PREVIAMENTE ESTABLECIDOS.....	58
1.1 <i>Ácido maslínico</i>	58

1.2 Extracto fenólico	62
1.3 DL-3,4-dihidroxifenil glicol	66
1.4 Oleuropeína	70
2. ANÁLISIS DEL EFECTO INDUCTOR DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LOS DIFERENTES COMPONENTES BIOACTIVOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN SOBRE QUERATINOCITOS DE LA PIEL HUMANA MANTENIDOS EN CULTIVOS PREVIAMENTE ESTABLECIDOS	74
2.1 Ácido maslínico	74
2.2 Extracto fenólico	77
2.3 DL-3,4-dihidroxifenil glicol	80
2.4 Oleuropeína	83
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE QUERATINOCITOS DE LA PIEL HUMANA MANTENIDOS EN CULTIVO CON LOS DIFERENTES COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	86
3.1 Ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL (AM5)	86
3.2 Extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL (EF10)	89
3.3 Oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL (OLP5)	91
4. EFICACIA DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS PARA MEJORAR EL ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE QUERATINOCITOS A PARTIR DE BIOPSIAS DE PIEL HUMANA .	93
5. GENERACIÓN DE NUEVOS MODELOS DE PIEL ARTIFICIAL HUMANA FUNCIONALIZADOS CON COMPUESTOS BIOACTIVOS PROCEDENTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	95
6. CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS MODELOS DE PIEL ARTIFICIAL HUMANA FUNCIONALIZADOS CON COMPUESTOS BIOACTIVOS PROCEDENTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	97
6.1 Análisis del desarrollo de la epidermis en los constructos durante 12 días	97
6.2 Análisis de proliferación de la epidermis de la piel artificial	101
6.3. Análisis de diferenciación de la epidermis de la piel artificial	107
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capas presentes en la piel humana.	23
Figura 2. Queratinocitos (Q) presentes en la epidermis de la piel humana.....	25
Figura 3. Estratos que componen la epidermis de la piel humana y producción de componentes específicos en cada uno de ellos.	27
Figura 4. Dermis papilar y dermis reticular en la piel humana.	28
Figura 5. Membrana basal (MB) presente en la unión dermoepidérmica de la piel humana.....	29
Figura 6. Crestas epidérmicas y papilas dérmicas presentes en la piel humana.	30
Figura 7. Pilares fundamentales de la Ingeniería Tisular.	31
Figura 8. Modelo de piel artificial UGRSKIN.....	33
Figura 9. Estructura química y efecto de algunos de los compuestos bioactivos presentes en el aceite de oliva.....	40
Figura 10. Generación de los sustitutos de piel humana completos funcionalizados con los diferentes compuestos bioactivos.....	54
Figura 11. Forma de cultivo de los sustitutos de piel humana artificial.	54
Figura 12. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido maslínico (AM) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.....	59
Figura 13. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido maslínico (AM) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.....	60
Figura 14. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto fenólico (EF) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.....	63
Figura 15. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto fenólico (EF) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.....	64
Figura 16. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.	67

Figura 17. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.	68
Figura 18. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de oleuropeína (OLP) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.	71
Figura 19. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de oleuropeína (OLP) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas.....	72
Figura 20. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido maslínico (AM) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B).	75
Figura 21. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto fenólico (EF) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B).	78
Figura 22. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B).....	81
Figura 23. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de oleuropeína (OLP) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B).	84
Figura 24. Eficiencia de las condiciones experimentales seleccionadas en la optimización de los actuales métodos para el establecimiento de cultivos primarios de queratinocitos a partir de biopsias de piel humana.	94
Figura 25. Imágenes ilustrativas de colonias de cultivos primarios de queratinocitos correspondientes a 21 días de cultivo en cada grupo experimental.	94
Figura 26. Imágenes ilustrativas de cultivos primarios de queratinocitos humanos establecidos a partir de biopsias de piel sometidas a digestión enzimática.....	95
Figura 27. Sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas de cada condición y cada tiempo de evolución tras la tinción con hematoxilina-eosina.....	96

Figura 28. Espesor del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo. Los valores se muestran como micrómetros de espesor de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar.....	98
Figura 29. Número de estratos del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo. Los valores se muestran como número de estratos de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar.....	100
Figura 30. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de proliferación KI67 de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular.	102
Figura 31. Análisis de proliferación de las células del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinada mediante KI67.	103
Figura 32. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de proliferación PCNA de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular.	105
Figura 33. Análisis de proliferación de las células del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinada mediante PCNA.....	106
Figura 34. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de diferenciación AE1-AE3 de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular.....	108
Figura 35. Análisis de diferenciación epitelial en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinado mediante inmunohistoquímica para el marcador AE1-AE3.....	109
Figura 36. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de diferenciación involucrina de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular.	111
Figura 37. Análisis de diferenciación epitelial en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinado mediante inmunohistoquímica para el marcador involucrina.....	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de la expresión génica de queratinocitos humanos de piel cultivados en cada una de las condiciones experimentales: 5 µg/mL de ácido maslínico (AM5), 10 µg/mL de extracto fenólico (EF10) y 5 µg/mL de oleuropeína (OLP5).....	51
Tabla 2. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de ácido maslínico (AM) mediante la técnica LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	61
Tabla 3. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de ácido maslínico (AM) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	61
Tabla 4. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de extracto fenólico (EF) mediante la técnica de LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	65
Tabla 5. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de extracto fenólico (EF) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	65
Tabla 6. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) mediante la técnica de LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	69
Tabla 7. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	69
Tabla 8. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de oleuropeína (OLP) mediante la técnica de LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	73
Tabla 9. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de oleuropeína (OLP) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	73
Tabla 10. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de ácido maslínico (AM) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	76

Tabla 11. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de ácido maslínico (AM) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	76
Tabla 12. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de extracto fenólico (EF) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	79
Tabla 13. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de extracto fenólico (EF) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	79
Tabla 14. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	82
Tabla 15. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	82
Tabla 16. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de oleuropeína (OLP) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	85
Tabla 17. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de oleuropeína (OLP) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	85
Tabla 18. Análisis de expresión génica de queratinocitos humanos cultivados en ausencia de factores bioactivos (CTR) y en presencia de 5 µg/mL de ácido maslínico (AM5).....	88
Tabla 19. Análisis de expresión génica de queratinocitos humanos cultivados en ausencia de factores bioactivos (CTR) y en presencia de 10 µg/mL de extracto fenólico (EF10).	90
Tabla 20. Análisis de expresión génica de queratinocitos humanos cultivados en ausencia de factores bioactivos (CTR) y en presencia de 5 µg/mL de oleuropeína (OLP5).....	92

Tabla 21. Valores obtenidos para la cuantificación del espesor del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	99
Tabla 22. Valores obtenidos para la cuantificación del número de estratos del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	101
Tabla 23. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células positivas para el marcador de proliferación celular KI67 en el epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	104
Tabla 24. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células positivas para el marcador de proliferación celular PCNA en el epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.	107
Tabla 25. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de área de epitelio que mostraba señal positiva para el marcador de diferenciación epitelial AE1-AE3 en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	110
Tabla 26. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de área de epitelio que mostraba señal positiva para el marcador de diferenciación epitelial involucrina en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos.....	113

ABREVIACIONES

2D	Dos dimensiones
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AM	Ácido maslínico
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
BMP	Proteína morfogenética ósea
CK1	Citoqueratina 1
CK5	Citoqueratina 5
CK10	Citoqueratina 10
CK14	Citoqueratina 14
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAB	Diaminobencidina
DHFG	DL-3,4-dihidroxifenil glicol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Extracto fenólico
EGF	Factor de crecimiento epitelial
FC	<i>Fold-change</i>
FGF	Factores de crecimiento de fibroblastos
H-E	Hematoxilina-eosina
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HT	Hidroxitirosol
IL-17	Interleucina 17
IT	Ingeniería Tisular
MEC	Matriz extracelular
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa β</i>
OLP	Oleuropeína
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real

RESUMEN

RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano. Está en contacto con el medio exterior y cumple una importante función de protección frente a diversos agentes tanto físicos, químicos como biológicos. Las lesiones de la piel, especialmente las quemaduras graves, se presentan como una situación crítica para la vida de los pacientes, ya que se pierde la integridad de este órgano y se ve comprometida su función. El método de referencia para el tratamiento de estas afecciones es la utilización de autoinjertos de piel procedente de las zonas sanas del paciente. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones como son la escasez de zonas sanas en los pacientes grandes quemados y la alta morbilidad asociada. Por este motivo, se hace necesaria la búsqueda y la aplicación de nuevos métodos terapéuticos.

En este sentido, la Ingeniería Tisular aparece como una nueva herramienta en el campo de la Biomedicina que permite generar sustitutos artificiales de diferentes tejidos humanos, como es la piel. El proceso de biofabricación de piel artificial consiste en la utilización de los queratinocitos y los fibroblastos procedentes de una biopsia de piel sana del paciente en combinación con diferentes biomateriales. Aunque estos sustitutos de piel ya han sido utilizados en pacientes grandes quemados y han demostrado su utilidad clínica, existen algunos inconvenientes en su proceso de fabricación. Una de las grandes limitaciones es el lento crecimiento de los queratinocitos humanos en cultivo, lo que prolonga el tiempo de generación de la piel artificial y retrasa su implantación en pacientes críticos. Por este motivo, en la presente Tesis Doctoral se han probado varias moléculas bioactivas procedentes del aceite de oliva virgen que han demostrado tener un gran poder antioxidante y antiinflamatorio en diversos estudios previos. En concreto, se estudió el ácido maslínico, extracto fenólico, DL-3,4-dihidroxifenil glicol y oleuropeína con el objetivo de mejorar los protocolos de cultivo de los queratinocitos para la optimización del proceso de biofabricación de la piel artificial mediante Ingeniería Tisular.

En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se evaluó, en primer lugar, el efecto de un amplio rango de concentraciones (1-80 $\mu\text{g/mL}$) de cada uno de los compuestos bioactivos sobre cultivos de queratinocitos humanos de piel inmortalizados a las 24, 48 y 72 horas de incubación. En cada uno de estos tiempos, se realizaron ensayos de viabilidad y de proliferación celular que permitieron determinar, para cada uno de los compuestos, la concentración óptima. Los resultados mostraron que 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g/mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g/mL}$ de oleuropeína eran las concentraciones capaces de inducir un efecto pro-proliferativo sobre las células sin

causar efectos citotóxicos en ellas. Estos compuestos, a las concentraciones establecidas, fueron elegidos para realizar el resto de ensayos de la presente Tesis Doctoral. Por el contrario, el DL-3,4-dihidroxifenil glicol no se empleó en los siguientes estudios, debido a que no consiguió producir efectos significativos sobre los cultivos. A continuación, se realizó un análisis de expresión génica en los queratinocitos cultivados con las concentraciones elegidas de ácido maslínico, extracto fenólico y oleuropeína. Estos análisis revelaron que los genes relacionados con la proliferación celular *MKI67* y *PCNA* se encontraban sobreexpresados cuando se utilizaban estos compuestos bioactivos en los cultivos con respecto a aquellos en los que no se adicionaron dichos compuestos.

Una vez comprobado el efecto proliferativo de los compuestos bioactivos sobre los queratinocitos humanos inmortalizados, se evaluaron estas condiciones sobre queratinocitos humanos de piel normales obtenidos de biopsias de pacientes, ya que son estas células las que se utilizan en el proceso de generación de la piel artificial mediante Ingeniería Tisular. Con tal fin, se establecieron cultivos primarios de queratinocitos humanos y se cultivaron en presencia de 5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína durante 21 días, realizándose un conteo del número de colonias en cada una de las condiciones a la finalización del estudio. El ácido maslínico y el extracto fenólico fueron los únicos compuestos capaces de aumentar de forma significativa el número de colonias con respecto al grupo control.

Finalmente, se generaron sustitutos de piel artificial combinando fibrina y agarosa, como biomaterial, y células de la piel humana (fibroblastos y queratinocitos). Estos constructos se funcionalizaron con 5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico, 5 µg/mL de oleuropeína y una mezcla de todas las moléculas bioactivas a las concentraciones elegidas, y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas y 4, 8 y 12 días. En cada uno de estos tiempos se evaluó el desarrollo de la epidermis, así como también su proliferación y diferenciación mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas empleando varios marcadores. A rasgos generales, se observó que 10 µg/mL de extracto fenólico era capaz de aumentar de forma significativa el espesor y el número de estratos epiteliales formados en los constructos de piel artificial. Asimismo, los resultados revelaron un incremento en la diferenciación del epitelio en presencia de esta biomolécula a tiempos largos.

En conclusión, la presente Tesis Doctoral demuestra, por un lado, que los compuestos bioactivos utilizados son seguros para los queratinocitos, ya que no producen en ellas efectos deletéreos. Por otro lado, todos los compuestos, excepto el DL-3,4-dihidroxifenil

glicol, son capaces de inducir la proliferación de forma significativa en los tiempos estudiados con respecto a células sin tratar. Además, los resultados demuestran que estos mismos efectos se mantienen cuando los compuestos bioactivos se añaden sobre cultivos primarios de queratinocitos humanos normales. Por último, la funcionalización de los sustitutos de piel artificial con el extracto fenólico permitió su mejora en términos de proliferación y diferenciación del epitelio. Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores recogidos en la presente Tesis Doctoral, se hace necesaria la realización de estudios futuros para determinar su posible traslación clínica.

INTRODUCCIÓN

La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Su función principal es la formación de una barrera protectora entre el organismo y el exterior que evite la pérdida de agua y electrolitos, regule la temperatura corporal y evite el ataque de diversos agentes físicos, químicos y biológicos (Proksch et al., 2008). En la piel también encontramos diversos anexos que juegan un papel fundamental, tales como los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas (Veltri et al., 2018). Dependiendo de la parte concreta del cuerpo a la que se haga referencia, la piel tendrá diferente textura, color y grosor. La piel situada en el párpado es delgada, delicada y contiene pelos finos. Por el contrario, la situada en la ceja es más gruesa, al igual que el pelo que encontramos en esta zona (Arda et al., 2014).

La piel está compuesta por tres capas diferenciadas denominadas **epidermis**, **dermis** e **hipodermis** (Kanitakis, 2002) (Figura 1). La epidermis es la capa más externa de la piel y es la principal responsable de la función protectora de este órgano (Fuchs & Raghavan, 2002). Subyacente a la epidermis, se encuentra la dermis, que alberga diferentes estructuras como los vasos sanguíneos, que aportan los nutrientes necesarios a las células epiteliales, y las terminaciones nerviosas. La dermis es la principal responsable de las propiedades mecánicas de la piel, tales como la resistencia y la flexibilidad (Thulabandu et al., 2018). Debajo de la dermis, se localiza la hipodermis, un tejido adiposo que proporciona aislamiento térmico y conforma una reserva energética (Veltri et al., 2018).

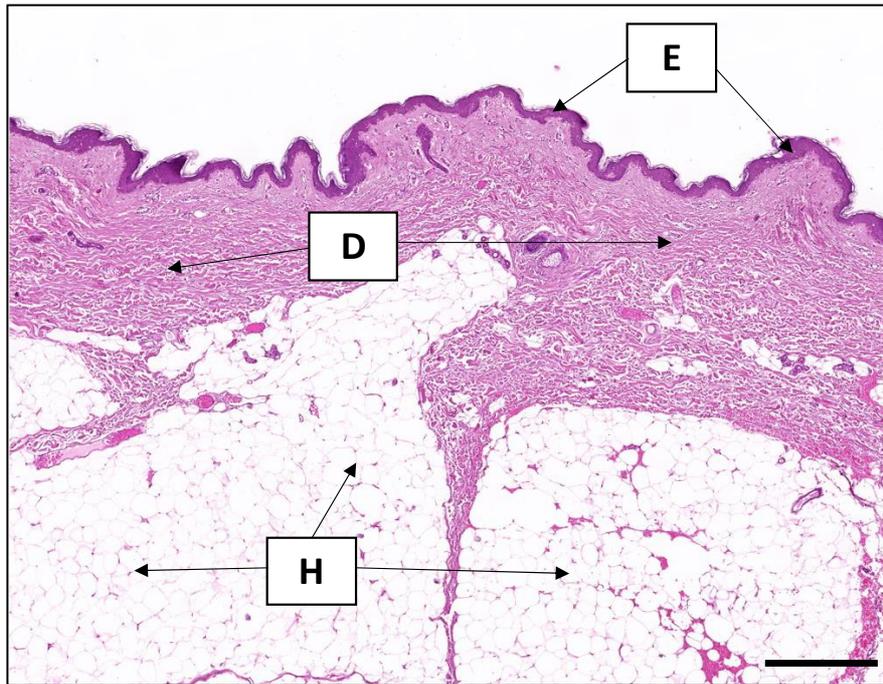


Figura 1. Capas presentes en la piel humana. Corte histológico de piel humana teñido con hematoxilina-eosina donde se puede observar la epidermis (E) en la parte superior, la dermis (D) subyacente, y la hipodermis (H), que se corresponde con la capa más profunda de la piel. Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 500 μ m.

Origen embrionario y formación de la piel

Durante el desarrollo embrionario, la **epidermis** se forma a partir de una capa denominada neuroectodermo, influenciada bajo la acción de las proteínas Wnt (*wingless*). Estas moléculas bloquean la respuesta del neuroectodermo a los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). En estas condiciones, las células pueden sintetizar proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que darán lugar a que esta capa forme la epidermis, y no el sistema nervioso (Fuchs, 2007). La epidermis resultante es una capa compuesta por células epiteliales que aún conservan gran potencial diferenciativo y protegida frente al contacto continuo del líquido amniótico por una capa de células llamada peridermo. El peridermo es una capa transitoria que se elimina una vez que las células epiteliales se estratifican y se diferencian (M'Boneko & Merker, 1988).

A continuación, entre el peridermo y la capa basal de células epiteliales, se forma una capa designada con el nombre de capa intermedia. Esta capa se forma gracias a la división asimétrica que experimentan las células de la capa basal (Lechler & Fuchs, 2005). Las células de la capa intermedia comienzan a proliferar y, después, maduran para formar las células que constituirán el estrato espinoso de la epidermis.

Posteriormente, estas células siguen diferenciándose hasta formar las células del estrato granuloso y del estrato córneo (Koster & Roop, 2007). De esta manera, la epidermis, en su estado definitivo, consta de una capa de células con capacidad de proliferación, la capa basal, y una serie de capas superiores compuestas por células diferenciadas.

Con respecto a la **dermis**, dependiendo de la zona corporal en la que se localice, tendrá diferente origen embrionario. La dermis ubicada en la cabeza y en el cuello procede de la cresta neural. En cambio, la dermis de las extremidades y de la pared corporal se origina a partir del mesodermo lateral. La dermis de la espalda se genera a partir del mesodermo paraxial (Vapniarsky et al., 2015). En una primera etapa, la dermis está compuesta por multitud de células mesenquimales muy próximas entre sí en las que el componente fibrilar de la matriz extracelular es escaso. Posteriormente, comienza a depositarse mayor cantidad de colágeno, que formará fibras, y las células comienzan a separarse y a adquirir una morfología parecida a la de los fibroblastos, el tipo celular mayoritario en la dermis madura. Además, cabe destacar que comienza a distinguirse la dermis papilar de la reticular, siendo visibles en mayor cantidad las células, los vasos sanguíneos y los nervios en la primera. También empieza a distinguirse el tejido subyacente a la dermis. Hacia el final de la gestación, aparecerá la dermis definitiva en la que también se encontrarán los anexos cutáneos (Johnson & Holbrook, 1989; Smith & Holbrook, 1986).

Histología de la piel

Histológicamente, la **epidermis** es un tejido epitelial plano, estratificado y queratinizado que, como la práctica totalidad de los epitelios, es avascular (Bragulla & Homberger, 2009). El tipo principal de células que conforman este tejido son los queratinocitos (Figura 2). En menor proporción, se encuentran otros tipos celulares con diferentes funciones, incluyendo, entre otras, los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans (Yousef et al., 2023).

- **Queratinocitos:** Se originan en el estrato basal de la epidermis y van ascendiendo hasta alcanzar la superficie y desprenderse, al mismo tiempo que su grado de diferenciación va aumentando. El nombre de este tipo celular se debe a que en su interior acumulan abundantes citoqueratinas específicas de este tipo celular, que no existen en las otras células de la epidermis (Roop, 1995).
- **Melanocitos:** Es el segundo tipo celular más abundante en la epidermis. Su función principal es la producción de melanina, un pigmento que protege a las

células frente a daños en el ADN causados por la radiación ultravioleta. Se encuentran dispersos en el estrato basal (Tsatmali et al., 2002).

- **Células de Merkel:** Son células que participan en la percepción sensorial y se encuentran, de igual forma, dispersas por el estrato basal (Moll et al., 2005).
- **Células de Langerhans:** Son células dendríticas presentadoras de antígenos, y su función y morfología son parcialmente similares a las de los macrófagos (Sparber, 2014).

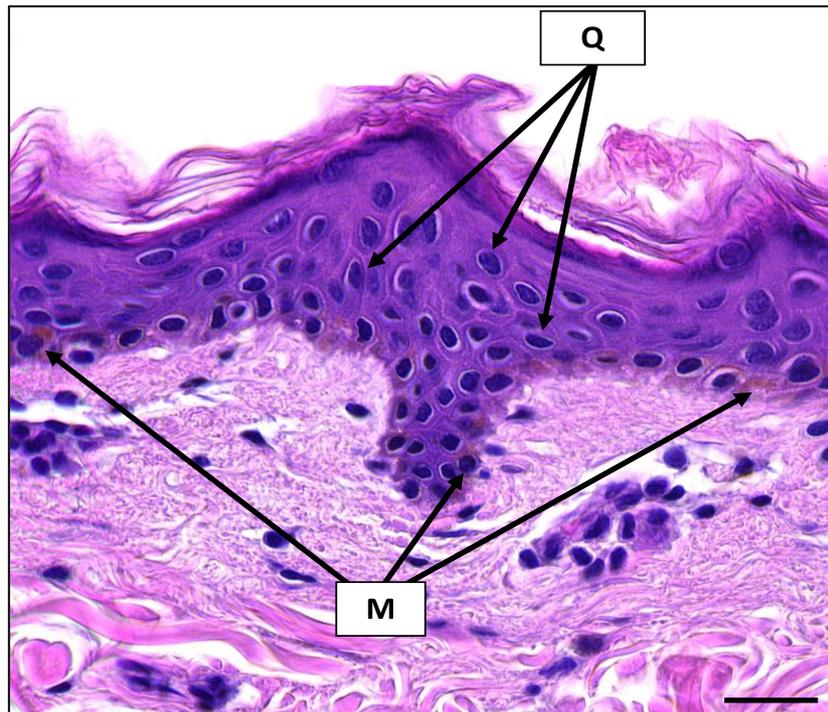


Figura 2. Queratinocitos (Q) presentes en la epidermis de la piel humana. Corte histológico de piel humana teñido con hematoxilina-eosina. Los queratinocitos son las células mayoritarias en esta capa, y reciben gránulos de melanina (M) fabricados por los melanocitos. Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 20 μm .

La epidermis se divide en cuatro estratos bien diferenciados (Figura 3). En primer lugar, el estrato más profundo se denomina **estrato basal**, constituido por una única capa de queratinocitos con forma cúbica o cilíndrica y con un gran núcleo. Están unidos a la membrana basal, que separa la epidermis de la dermis, a través de hemidesmosomas, y unidos entre sí y con las células del estrato espinoso mediante desmosomas. Estos queratinocitos se caracterizan por ser las únicas células que conservan la capacidad proliferativa en la epidermis, de tal forma que, cuando se dividen de manera asimétrica, generan una nueva célula madre con actividad mitótica que permanece en el estrato basal y una célula que se diferencia y migra hacia los estratos superiores. A este nivel,

los queratinocitos expresan grandes cantidades de citoqueratinas 5 (CK5) y 14 (CK14). En el estrato basal se localizan, además, los melanocitos y las células de Merkel. Por encima del estrato basal, se localiza el **estrato espinoso**. Los queratinocitos en este estrato presentan una morfología más poliédrica, que va cambiando hacia una más plana conforme van ascendiendo hacia la superficie, y presentan abundantes prolongaciones, denominadas espinas, que los unen a otros queratinocitos vecinos mediante uniones intercelulares. También cambia la presencia de citoqueratinas, pasando de producir CK5 y CK14 a citoqueratinas 1 (CK1) y 10 (CK10). Asimismo, los queratinocitos espinosos comienzan a producir involucrina y loricrina, que ayudan al proceso de cornificación. A continuación del estrato espinoso, se encuentra el **estrato granuloso**. Este estrato está constituido por células aplanadas que contienen en su interior abundantes gránulos de queratohialina y cuerpos laminares, los cuales son gránulos lipídicos que se liberan parcialmente al espacio intercelular, contribuyendo a impermeabilizar la piel. Finalmente, en la parte más superficial de la piel, se sitúa el **estrato córneo**, en el cual todas las células que lo componen tienen su citoplasma ocupado por abundantes filamentos de queratina y han perdido el núcleo y las organelas, convirtiéndose en células con forma de escama. Estas células, también denominadas corneocitos, se eliminan continuamente de la piel y son renovadas en un ciclo que dura aproximadamente 47 días (Fuchs, 2016; Ross & Wojciech, 2016).

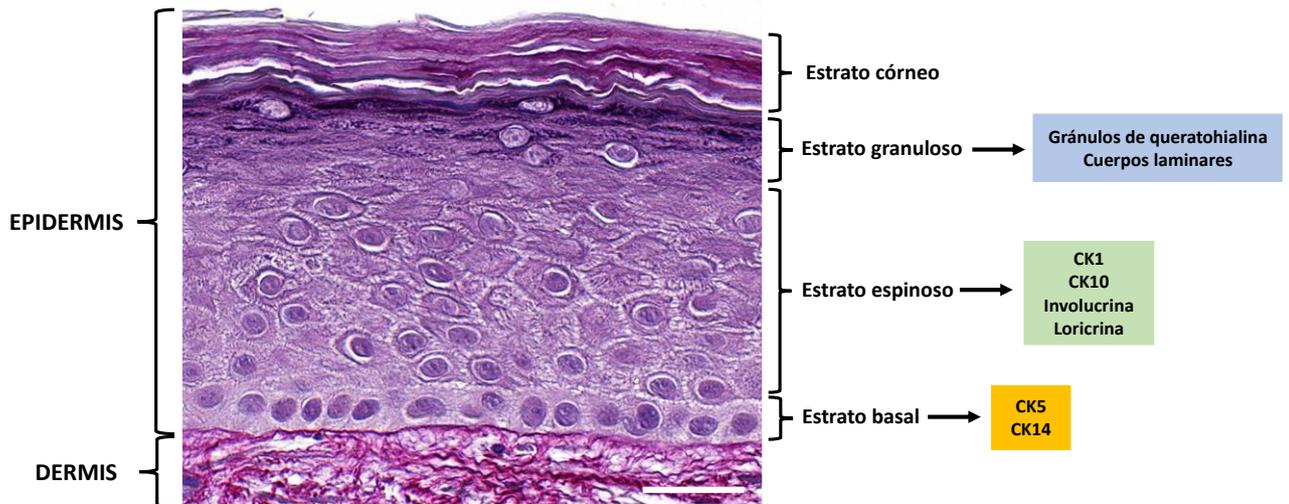


Figura 3. Estratos que componen la epidermis de la piel humana y producción de componentes específicos en cada uno de ellos. Corte histológico de piel humana teñido con la tinción rojo picrosirius. Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 20 μ m.

Estos cuatro estratos son los que se encuentran en la denominada **piel fina**, que es la predominante en el cuerpo humano. En cambio, en la palma de las manos y en la planta de los pies, se halla otro tipo de piel con mayor capacidad para resistir las presiones y las fricciones denominada **piel gruesa**. Se caracteriza por su mayor grosor en comparación con la piel fina, la ausencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas, y el mayor número de glándulas sudoríparas (Arda et al., 2014; Vela-Romera et al., 2019). A nivel histológico, se observa en esta piel gruesa otro estrato llamado **estrato lúcido**, localizado entre el estrato granuloso y el estrato córneo. Está formado por células aplanadas en las que prácticamente la totalidad ha perdido el núcleo y las organelas, y van llenándose de queratina, constituyendo un tipo celular intermedio entre los queratinocitos del estrato granuloso y los del estrato córneo (Ross & Wojciech, 2016).

Bajo la epidermis, se encuentra la **dermis**, un tejido conjuntivo con abundantes vasos sanguíneos, nervios, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, y diferentes mecanorreceptores. Existen diversos tipos celulares en la dermis, siendo los más abundantes los fibroblastos, existiendo, asimismo, una población celular extrínseca abundante en células del sistema inmunitario como los macrófagos. Los fibroblastos se encargan de la producción y renovación de la matriz extracelular, mientras que los macrófagos ejercen una función defensiva. A nivel estructural, la dermis se divide en dos capas principales: la **dermis papilar** y la **dermis reticular** (Figura 4). La dermis

papilar es una fina capa de tejido conjuntivo laxo que se encuentra subyacente a la epidermis. Está formada por células dispersas en una matriz que contiene fundamentalmente colágeno tipo I y III, fibras elásticas y gran cantidad de capilares sanguíneos que aportan los nutrientes necesarios a las células epiteliales de la epidermis suprayacente. La dermis reticular se localiza por debajo de la dermis papilar, en contacto con la hipodermis. Esta capa es un tejido conjuntivo denso formado principalmente por colágeno tipo I y fibras elásticas (Nourian Dehkordi et al., 2019; Ross & Wojciech, 2016). Además de las células y las fibras ya mencionadas, ambos tipos de dermis presentan una abundante matriz extracelular rica en estructuras fibrilares y no fibrilares, tales como los proteoglicanos y glicoproteínas, así como la sustancia fundamental amorfa, entre otros componentes.

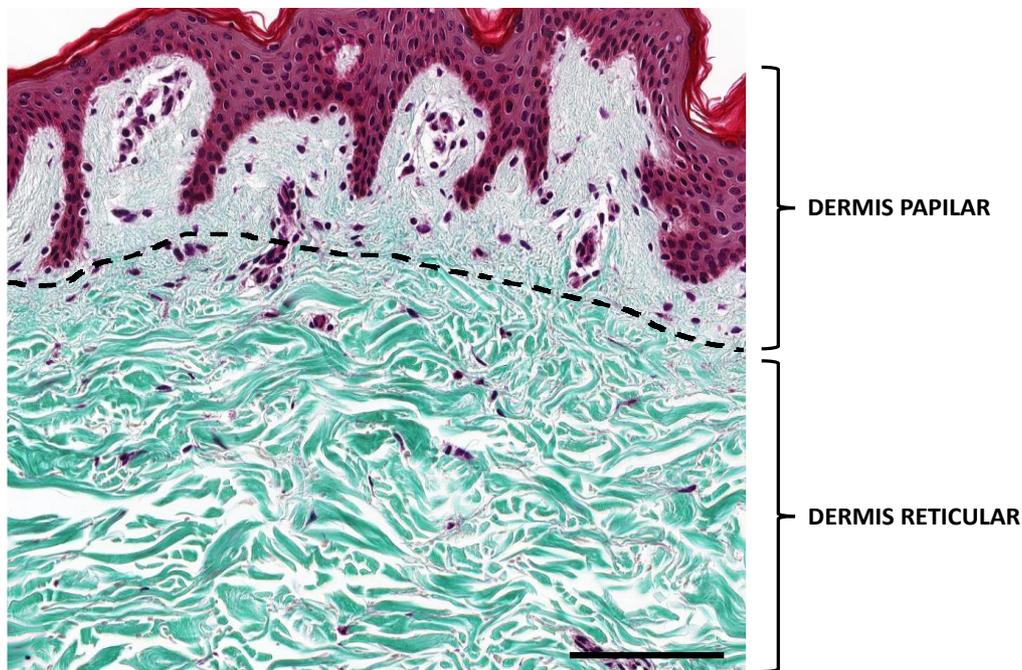


Figura 4. Dermis papilar y dermis reticular en la piel humana. Corte histológico de piel humana teñido con la tinción tricrómica de Masson, en donde puede apreciarse un tejido conjuntivo laxo debajo de la epidermis que se corresponde con la dermis papilar y, a continuación, un tejido conjuntivo denso que se corresponde con la dermis reticular, ya en contacto con la hipodermis. Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 100 µm.

En la zona en la que contacta la epidermis con la dermis se sitúa la **membrana basal**, sintetizada por las células epiteliales de la epidermis y por los fibroblastos de la dermis, en un proceso conocido como interacción dermoepidérmica (Figura 5). Sus componentes principales son la laminina y el colágeno tipo IV, existiendo, además, gran

cantidad de moléculas fundamentales para la correcta adhesión dermoepidérmica. La lámina basal permite la firme unión de la epidermis con la dermis, así como la comunicación entre ambos tejidos y la correcta fisiología de la epidermis (Nyström & Bruckner-Tuderman, 2019). Una importante característica de la membrana basal, y de la unión dermoepidérmica en general, es la presencia de **crestas epidérmicas** y **papilas dérmicas** (Figura 6). Las crestas epidérmicas son evaginaciones de la epidermis hacia la dermis, mientras que las papilas dérmicas son invaginaciones de la dermis, que se producen entre las crestas (Ross & Wojciech, 2016). La presencia de estas estructuras es muy importante para aumentar la superficie de unión entre dermis y epidermis.

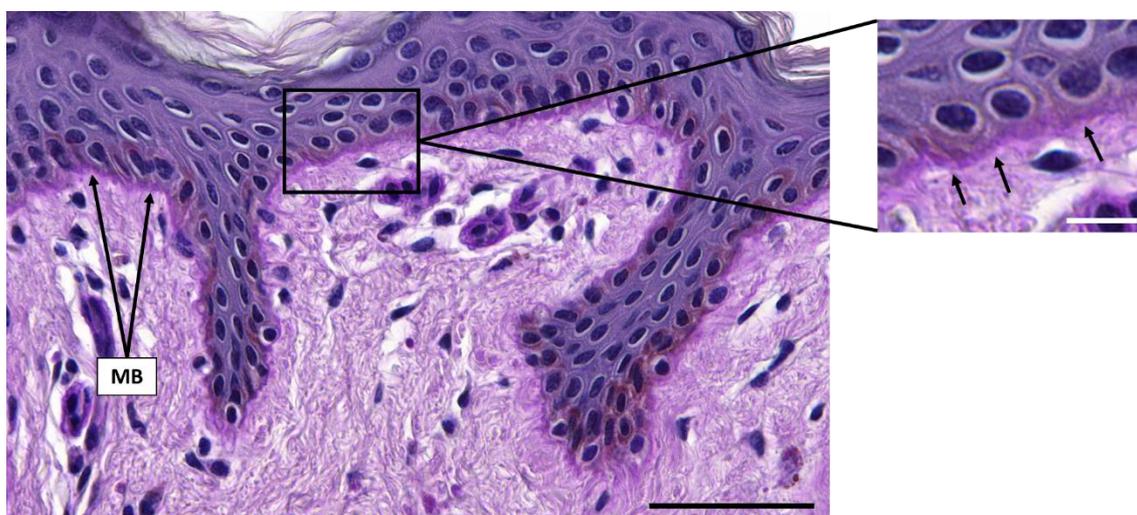


Figura 5. Membrana basal (MB) presente en la unión dermoepidérmica de la piel humana. Corte histológico de piel humana teñido con ácido peryódico de Schiff (tinción PAS). Las flechas señalan la membrana basal, que se hace visible al microscopio óptico por el uso de la tinción PAS. Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 50 y 10 μm , respectivamente.

A continuación de la dermis reticular, se localiza la **hipodermis**. Ésta es también un tejido conjuntivo, pero más laxo que la dermis. No existe una clara delimitación entre la dermis y la hipodermis, a diferencia de la clara transición epidermis-dermis. Frecuentemente, en la hipodermis aparece tejido adiposo que contribuye a las funciones principales de esta capa, por lo que a la hipodermis, en ocasiones se la llama también tejido celular subcutáneo (Ross & Wojciech, 2016).

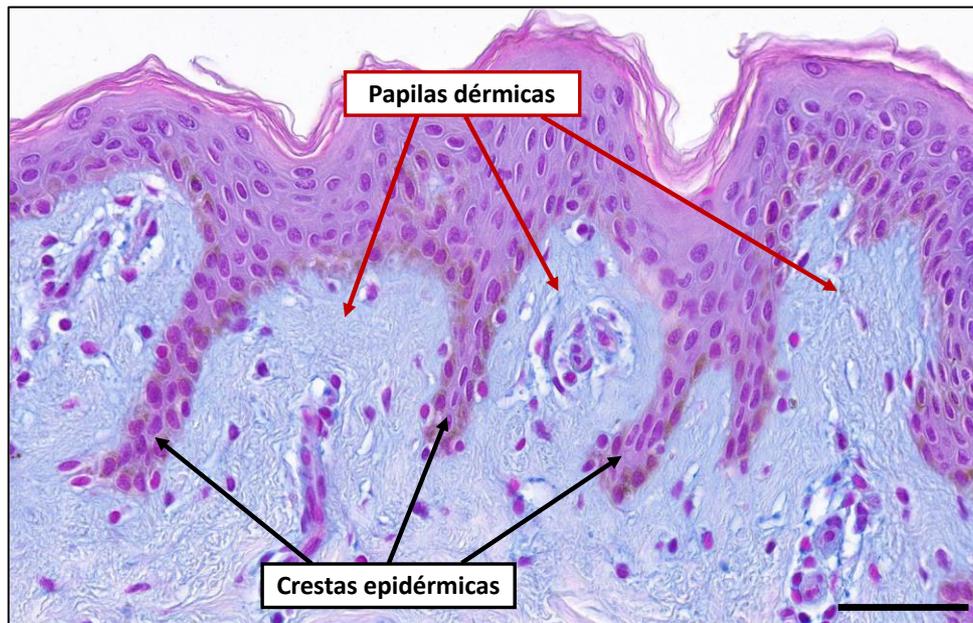


Figura 6. Crestas epidérmicas y papilas dérmicas presentes en la piel humana. Corte histológico de piel humana teñido con la tinción de azul alcian. Nótese la epidermis que se prolonga hacia la dermis, dando lugar a las crestas epidérmicas. Entre las crestas, la dermis forma las papilas dérmicas, que se interdigitan con las crestas epidérmicas. Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 50 μ m.

Ingeniería Tisular

Aunque este término fue acuñado previamente, el concepto de “**Ingeniería Tisular**” (IT) se desarrolló de manera exponencial a partir de la definición publicada en 1993 por Robert Langer y Joseph P. Vacanti, los cuales lo describieron como “un campo interdisciplinario en el cual se aplican los conceptos de la ingeniería y de las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos” (Langer & Vacanti, 1993).

La IT se construye alrededor de tres pilares fundamentales: las **células**, que llevan a cabo las funciones de los tejidos, los **biomateriales**, que proporcionan el entorno adecuado para el asentamiento y el crecimiento de las células, y las **moléculas de señalización**, factores de crecimiento o factores de diferenciación, que contribuyen a la fisiología celular y tisular (Berthiaume et al., 2011) (Figura 7).

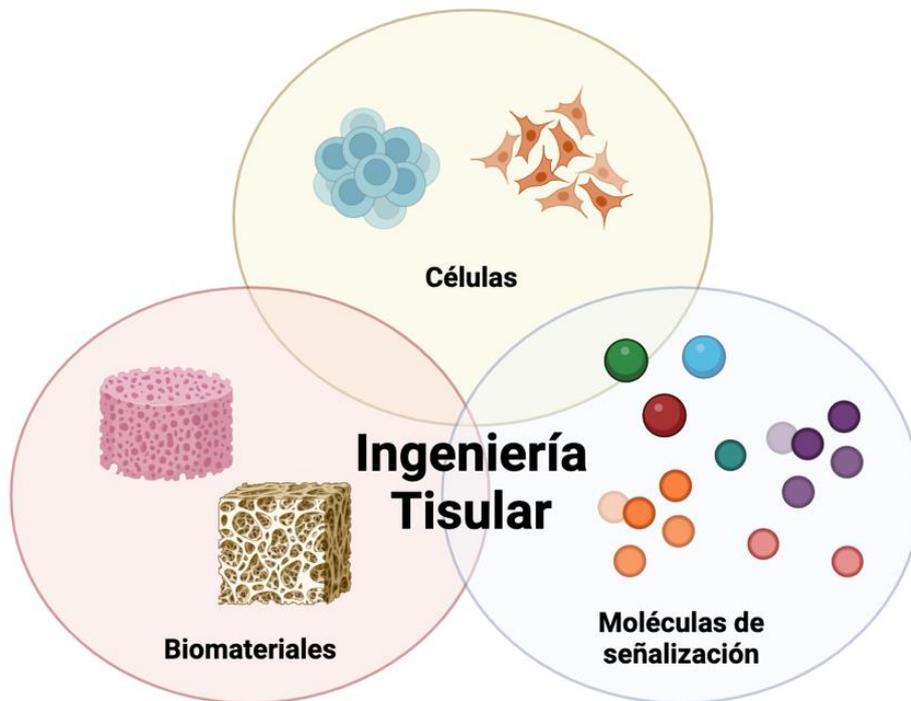


Figura 7. Pilares fundamentales de la Ingeniería Tisular. Creado con Biorender.com.

Diversos sustitutos de tejidos y órganos han sido fabricados mediante técnicas de IT a lo largo de los años, incluyendo la piel humana, objeto de la presente Tesis Doctoral, siendo ésta uno de los primeros órganos generados mediante IT y posteriormente trasladados a la clínica (Vig et al., 2017).

Ingeniería Tisular de la piel

Las lesiones de la piel, como son las quemaduras graves, pueden comprometer la función de este órgano y afectar considerablemente a su estructura. En concreto, las quemaduras que se extienden hasta la dermis o hacia capas más profundas de la piel y que tienen más de 1 cm de diámetro, tienen grandes dificultades para regenerarse por sí solas, y pueden poner en grave peligro la vida del paciente (Shevchenko et al., 2010). En estos casos, la técnica de referencia que se aplica es la utilización de un autoinjerto de piel obtenido de las zonas sanas de piel del propio paciente (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Sin embargo, una gran limitación de esta técnica es la falta de zonas no afectadas en los pacientes grandes quemados, así como la gran morbilidad asociada a la zona donante (Kamel et al., 2013; MacNeil, 2007). Por este motivo, se hace necesaria la búsqueda de alternativas basadas en protocolos de IT.

Para la generación de sustitutos de la piel humana por IT, se han empleado multitud de métodos, basados en diferentes tipos de células, biomateriales y factores de crecimiento. Uno de los modelos de piel artificial que ha mostrado utilidad potencial y ha sido transferido a la clínica es el modelo UGRSKIN, desarrollado en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada (Carriel et al., 2012a) (Figura 8). Este modelo de piel artificial se genera a partir de queratinocitos y fibroblastos aislados y cultivados a partir de biopsias de piel autólogas, combinados con un biomaterial de fibrina-agarosa, asimismo, desarrollado en el mismo Departamento (Alaminos et al., 2006). Este nuevo sustituto de la piel humana demostró ser biocompatible *ex vivo* e *in vivo* (en animales de experimentación) (Carriel et al., 2012a; Martin-Piedra et al., 2023), presentar adecuadas propiedades biomecánicas (Ionescu et al., 2020) y ópticas (Ruiz-López et al., 2022), siendo capaz de reproducir biomiméticamente la estructura de la piel humana nativa, a excepción de los anexos cutáneos y las crestas y papilas de la unión dermoepidérmica (Martin-Piedra et al., 2023). Por ello, el modelo UGRSKIN fue aprobado para uso clínico por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), y su aplicación a pacientes grandes quemados ha mostrado buenos resultados clínicos e histológicos (Egea-Guerrero et al., 2019; Martin-Piedra et al., 2023). A pesar de los buenos resultados obtenidos con el modelo UGRSKIN, una de las limitaciones de esta piel artificial es el tiempo requerido para generar una superficie de tejido artificial suficiente para cubrir la zona afectada en pacientes grandes quemados (Zhang et al., 2021a). El hecho de que en todo momento se utilizan células normales, junto con la limitada capacidad de proliferación de las células epiteliales humanas (Kraft et al., 2012), hace que, normalmente, la piel artificial requiera en torno a 28-30 días para estar disponible para el tratamiento de los pacientes grandes quemados. Para superar esta limitación del modelo UGRSKIN, es necesario desarrollar nuevos métodos y técnicas de cultivo celular capaces de incrementar de forma significativa la capacidad de proliferación de los queratinocitos de la epidermis, sin afectar a su estructura o su función. La obtención de cultivos de queratinocitos en un tiempo reducido podría contribuir a un tratamiento precoz de los grandes quemados y, por tanto, a aumentar su supervivencia. A este respecto, una de las posibles alternativas capaces de optimizar la generación de cultivos de células humanas es la utilización de diferentes tipos de compuestos bioactivos, como se describe en el siguiente apartado. Sin embargo, aún no se han desarrollado métodos eficaces a la hora de mejorar la generación de cultivos de queratinocitos de la epidermis humana para su uso en protocolos de IT.

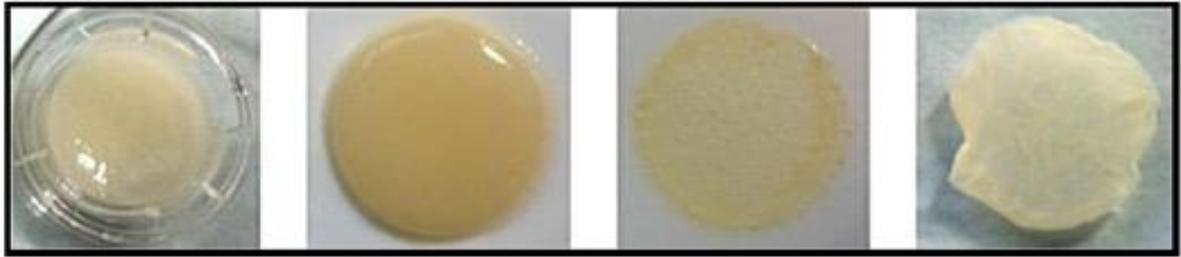


Figura 8. Modelo de piel artificial UGRSKIN. Imágenes originales del Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

Compuestos bioactivos empleados para la mejora de la proliferación celular

El potencial de numerosas moléculas de origen natural y sintético para mejorar el crecimiento celular ha sido ampliamente estudiado a lo largo de las últimas décadas. Hou *et al.* (Hou et al., 2013) descubrieron que el uso de lantánidos sobre las células 3T3-L1 provocaba la transición de estas células hacia un estado pro-proliferativo. En otro estudio, la presencia de un derivado del ácido salicílico estimulaba el crecimiento de células del sistema inmune en cultivo (Puttaswamy et al., 2016).

Con respecto a moléculas aisladas de fuentes naturales, Gan *et al.* (Gan et al., 2020) demostraron que las xantonas obtenidas a partir del hongo *Stachybotrys chartarum* eran capaces de aumentar la proliferación de las células β del páncreas en peces cebrá. Por otro lado, nuevas moléculas bioactivas aisladas de la planta *Stemona tuberosa* son capaces de inducir el crecimiento de la línea celular de fibroblastos NIH3T3 (Kil et al., 2015). Otra molécula natural obtenida del látex del género de plantas *Euphorbia*, denominada ELAC, estimula el crecimiento de células madre neurales adultas *in vitro* (Murillo-Carretero et al., 2017). Otro estudio reveló que el mucus liberado por el molusco *Phyllocaulis boraceiensis* aplicado en cultivos celulares de fibroblastos de piel a bajas

concentraciones inducían la proliferación y también la deposición de componentes de la matriz extracelular (MEC) (Toledo-Piza et al., 2013). Un aumento de la proliferación también fue detectado cuando se añadió sobre cultivos de células madre embrionarias un extracto de ginseng. Del mismo modo, se detectó un incremento del crecimiento celular en células madre cardíacas al utilizar un extracto fenólico obtenido de la bergamota (Carresi et al., 2021). Otros productos naturales como el *Aloe vera* o la *Calendula officinalis* también estimulan el crecimiento de células como los fibroblastos en procesos de cicatrización de heridas (Pereira & Bártolo, 2016).

El aceite de oliva, como se detalla en el siguiente apartado, también ha resultado de gran utilidad en este campo, ya que algunos de sus compuestos han sido empleados para inducir la proliferación celular. Un estudio demostró que moléculas como el hidroxitirosol (HT), la luteolina o el ácido cumárico, entre otras, inducían un estado de proliferación en osteoblastos humanos (García-Martínez et al., 2016). Del mismo modo, la proliferación de fibroblastos humanos en cultivo en presencia de HT, tirosol y oleocantal también conducía a un aumento de la proliferación (Batarfi et al., 2023; González-Acedo et al., 2023).

En gran variedad de artículos recogidos en la literatura también se demuestra el efecto de algunas moléculas naturales sobre la proliferación de queratinocitos. Xie *et al.* probaron un derivado de la quitina sobre cultivos de la línea celular HaCaT observándose que este compuesto era capaz de aumentar el crecimiento de estos queratinocitos cuando se administraba a bajas concentraciones. Sin embargo, cabe destacar que son los metabolitos secundarios de las plantas los que más han sido utilizados para este fin por los abundantes efectos beneficiosos que ejercen. Se han probado moléculas como los triterpenos, el ácido géntísico, isómeros del ácido retinoico, curcumenol y extractos de diversas plantas como *Emblica officinalis*, *Boesenbergia rotunda* y *Chrysanthemum boreale*, entre otros. En todos los casos se observó un efecto positivo en la proliferación de los queratinocitos (Agra et al., 2015; D. Y. Kim et al., 2015; M. Kim et al., 2020; Kwon et al., 2021; Ruttanapattanakul et al., 2021, 2021; Schroeder & Zouboulis, 2007; Yamakami et al., 2019). Sin embargo, existen pocas evidencias científicas sobre el uso de moléculas derivadas del aceite de oliva con tal fin. Abate *et al.* demostraron que el HT a bajas concentraciones promovía el crecimiento de los queratinocitos (Abate et al., 2021). Benincasa *et al.* obtuvieron el mismo efecto cuando se cultivaron queratinocitos en presencia de un derivado del HT (Benincasa et al., 2021).

Aceite de oliva

El aceite de oliva virgen es un producto natural obtenido de la aceituna, fruto del olivo (*Olea europaea*), a partir de su trituración y posterior prensado (Gorzynik-Debicka et al., 2018). Es considerado como el aceite comestible de mayor valor existente en el mercado (Parisio et al., 2020). España es uno de los grandes productores de aceite de oliva y uno de los países en los que más se consume (Tomé-Carneiro et al., 2020).

Composición del aceite de oliva

El aceite de oliva está compuesto principalmente por dos fracciones: la fracción mayoritaria, conocida como **fracción saponificable**, y la fracción minoritaria que incluye la **fracción no saponificable** y los **compuestos hidrofílicos** (Gorzynik-Debicka et al., 2018; Yubero-Serrano et al., 2019).

La **fracción saponificable** constituye alrededor del 98% del total del aceite. En este grupo se encuentran los triglicéridos, principalmente los que están compuestos por ácidos grasos monoinsaturados (80%), como el ácido oleico. Estas moléculas son las responsables de las propiedades fisicoquímicas del aceite (Lozano-Castellón et al., 2022). Además, el hecho de que estos ácidos grasos tengan un único doble enlace en la cadena hace que el aceite de oliva virgen sea más resistente a la oxidación, más estable y se pueda conservar durante tiempos más prolongados en comparación con los aceites que contienen mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Owen et al., 2000). En esta fracción también se encuentran triglicéridos formados por ácidos grasos saturados y poliinsaturados, pero en menor proporción (11% y 9%, respectivamente) (Carranco et al., 2018), siendo los mayoritarios el ácido palmítico y el ácido linoleico (Aparicio-Soto et al., 2016).

La **fracción no saponificable** y los **compuestos hidrofílicos** constituyen entre el 1-2% del total del aceite. La cantidad de estas fracciones minoritarias varía entre aceites en función del cultivo, del clima, del grado de madurez de las aceitunas cuando son recogidas y de los procesos que se utilicen para obtener dicho aceite (Covas et al., 2015; Jimenez-Lopez et al., 2020). Algunos compuestos que forman parte de este grupo son los esteroides, escualenos, pigmentos y triterpenos, entre otros (Ghanbari et al., 2012). Los triterpenos son un conjunto de moléculas que se encuentran altamente representadas en el reino vegetal. Químicamente son derivados del isopreno y se conoce que participan en diferentes procesos biológicos, de los cuales se pueden destacar la migración y proliferación celular, la producción y liberación de colágeno y su

actividad antiinflamatoria. Además, ayudan en el proceso de regeneración tisular reduciendo el tiempo de cicatrización (Agra et al., 2015; Lin et al., 2017). A este grupo de moléculas pertenece el **ácido maslínico (AM)**. La fracción no saponificable puede extraerse usando disolventes tras la saponificación del aceite. Por otra parte, dentro de los compuestos hidrofílicos, se engloban los **compuestos fenólicos** como **HT**, **oleuropeína (OLP)**, **DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG)**, oleocantal, luteolina, etc. (Pérez et al., 2014) y se obtienen normalmente por extracción empleando una mezcla de metanol/agua. El contenido de estos compuestos fenólicos se considera un parámetro para determinar la calidad del aceite de oliva (Aparicio-Soto et al., 2016). Cabe destacar que las moléculas que forman parte de estos dos grupos se caracterizan por su gran importancia, ya que confieren al aceite múltiples propiedades beneficiosas para la salud como el poder antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno o antimicrobiano (Musumeci et al., 2013; Rigacci & Stefani, 2016; Yubero-Serrano et al., 2019). Debido a que son compuestos con importantes acciones biológicas se les ha denominado compuestos bioactivos. Solo el aceite de oliva virgen es capaz de mantener inalterada esta fracción de compuestos minoritarios (Moral & Escrich, 2022).

Propiedades del aceite de oliva

El aceite de oliva es la base de la dieta mediterránea, una dieta compuesta por alimentos que se consumen de forma habitual en las regiones mediterráneas, como son Grecia, España e Italia. Se ha comprobado que la incorporación de esta dieta en el estilo de vida prolonga la esperanza de vida de las personas y reduce el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares y otras patologías que se desarrollan con la edad (Mirabelli et al., 2020). Entre todos los alimentos que componen la dieta mediterránea, el aceite de oliva es la principal fuente de grasa y se considera como un alimento fundamental e imprescindible en ésta (De Santis et al., 2019). El consumo de aceite de oliva virgen extra (AOVE) proporciona múltiples beneficios sobre la salud y previene la aparición de diferentes enfermedades debido principalmente a la presencia de moléculas con gran actividad biológica. Por ello es considerado como un alimento funcional (Gantenbein & Kanaka-Gantenbein, 2021). Existen estudios en los que se ha demostrado que la ingesta de aceite de oliva reduce el riesgo de sufrir un ictus, enfermedades coronarias, diabetes y cáncer, entre otras patologías (Finicelli et al., 2022). Además, su consumo mejora la microbiota intestinal y aumenta la biodiversidad bacteriana (Hidalgo et al., 2018).

Además de su uso como alimento funcional, el aceite de oliva es empleado desde la antigüedad como ungüento para su aplicación en la piel y en el cabello por sus

propiedades medicinales (Lin et al., 2017; Shamsoum et al., 2017). De hecho, sobre la piel se ha comprobado en multitud de estudios que tiene un gran potencial para la regeneración, permitiendo la rápida cicatrización de heridas por su acción antioxidante, emoliente y su capacidad de evitar las infecciones y de acelerar el proceso de remodelación tisular (Donato-Trancoso et al., 2016; Zahmatkesh et al., 2015). Además, una investigación en pacientes reveló que la aplicación del aceite de oliva sobre la piel permite que se mejore su elasticidad e hidratación, previniendo de este modo la aparición de úlceras por presión (Díaz-Valenzuela et al., 2019). Por ello, no solo sus beneficios se obtienen a nivel nutricional con su consumo en la dieta, sino que también se obtienen cuando se utiliza como agente tópico para la reparación de lesiones cutáneas.

Propiedades de los compuestos bioactivos presentes en el aceite de oliva

Los **compuestos bioactivos** son moléculas que se encuentran en menor cantidad en el aceite de oliva y que se caracterizan por tener una gran actividad biológica y ejercer diferentes funciones (Karim et al., 2022). En el aceite de oliva existen más de 230 moléculas con esta capacidad, que le proporcionan su gran poder antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antimicrobiano e inmunomodulatorio, entre otros (Ruiz-Canela & Martínez-González, 2011; Santangelo et al., 2018). Esto se debe, en gran parte, a la presencia de los **compuestos fenólicos**, pudiendo destacar compuestos como el HT o la OLP (Martín-Peláez et al., 2013; Vissers et al., 2004).

Los **compuestos fenólicos** son un grupo conformado por más de 8000 tipos diferentes de moléculas, las cuales presentan en común una estructura formada por al menos un anillo aromático y dos o más grupos hidroxilo (Finicelli et al., 2019). Son metabolitos secundarios que las plantas producen como defensa frente a factores de estrés como la luz ultravioleta o el ataque de patógenos (Squillaro et al., 2018). Como se ha citado anteriormente, estos compuestos fenólicos le confieren al aceite de oliva una amplia variedad de propiedades beneficiosas, destacando su potente propiedad antioxidante. Los efectos de los compuestos fenólicos provenientes del aceite de oliva se han estudiado ampliamente en enfermedades que están provocadas por estrés oxidativo (Ditano-Vázquez et al., 2019). A continuación, se va a describir la acción del HT y de la OLP, los dos compuestos mayoritarios en la fracción fenólica.

El **HT** (Figura 9A) es una molécula que se obtiene a partir de la hidrólisis de la OLP durante la maduración de la aceituna (Bertelli et al., 2020). Se ha comprobado su gran potencial para evitar el desarrollo de aterosclerosis, ya que impide la peroxidación

lipídica y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (D'Angelo et al., 2020; Karković Marković et al., 2019). El HT también se ha utilizado para la reparación de heridas en la piel, ya que presenta un potente poder antiinflamatorio (Mssillou et al., 2022; Smeriglio et al., 2019).

La **OLP** (Figura 9B) es un secoiridoide complejo cuya estructura está constituida por 3 subunidades: el HT, el ácido eleanólico y una molécula de glucosa. La cantidad de este compuesto varía en función del estadio de desarrollo en el que se encuentre la aceituna (Ahamad et al., 2019). Al igual que el HT, este compuesto bioactivo ejerce multitud de efectos beneficiosos sobre la salud. Algunos de ellos se describen a continuación:

- Tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide (Bayry & Radstake, 2013). La OLP permite disminuir los niveles de moléculas proinflamatorias como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) o la interleucina 17 (IL-17) (Vrdoljak et al., 2022).
- Efecto sobre la proliferación. Este compuesto bioactivo es capaz de reducir la proliferación de las células tumorales mediante la inducción de la vía apoptótica (Marcelino et al., 2019). Diferentes moléculas que participan en la progresión de un tumor, como NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa β*) o HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*), se ven reducidas o inhibidas en presencia de OLP, poniendo de manifiesto su capacidad antitumoral (Zheng et al., 2022). Cabe destacar que la eficacia de la OLP se ha probado en diferentes tipos de cáncer, siendo capaz de inhibir el crecimiento de las células tumorales que provocan el cáncer de estómago o de hígado (Barzegar et al., 2019; Yan et al., 2015) y de producir una reducción de hasta un 64% del tumor en modelos animales con cáncer colorrectal (Giner et al., 2016). Además, la OLP podría combinarse con otros agentes quimioterapéuticos para mejorar el tratamiento de algunos cánceres (Sherif & Al-Gayyar, 2018).
- Agente neuroprotector. El mecanismo de acción de la OLP en enfermedades neurales se desarrolla a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Butt et al., 2021). Se han descrito resultados prometedores en patologías como Parkinson o Alzheimer, en el cual inhibe la formación de agregados amiloides (Omar et al., 2018; Pasban-Aliabadi et al., 2013).
- Mejora la microbiota intestinal actuando como prebiótico, ya que los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* utilizan la OLP como fuente de carbono para su

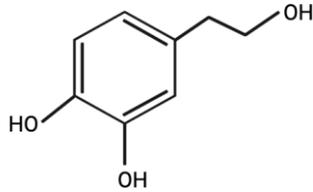
crecimiento, por lo que aumenta su proliferación y, en consecuencia, el número de estas bacterias probióticas en el intestino (Marcelino et al., 2019).

Otra molécula que también se encuentra dentro del grupo de los compuestos fenólicos pero que está menos estudiada es el **DHFG** (Figura 9C). Químicamente, es parecido al HT pero con un grupo hidroxilo extra (Rodríguez et al., 2007). De los estudios que se han llevado a cabo con el DHFG se conoce que ejerce una buena actividad antioxidante, y se ha testado para la conservación de la calidad del semen congelado (Shakouri et al., 2021).

Otro compuesto bioactivo a destacar es el **AM** (Figura 9D), un ácido triterpénico pentacíclico que se encuentra en la piel de las aceitunas y en las hojas de los olivos (Sánchez-Quesada et al., 2013), siendo de los principales triterpenos que se encuentran en el AOVE (Moral & Escrich, 2022). El AM posee gran valor biológico, ya que del mismo modo que el resto de las moléculas anteriormente citadas, desempeña varios efectos farmacológicos beneficiosos, de los que podemos resaltar:

- Efecto sobre la proliferación. La eficacia del AM ha sido probada en múltiples ensayos de cáncer tanto *ex vivo* como *in vivo*, constituyéndose como una molécula prometedora para el tratamiento de esta enfermedad (Yu et al., 2021). Ha sido eficaz para tratar cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de riñón, etc. Esto ha sido posible gracias a que el AM produce una inhibición de la proliferación celular, induce la apoptosis y activa mecanismos antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Bai et al., 2016; Mokhtari et al., 2020; Thakor et al., 2017; Wei et al., 2019).
- Efecto antioxidante, siendo importante la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (Xynos et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que concentraciones elevadas del AM son capaces de inducir estrés oxidativo, siendo utilizadas en cultivos de células tumorales para intentar detener su crecimiento (Mokhtari et al., 2015).
- Disminuye los niveles de glucosa en sangre, ayudando a tratar la diabetes y otras complicaciones asociadas a esta enfermedad como el hígado graso (He et al., 2022). Este efecto hipoglucémico también ha sido ampliamente estudiado y demostrado en cultivos celulares y modelos animales (Lozano-Mena et al., 2014).
- Estudios recientes avalan el uso del AM para la prevención de daños cardiovasculares, neurales y pérdida de masa muscular (Bae et al., 2020; N. Wang et al., 2022; Yamauchi et al., 2021).

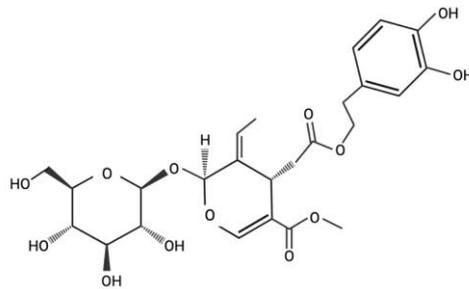
A



Efectos del hidroxitirosol

Antioxidante
Antiinflamatorio

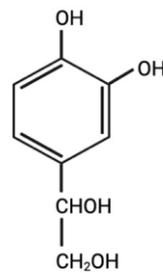
B



Efectos de la oleuropeína

Antioxidante
Antiinflamatorio
Antiproliferativo
Prebiótico

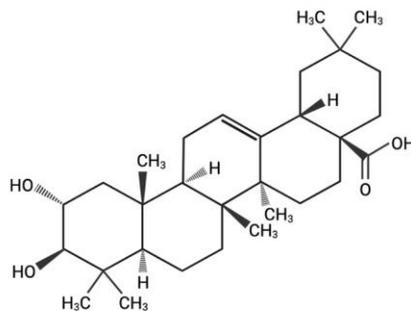
C



Efectos del DL-3,4-dihidroxifenil glicol

Antioxidante

D



Efectos del ácido maslínico

Antioxidante
Antiproliferativo
Hipoglucémico
Protección cardiovascular
Protección neural
Evita pérdida de masa muscular

Figura 9. Estructura química y efecto de algunos de los compuestos bioactivos presentes en el aceite de oliva. A: Hidroxitirosol. B: Oleuropeína. C: DL-3,4-dihidroxifenil glicol. D: Ácido maslínico. Adquirido de Bertelli et al., 2020, Rodríguez et al., 2007, Sánchez-Quesada et al., 2013. Creado con Biorender.com.

HIPÓTESIS

La aplicación de la Ingeniería Tisular ha permitido generar piel artificial humana a partir de cultivos celulares de fibroblastos y queratinocitos y biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados. Sin embargo, el proceso requiere largos periodos de tiempo, especialmente, para la obtención de una abundante población celular queratinocítica. La **hipótesis** de trabajo de la presente Tesis Doctoral es que la utilización de diferentes compuestos bioactivos procedentes del aceite de oliva pueden contribuir a optimizar el procedimiento, reduciendo el tiempo necesario para la obtención de la piel artificial, sin alterar la morfoestructura ni la funcionalidad de las células así obtenidas. De este modo, se podrán generar nuevos sustitutos de piel artificial humana útiles en Ingeniería Tisular, optimizados en cuanto a los tiempos de generación.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es determinar la utilidad de diferentes tipos de compuestos bioactivos presentes en el aceite de oliva en la fabricación de piel artificial humana mediante Ingeniería Tisular.

Los **objetivos específicos** son:

1. Comparar los efectos de los compuestos bioactivos del aceite de oliva sobre la proliferación y viabilidad celular de cultivos de células de la piel humana, respecto al grupo control.
2. Determinar la concentración óptima de los compuestos bioactivos del aceite de oliva aplicados a cultivos de células de la piel humana.
3. Generar nuevos modelos de piel artificial humana mediante Ingeniería Tisular que incorporen los nuevos compuestos bioactivos procedentes del aceite de oliva.
4. Evaluar los nuevos modelos de piel artificial humana generados mediante Ingeniería Tisular para determinar parámetros histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos, en relación con la piel control.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Compuestos bioactivos del aceite de oliva

En la presente Tesis Doctoral, se han evaluado cuatro compuestos bioactivos obtenidos del aceite de oliva, incluyendo el AM, cedido por la empresa Biomaslinic S.L. (Granada, España), extracto fenólico (EF) con un contenido mínimo de HT del 40%, cedido por la empresa Extractos y Derivados S.L. (Granada, España), OLP (Merck, Darmstadt, Alemania; ref. 12247) y DHFG (Merck; ref. D9753).

2. Cultivos celulares y condiciones de cultivo

Para determinar los efectos *ex vivo* de los diferentes componentes analizados en la presente Tesis Doctoral, se utilizaron dos fuentes de células de la piel humana: queratinocitos inmortalizados y cultivos primarios de queratinocitos.

2.1. Queratinocitos inmortalizados. Para establecer la concentración óptima de cada uno de los compuestos bioactivos, se analizó un amplio rango de concentraciones de cada uno de ellos en cultivos de queratinocitos humanos de piel inmortalizados, conocidos comercialmente como la línea celular CRL-4048 (adquirida de la American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA, EEUU), previamente utilizadas para la realización de estudios de proliferación celular (Cases-Perera et al., 2022; Chato-Astrain et al., 2021). Estas células fueron cultivadas con medio específico para queratinocitos denominado QC (Chato-Astrain et al., 2021), compuesto por una mezcla en la proporción 3:1 de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) y Ham-F12, suplementado con un 10% de suero bovino fetal, un 1% de antibióticos/antimicóticos, 24 µg/mL de adenina, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 5 µg/mL de insulina, 10 ng/µL de factor de crecimiento epidérmico y 1,3 ng/mL de triyodotironina (todos los productos adquiridos de Merck), utilizando condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% de CO₂). El medio de cultivo se renovó cada 2-3 días y las células fueron subcultivadas antes de alcanzar la confluencia utilizando CTS TrypLE Select Enzyme Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Los grupos de estudio establecidos en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Grupo control positivo de células vivas o CTR, compuesto por queratinocitos humanos cultivados con medio QC.
2. Grupo control negativo de células muertas o NEG, constituido por queratinocitos humanos cultivados en presencia de 2% de Tritón X-100 (Probus, Barcelona, España).

3. Queratinocitos humanos cultivados con medio QC suplementado con concentraciones crecientes de AM: 1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
4. Queratinocitos humanos cultivados con medio QC suplementado con concentraciones crecientes de EF: 1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
5. Queratinocitos humanos cultivados con medio QC suplementado con concentraciones crecientes de DHFG: 1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
6. Queratinocitos humanos cultivados con medio QC suplementado con concentraciones crecientes de OLP: 1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En todos los casos, las células fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos a una densidad final de 7.250 células por pocillo y se dejaron durante 24 horas en medio QC sin suplementar para favorecer la adhesión. Con esta densidad celular, los cultivos no alcanzaban la confluencia en los tres tiempos de estudio evaluados. Transcurridas las 24 horas, se eliminó el medio QC y se añadió el específico de cada uno de los grupos anteriormente mencionados (habitualmente, QC suplementado con una concentración concreta de uno de los productos bioactivos). Las células se mantuvieron en presencia de los compuestos bioactivos durante 24, 48 y 72 horas, y se les realizaron ensayos de viabilidad y proliferación celular que serán descritos posteriormente.

De acuerdo con los resultados obtenidos de dichos ensayos, se pudo establecer la concentración óptima de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para AM y OLP y de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para EF. De esta forma, el quinto grupo experimental no fue utilizado para estudios posteriores por no presentar ningún efecto sobre la proliferación de los queratinocitos.

2.2. Cultivos primarios de queratinocitos. Para determinar el efecto de los diferentes productos sobre células humanas no inmortalizadas, se procedió a generar cultivos primarios de queratinocitos humanos a partir de biopsias de piel prepuccial humana obtenida de donantes sometidos a circuncisión. En este caso, los cultivos primarios se establecieron empleando la técnica que se utiliza habitualmente para la fabricación de piel artificial mediante IT. Esta técnica consiste en la utilización de enzimas digestivas capaces de generar una digestión enzimática de las uniones intercelulares de la epidermis para, de este modo, liberar al medio los queratinocitos. En primer lugar, las biopsias se sumergieron en una solución de 0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Merck) durante 30 minutos a 37°C con agitación suave, para favorecer la desagregación celular a nivel del epitelio. Tras ello, se recogió el sobrenadante que contenía las células liberadas, se inactivó la tripsina con un 10% de suero bovino fetal y se centrifugó a 1.000 r.p.m. para obtener un precipitado o *pellet* que contenía las células. Este *pellet* se resuspendió en medio QC y se mantuvo a 37°C.

El proceso se repitió 3 veces con las mismas muestras y el conjunto de células resultantes se sembró en placas de 6 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo, utilizando medio QC (grupo CTR) o medio QC enriquecido con la concentración adecuada de compuesto bioactivo. El medio se renovó cada 2-3 días, y las células se cultivaron durante 21 días en condiciones de cultivo estándar. Para ello, se emplearon prepujios provenientes de 6 donantes distintos (n=6).

3. Análisis de la viabilidad celular

Para determinar el efecto de los compuestos bioactivos sobre la viabilidad de los queratinocitos humanos inmortalizados, se utilizaron dos métodos diferentes, que se describen a continuación. Se emplearon 6 réplicas por cada grupo experimental (n=6).

3.1. Ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD (Viability/Cytotoxicity Kit). Para el análisis de viabilidad mediante esta técnica se eliminó el medio de cultivo, se realizaron 3 lavados con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) y se añadió el reactivo LIVE/DEAD a cada pocillo, dejándolo actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se realizaron de nuevo lavados con PBS para eliminar el reactivo y se tomaron imágenes de fluorescencia utilizando el equipo *ZOE Fluorescent Cell Imager* (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Las células vivas se marcan en color verde y las células muertas en color rojo. Para cada grupo, se contabilizó el número de células vivas y muertas, y se determinó el porcentaje de viabilidad como porcentaje de células vivas respecto al total de células vivas y muertas.

3.2. Cuantificación del ADN liberado al medio por las células. En este caso, el medio se recogió de cada una de las condiciones, trascurridas las 24, 48 y 72 horas de estudio. Después, la cantidad de ADN liberado al medio por parte de las células muertas se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Los resultados de este estudio se normalizaron frente al control positivo, el cual se consideró como el 100% de viables, y al control negativo, considerado como 0% de viables.

4. Análisis de la proliferación celular

La proliferación celular de los queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de los diferentes compuestos se evaluó utilizando una doble aproximación. En los ensayos se emplearon 6 réplicas por cada grupo de estudio (n=6).

4.1. Cuantificación celular. En primer lugar, se determinó el número de células existente en cada pocillo de cultivo, tras cada periodo de incubación. La cuantificación del número de células se realizó mediante citometría de flujo en todas las condiciones y a cada tiempo de estudio, llevando a cabo los siguientes pasos: en primer lugar, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Tras ello, se añadió CTS *TrypLE Select Enzyme Solution* a cada pocillo durante 5 minutos a 37°C para separar las células de la superficie, se recogieron y se inactivó la enzima con un 10% de suero bovino fetal. Finalmente, esta solución se llevó al equipo *NovoCyte flow cytometer* (Acea Biosciences/Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) para su análisis.

4.2. Ensayos metabólicos. En segundo lugar, se analizó la proliferación celular utilizando el método WST-1, basado en el kit comercial *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Roche, Basilea, Suiza). Este ensayo permite determinar la proliferación de una población celular en base a la actividad metabólica de las células a analizar, y a su capacidad para modificar un sustrato y generar un producto de color rojo o marrón denominado formazán. Para ello, se mezcló el reactivo WST-1 con medio QC, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se añadió a cada pocillo, dejándolo actuar durante 4 horas a 37°C en oscuridad. Trascurrido el tiempo de incubación, se midió la cantidad de formazán producido por las células metabólicamente activas mediante espectrofotometría, utilizando un lector de placas Asys UVM-340 (Biochrom/Harvard Bioscience, Holliston, MA, EEUU). La absorbancia medida se relaciona directamente con el número de células viables.

Para ambos análisis, los resultados obtenidos se normalizaron frente al control positivo, el cual se consideraba como el 100%, y al control negativo, considerado como 0%.

5. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real

Los efectos de las concentraciones determinadas como pro-proliferativas para AM, EF y OLP fueron evaluados a nivel de expresión génica utilizando PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos descritos, se decidió seleccionar los siguientes grupos experimentales para realizar los estudios de expresión génica en cultivos de queratinocitos humanos inmortalizados:

- AM utilizado a una concentración de 5 µg/mL (AM5) durante 72 horas.
- EF utilizado a una concentración de 10 µg/mL (EF10) durante 28 días.
- OLP utilizado a una concentración de 5 µg/mL (OLP5) durante 28 días.

En estos grupos de estudio, se extrajo el ARN total de las células utilizando un kit *Qiagen RNeasy mini* (Qiagen, Venlo, Holanda). Posteriormente, 1 µg de ARN de cada muestra se retrotranscribió a ADNc usando el *Advanced cDNA Synthesis kit* (Bio-Rad). Para el análisis de expresión génica, se adquirieron unas placas de PCR personalizadas (Bio-rad), en la que cada una contenía los cebadores necesarios para el análisis de 30 genes diferentes en los que se evaluaba la proliferación celular, la expresión de citoqueratinas, moléculas de adhesión celular y uniones intercelulares, marcadores de diferenciación epitelial, componentes de la membrana basal, junto con 2 controles internos (RT y RQ) y un gen constitutivo utilizado como control de expresión génica (*GAPDH*) (Blanco-Elices et al., 2023). Para la qPCR, se mezclaron 1 µL de ADNc de cada muestra con 9 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) y se añadió esta mezcla a cada pocillo de la placa. A continuación, se llevó a cabo el proceso de amplificación en un termociclador *CFX Connect Real-Time Detection System* (Bio-Rad) y se programó un protocolo con una temperatura de anillamiento de 60°C. Los resultados obtenidos se normalizaron frente a la expresión de *GAPDH* empleando el software *CFX Manager 3.1* (Bio-Rad), se calculó el $\Delta\Delta C_t$ para cada condición experimental y para cada gen, y su expresión relativa (Vinje & Friedman, 2023). En cada grupo de estudio, se analizaron 6 muestras (n=6).

Tipo de gen	Símbolo del gen	Nombre del gen	AM5	EF10	OLP5
Proliferación	<i>MKI67</i>	Marcador de proliferación KI67	No	Sí	Sí
	<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen	Sí	Sí	Sí
Diferenciación epitelial	<i>BGN</i>	Biglican	Sí	Sí	Sí
	<i>FLG</i>	Filagrina	Sí	Sí	Sí
	<i>IVL</i>	Involucrina	Sí	Sí	Sí
Membrana basal	<i>COL4A1</i>	Cadena alfa 1 del colágeno tipo IV	Sí	Sí	Sí
	<i>LAMA1</i>	Subunidad alfa 1 de la laminina	Sí	Sí	Sí
	<i>LAMA3</i>	Subunidad alfa 3 de la laminina	Sí	Sí	Sí
	<i>LAMB1</i>	Subunidad beta 1 de la laminina	Sí	Sí	Sí
	<i>LAMC1</i>	Subunidad gamma 1 de la laminina	Sí	Sí	Sí
Uniones intercelulares	<i>DSP</i>	Desmoplaquina	Sí	Sí	Sí
	<i>FN1</i>	Fibronectina 1	Sí	Sí	Sí
	<i>GJA1</i>	Proteína de unión GAP Alfa 1	Sí	Sí	Sí
	<i>GJA2</i>	Proteína de unión GAP Alfa 2	No	Sí	Sí
	<i>GJA4</i>	Proteína de unión GAP Alfa 4	Sí	Sí	Sí
	<i>JUP</i>	Junction Plakoglobin	Sí	Sí	Sí
	<i>PKP1</i>	Placofilina 1	Sí	Sí	Sí
	<i>PPL</i>	Periplaquina	Sí	Sí	Sí
	<i>TJP1</i>	Proteína de unión estrecha 1	Sí	Sí	Sí
	<i>TJP2</i>	Proteína de unión estrecha 2	Sí	Sí	Sí
Citoqueratinas	<i>KRT1</i>	Citoqueratina 1	No	Sí	Sí
	<i>KRT3</i>	Citoqueratina 3	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT5</i>	Citoqueratina 5	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT6A</i>	Citoqueratina 6A	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT7</i>	Citoqueratina 7	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT8</i>	Citoqueratina 8	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT10</i>	Citoqueratina 10	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT13</i>	Citoqueratina 13	Sí	Sí	Sí
	<i>KRT16</i>	Citoqueratina 16	Sí	No	No
	<i>KRT18</i>	Citoqueratina 18	No	Sí	Sí
<i>KRT19</i>	Citoqueratina 19	Sí	Sí	Sí	
Controles	RT	-----	Sí	Sí	Sí
	RQ	-----	Sí	No	No
	<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Sí	Sí	Sí

Tabla 1. Análisis de la expresión génica de queratinocitos humanos de piel cultivados en cada una de las condiciones experimentales: 5 µg/mL de ácido maslínico (AM5), 10 µg/mL de extracto fenólico (EF10) y 5 µg/mL de oleuropeína (OLP5). Para cada gen, se muestra si se ha llevado a cabo el análisis en presencia de AM5, EF10 y OLP5.

6. Evaluación del efecto de los compuestos bioactivos sobre la eficiencia en la generación de cultivos primarios de queratinocitos de la piel humana

Tras establecer cultivos primarios de queratinocitos a partir de biopsias de piel humana aplicando los métodos descritos en el apartado 2.2, se procedió a cuantificar la eficiencia de cada una de las condiciones experimentales para la generación de estos cultivos primarios. Para ello, se tomaron imágenes macro y microscópicas de cada muestra tras

21 días de cultivo (para evitar el crecimiento excesivo de las colonias y, por tanto, el solapamiento de éstas), cuantificándose, en cada caso, el número de colonias de queratinocitos. Para facilitar el análisis, las muestras se fijaron en formol (Panreac, Barcelona, España) al 4% durante 2 horas, se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) (Panreac) y se fotografiaron a bajo aumento. Para cada condición, se analizaron 10 pocillos (n=10).

Una vez cuantificado el total de colonias de queratinocitos que aparecían en el conjunto de pocillos, se calculó el número total de colonias correspondiente a cada condición experimental. Tras ello, se calculó el porcentaje de colonias en cada condición, respecto al total, así como el número de colonias en cada condición experimental normalizado respecto al CTR (considerado como 1).

7. Generación de sustitutos de piel humana de fibrina-agarosa funcionalizados con compuestos bioactivos

Una vez determinados los compuestos y las concentraciones óptimas sobre cultivos dos dimensiones (2D) (AM5, EF10 y OLP5), se evaluaron los efectos de estas moléculas sobre sustitutos de piel artificial generados mediante IT mantenidos en cultivo durante 12 días. En este caso, se establecieron los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo control positivo o CTR, compuesto por constructos de piel artificial cultivados con medio QC.
2. Grupo AM5, formado por constructos de piel artificial cultivados con medio QC suplementado con AM5.
3. Grupo EF10, constituido por constructos de piel artificial cultivados con medio QC suplementado con EF10.
4. Grupo OLP5, formado por constructos de piel artificial cultivados con medio QC suplementado con OLP5.
5. Grupo AM5+EF10+OLP5, compuesto por constructos de piel artificial cultivados con medio QC suplementado con los 3 compuestos bioactivos a las concentraciones previamente determinadas (AM5, EF10 y OLP5).

Para la fabricación de cada sustituto de piel artificial, se aplicaron protocolos de IT de la piel establecidos en el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, que permitieron previamente la generación del modelo UGRSKIN de piel artificial, el cual mostró utilidad clínica en pacientes grandes quemados (Carriel et al., 2012b; Chato-Astrain et al., 2021; Garzón et al., 2013; Ionescu et al., 2020; Martin-Piedra et al., 2019,

2023; Ruiz-López et al., 2022). Para ello, se utilizaron biomateriales de fibrina-agarosa diseñados y patentados por el grupo de investigación (Alaminos et al., 2006; Scionti et al., 2014), utilizándose, como fuente de fibrina, plasma humano procedente de donantes sanos, a través del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (<https://www.juntadeandalucia.es/salud/biobanco/es>). Para ello, se procedió del siguiente modo:

- Generación de un sustituto de la dermis humana. Para producir un sustituto dérmico de 250 μ L de volumen, se mezclaron 190 μ L de plasma humano con 31,25 μ L de medio DMEM en el que previamente se habían resuspendido 50.000 fibroblastos de la dermis humana previamente aislados y cultivados. A esta mezcla, se añadió el volumen necesario de cada compuesto bioactivo, dependiendo del grupo de estudio del que se trate, no añadiéndose ningún compuesto en el grupo control positivo (CTR). Para evitar la fibrinólisis, a esta mezcla se añadieron 15 μ L de ácido tranexámico (Amchafibrin[®], MEDA Pharma S.L., Madrid, España). A continuación, se añadieron 50 μ L de CaCl₂ al 2% para inducir la polimerización de la fibrina, seguidamente de 50 μ L de agarosa tipo VII (Merck) al 2% en PBS, licuada a 100°C y enfriada hasta una temperatura cercana a los 37°C. Esta mezcla se transfirió rápidamente sobre un inserto poroso específico de cultivos de 6,5 mm de diámetro (Transwell[®], Corning, NY, EEUU) y se dejó solidificar durante 30 minutos a 37°C en un incubador celular (Figura 10A).
- Generación de un sustituto de la epidermis humana. Una vez gelificado el sustituto dérmico, se procedió a tripsinizar los queratinocitos humanos inmortalizados mantenidos en cultivo, los cuales se subcultivaron sobre la superficie del sustituto dérmico para generar un epitelio (15.000 queratinocitos humanos en cada sustituto). A continuación, cada tejido artificial se cubrió con su correspondiente medio de cultivo, y se mantuvo en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO₂. Los sustitutos de piel artificial se mantuvieron sumergidos en medio de cultivo suplementado con los diferentes compuestos bioactivos durante 6 días utilizando condiciones estándar de cultivo celular (37°C y 5% CO₂). Tras ello, los tejidos artificiales se sometieron a la técnica de interfase aire-líquido durante otros 6 días, para inducir la estratificación y diferenciación del epitelio (Fatimah et al., 2013). Durante todo este tiempo, el medio de cultivo se renovó cada 2-3 días, utilizándose en todo momento, el medio correspondiente a cada grupo de estudio (QC en el grupo CTR y QC

suplementado con agentes bioactivos, en el resto de los grupos) (Figura 10B y Figura 11).

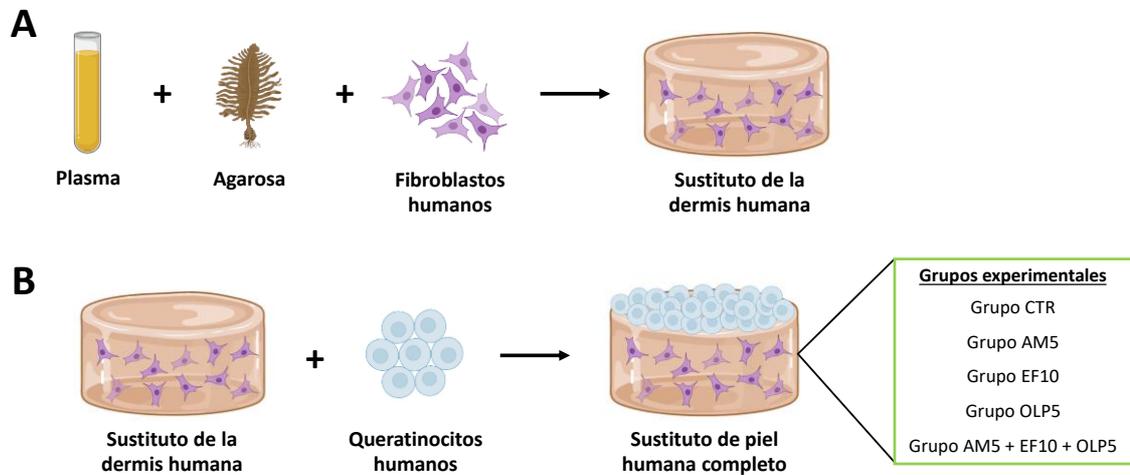


Figura 10. Generación de los sustitutos de piel humana completos funcionalizados con los diferentes compuestos bioactivos. A: Generación de los sustitutos de la dermis humana a partir de la combinación de plasma humano, agarosa y fibroblastos humanos. B: Generación de los sustitutos de piel humana completos añadiendo queratinocitos humanos sobre la superficie del sustituto de la dermis y establecimiento de los diferentes grupos experimentales. Creado con Biorender.com.

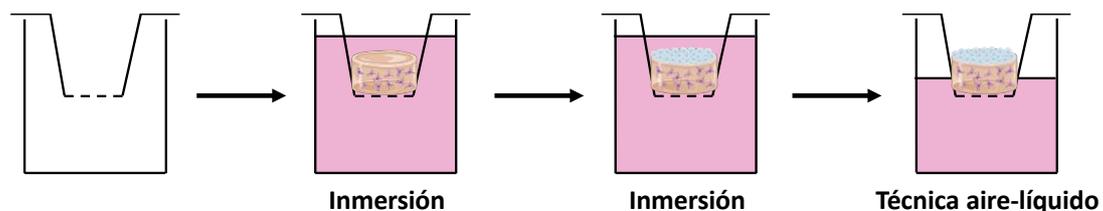


Figura 11. Forma de cultivo de los sustitutos de piel humana artificial. Los sustitutos se generaron dentro un inserto poroso y se mantuvieron sumergidos completamente en medio de cultivo durante 6 días (técnica por inmersión). Para inducir la estratificación y diferenciación del epitelio, los sustitutos se sometieron otros 6 días a la técnica de la interfase aire-líquido, en la que solo el sustituto dérmico estaba en contacto con el medio de cultivo. Creado con Biorender.com.

8. Análisis histológico de los sustitutos de piel humana

Para el análisis histológico, las muestras correspondientes a cada grupo de estudio y a cada tiempo (24 horas, 4, 8 y 12 días) se fijaron en formol al 4%, durante 48 horas. Se

emplearon 6 réplicas por cada condición experimental y cada tiempo (n=6). Posteriormente, las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente, se aclararon en xileno, se embebieron en parafina y se incluyeron en bloques histológicos, utilizando protocolos estándar de análisis histológico. Tras ello, se obtuvieron microsecciones tisulares de 2 μm , utilizando un microtomo. Estas secciones se desparafinizaron en xileno, se rehidrataron en alcoholes de concentración decreciente, y se sometieron a diferentes tipos de técnicas histológicas, que se describen a continuación.

8.1. Tinción con H-E. Una vez realizada la rehidratación de las muestras, éstas se sumergieron en hematoxilina de Harris (Epredia, Seattle, WA, EEUU) durante 3 minutos. A continuación, se sumergieron en agua corriente durante 5 minutos para la diferenciación y, seguidamente, en eosina (Epredia, Seattle, WA, EEUU) durante 20 segundos. Finalmente, las preparaciones fueron deshidratadas en alcohol, aclaradas en xileno y cubiertas con un cubreobjetos, utilizando bálsamo.

8.2. Análisis inmunohistoquímicos. Para la detección específica de los componentes de la piel humana involucrina y citoqueratinas AE1/AE3 y de los marcadores de proliferación celular KI67 y PCNA, las muestras fueron sometidas a inmunohistoquímica indirecta, utilizando anticuerpos específicos. Para ello, las muestras fueron sometidas a recuperación antigénica empleando EDTA a pH 8 (Merck) para KI67, PCNA y AE1/AE3, y citrato a pH 6 para involucrina (Panreac). A continuación, se incubaron con H_2O_2 para inactivar las peroxidasas endógenas (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania). El bloqueo de los sitios inespecíficos se llevó a cabo incubando las muestras con una solución de caseína y suero equino (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). Después, las muestras se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda: anticuerpo monoclonal de conejo anti-KI67 prediluido (MAD-000310QD), anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA prediluido (MAD-000903QD), anticuerpo monoclonal de ratón anti-AE1/AE3 prediluido (MAD-001000QD) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-involucrina prediluido (MAD-000164QD) (todos adquiridos de Vitro S.A., Granada, España). Transcurrido el periodo de incubación con los anticuerpos primarios, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios de conejo y de ratón prediluidos marcados con peroxidasa (Vector Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la detección de los sitios de unión de los anticuerpos primarios se realizó utilizando diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories) y se llevó a cabo un breve contraste de las muestras con hematoxilina de Harris (Epredia, Seattle, WA, EEUU) durante 20 segundos. Los

controles negativos usados en estas inmunohistoquímicas siguieron el mismo protocolo, pero la incubación con los anticuerpos primarios fue sustituida por una incubación con la solución de caseína. Las muestras fueron posteriormente deshidratadas en alcohol, aclaradas en xileno y cubiertas con un cubreobjetos, utilizando bálsamo.

En todos los casos, las preparaciones fueron escaneadas en un escáner histológico *Pannoramic® DESK II DW* (3D Histotech, Budapest, Hungría), y se obtuvieron imágenes utilizando el software CaseViewer v2.3, del mismo fabricante.

9. Análisis estadísticos

Para determinar si las variables analizadas en la presente Tesis Doctoral seguían una distribución normal, en primer lugar, se procedió a analizar cada distribución empleando el test de Shapiro-Wilk. Debido a que la mayoría de las distribuciones no cumplían los requisitos de la normalidad, se aplicaron posteriormente pruebas no paramétricas para la estadística inferencial.

Para la comparación entre dos grupos específicos de los resultados de los ensayos de LIVE/DEAD, WST-1 y citometría de flujo, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para la comparación de los datos de liberación de ADN y el porcentaje de colonias celulares obtenidas en cada grupo de estudio, se aplicó el test exacto de Fisher, al estar ambas variables expresadas en forma de porcentajes. Para comparar los resultados obtenidos con el uso de los diferentes compuestos en los sustitutos de piel artificial funcionalizados, se utilizó asimismo el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Para el análisis de los resultados de qPCR, por un lado, se procedió a calcular el valor relativo (*fold-change* o FC) de expresión génica en cada muestra, respecto a su control (cuya expresión génica se normalizó a 1). Por otro lado, los valores de expresión génica se compararon entre cada grupo de estudio y el grupo control utilizando asimismo el test no paramétrico de Mann-Whitney, por tratarse de distribuciones que no cumplían criterios de parametricidad. Los genes que mostraron diferencias significativas entre el grupo de estudio y el control, cuyo FC era positivo, se seleccionaron como sobreexpresados en dicho grupo de estudio, mientras que los genes con diferencias significativas y FC negativo se consideraron como inhibidos (reprimidos) en dicho grupo.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron empleando el software *Real Statistics* para Excel (Dr. Charles Zaiontz, Purdue University, West Lafayette, IN, EEUU), utilizando tests de doble cola. Los valores de significación p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Efecto de los diferentes componentes bioactivos del aceite de oliva virgen sobre la viabilidad de los queratinocitos de la piel humana mantenidos en cultivos previamente establecidos

Tal como se describe en el apartado Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral, la viabilidad de los queratinocitos de la piel humana se evaluó utilizando la técnica de LIVE/DEAD y la técnica de cuantificación de ADN, tanto a las 24 horas, como a las 48 y 72 horas de cultivo. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los componentes bioactivos (AM, EF, DHFG y OLP).

1.1 Ácido maslínico

En primer lugar, los resultados del análisis mediante la técnica LIVE/DEAD demostraron que, en términos generales, las concentraciones más bajas de AM no afectaban a la viabilidad celular. Sin embargo, se observó que concentraciones más altas de este compuesto bioactivo (AM80) resultaron ser citotóxicas, disminuyendo de forma significativa la viabilidad celular con respecto al grupo CTR en todos los tiempos del estudio. Además, se observó una tendencia a la reducción del número de células vivas en cultivo en presencia de la concentración de 80 µg/mL (AM80) cuanto mayor era el tiempo analizado (Figura 12 y Figura 13A y Tabla 2).

En segundo lugar, la cuantificación de ADN en células cultivadas con AM reveló una alta supervivencia celular en todos los grupos de estudio, sin que existieran diferencias significativas entre el grupo CTR y las diferentes concentraciones de AM evaluadas en la presente Tesis Doctoral, tanto a las 24, como a las 48 y 72 horas. Como se muestra en la Figura 13B y Tabla 3, la viabilidad celular fue superior al 98% en todas las condiciones experimentales.

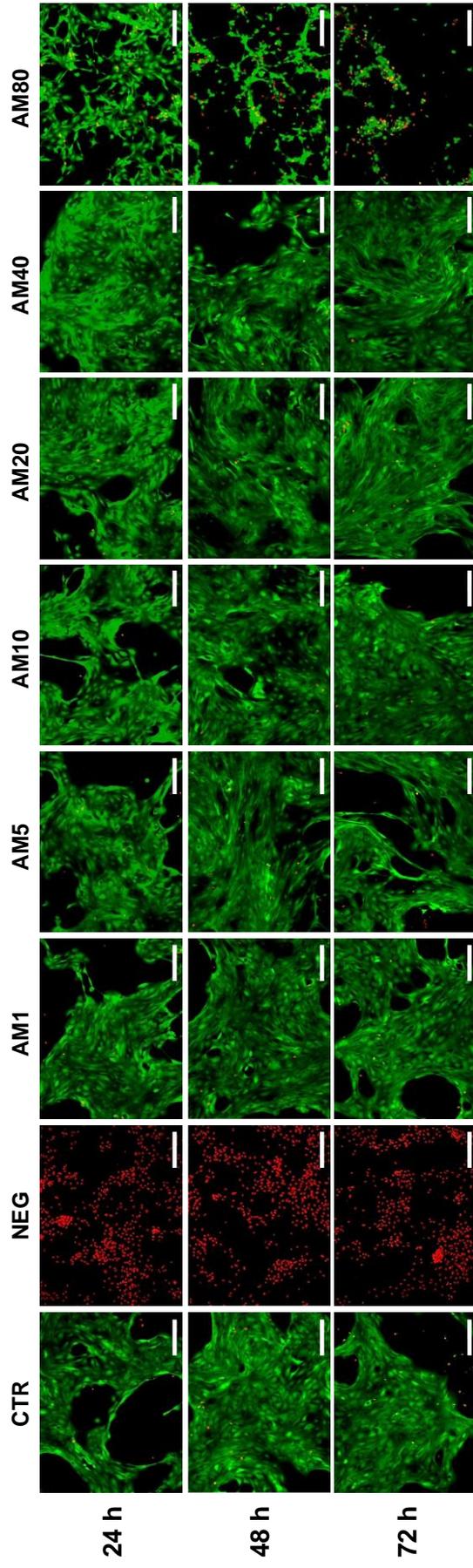


Figura 12. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido maslínico (AM) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin AM. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. Las células vivas se marcan en color verde y las células muertas, en color rojo. La barra de escala corresponde a 200 μm .

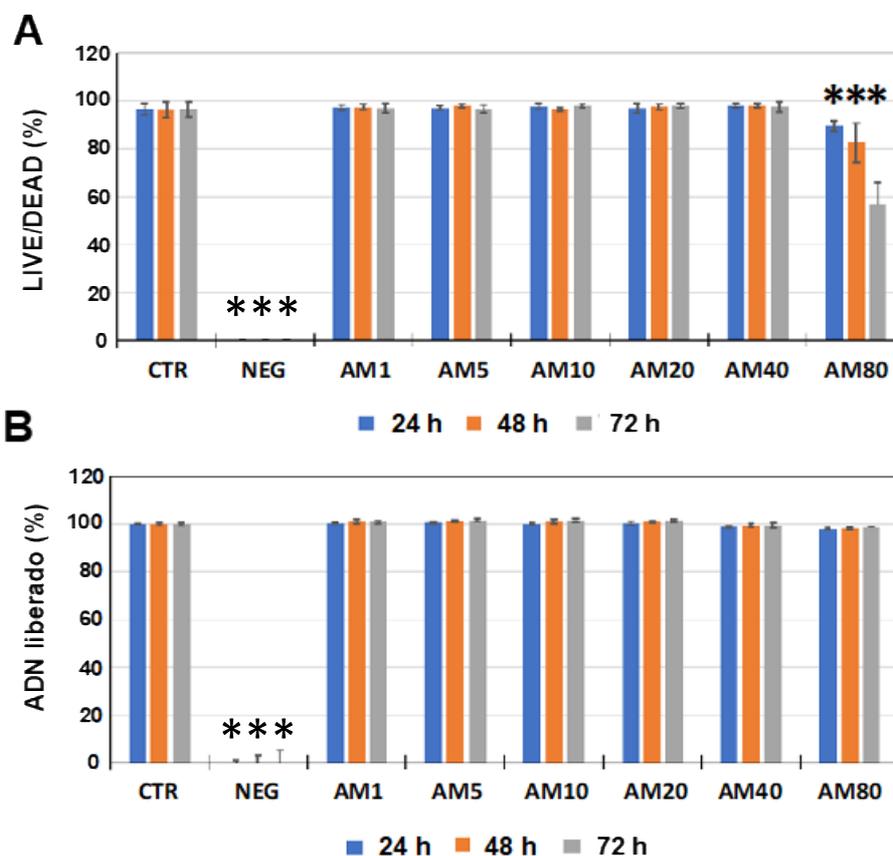


Figura 13. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido maslínico (AM) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin AM. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. A: Cuantificación de las células vivas y muertas mediante la técnica de LIVE/DEAD. B: Cuantificación del ADN liberado al medio por las células. Los valores de ADN fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

LIVE/DEAD (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	96,58±2,36	96,27±3,32	96,42±1,69
NEG	0±0	0±0	0±0
AM1	97,23±1,14	97,45±1,12	97,08±1,93
AM5	97,18±0,82	97,82±0,74	96,77±1,54
AM10	97,73±1,2	96,41±0,84	98,03±0,73
AM20	96,91±2,15	97,5±1,08	97,85±1,07
AM40	98,06±0,88	98,03±0,84	97,49±1,97
AM80	89,62±2,12	82,56±8,29	56,67±9,41
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. AM1	0,8182	0,9372	0,6991
CTR vs. AM5	0,3939	0,9372	0,6991
CTR vs. AM10	0,3095	0,3939	0,1320
CTR vs. AM20	0,4848	0,9372	0,0931
CTR vs. AM40	0,5887	0,5887	0,4848
CTR vs. AM80	0,0039*	0,0039*	0,0039*

Tabla 2. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de ácido maslínico (AM) mediante la técnica LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de AM; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; AM1-AM80: células expuestas a concentraciones crecientes de AM (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ADN LIBERADO (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±0,32	100±0,60	100±0,54
NEG	0±0,81	0±2,89	0±5,41
AM1	100,5±0,31	101,07±0,76	100,86±0,65
AM5	100,6±0,48	101,19±0,51	101,6±0,58
AM10	100,08±0,38	101,07±0,79	101,57±0,67
AM20	100,38±0,65	100,88±0,48	101,41±0,65
AM40	98,95±0,50	99,47±0,74	99,36±1,00
AM80	98,10±0,51	98,35±0,37	98,51±0,59
CTR vs. NEG	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
CTR vs. AM1	0,9999	0,9999	0,9999
CTR vs. AM5	0,9999	0,9999	0,4977
CTR vs. AM10	0,9999	0,9999	0,4977
CTR vs. AM20	0,9999	0,9999	0,9999
CTR vs. AM40	0,9999	0,9999	0,9999
CTR vs. AM80	0,5000	0,5000	0,9999

Tabla 3. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de ácido maslínico (AM) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar, normalizadas respecto al control. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de AM; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; AM1-AM80: células expuestas a concentraciones crecientes de AM (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

1.2 Extracto fenólico

Cuando se utilizó la técnica de LIVE/DEAD sobre células tratadas con EF, se observó que este compuesto no presentaba efectos deletéreos sobre estas células, en el rango de concentraciones de 1 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en ninguno de los tres tiempos del estudio, manteniéndose niveles de viabilidad celular similares a los del CTR. En cambio, cuando se trataron los cultivos con la concentración más elevada de EF (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observó una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de células viables con respecto al grupo CTR, siendo más notable esta disminución a las 72 horas de estudio (Figura 14 y Figura 15A y Tabla 4).

Por otro lado, la cuantificación de ADN liberado al medio mostró asimismo que las concentraciones más bajas de EF (1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no producían efectos citotóxicos sobre los queratinocitos cultivados con el compuesto durante 24, 48 o 72 horas. Sin embargo, se observó una reducción significativa de la viabilidad cuando se cultivaron las células en presencia de EF40 a las 24 horas y de EF80 a las 24 y 48 horas (Figura 15B y Tabla 5).

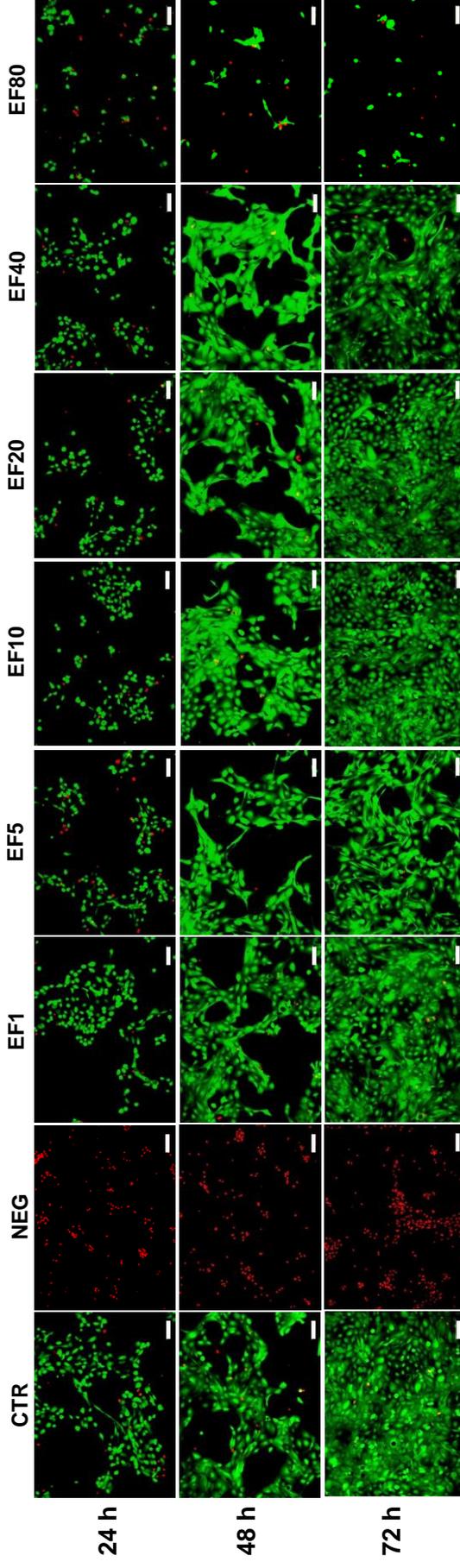


Figura 14. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto fenólico (EF) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin EF. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. Las células vivas se marcan en color verde y las células muertas, en color rojo. La barra de escala corresponde a 100 μm .

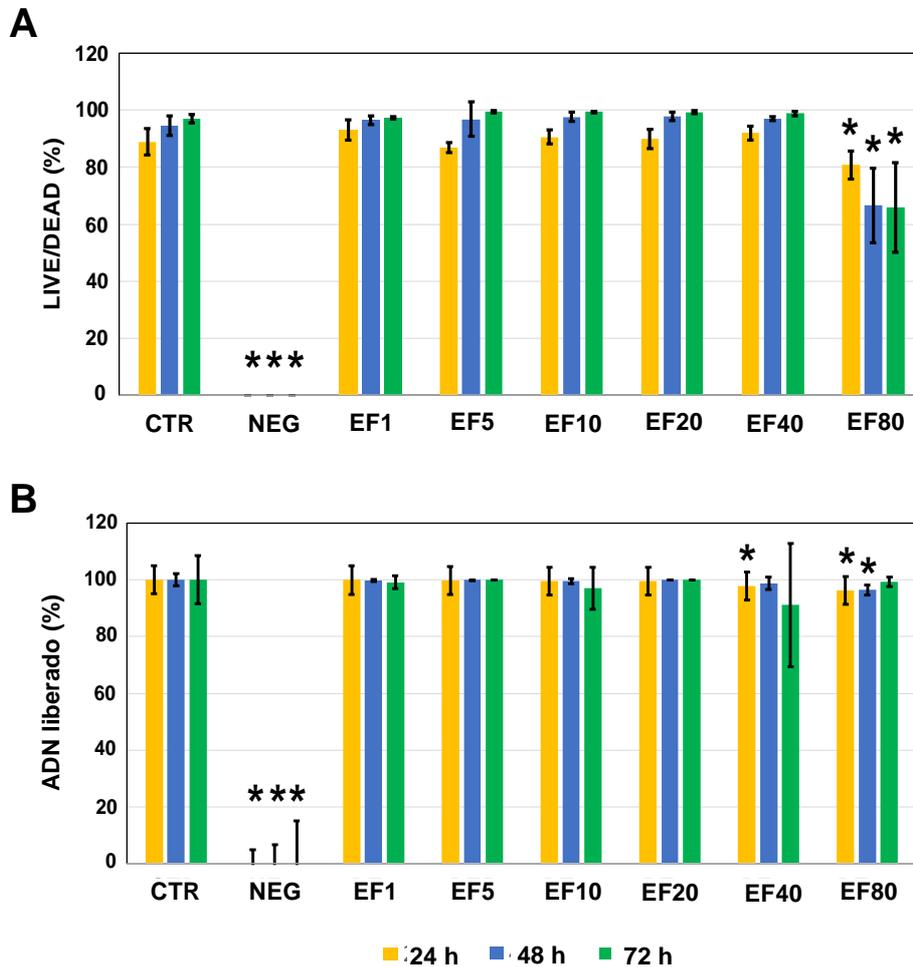


Figura 15. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto fenólico (EF) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin EF. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. A: Cuantificación de las células vivas y muertas que fueron tratadas con el método de LIVE/DEAD. B: Cuantificación del ADN liberado al medio por las células. Los valores de ADN fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

LIVE/DEAD (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	89±4,56	95,81±1,68	97,8±1,94
NEG	0±0	0±0	0±0
EF1	93,05±3,51	96,6±1,54	97,43±0,40
EF5	86,94±1,88	96,92±5,92	99,44±0,45
EF10	90,6±2,55	97,66±1,67	99,4±0,30
EF20	89,92±3,31	97,82±1,45	99,36±0,65
EF40	92,02±2,47	97,04±0,56	98,84±0,87
EF80	80,86±4,84	66,62±13,21	65,94±15,81
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF1	0,1320	0,5887	0,3939
CTR vs. EF5	0,5887	0,0931	0,0649
CTR vs. EF10	0,4848	0,0931	0,1320
CTR vs. EF20	0,6991	0,0649	0,0931
CTR vs. EF40	0,3095	0,0931	0,5887
CTR vs. EF80	0,0260*	0,0022*	0,0022*

Tabla 4. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de extracto fenólico (EF) mediante la técnica de LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de EF; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; EF1-EF80: células expuestas a concentraciones crecientes de EF (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ADN LIBERADO (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±0,76	100±2,11	100±1,32
NEG	0±2,32	0±6,77	0±14,45
EF1	99,98±0,04	99,86±0,34	98,55±3,56
EF5	99,84±0,52	99,98±0,05	100±0
EF10	99,58±0,75	99,63±0,91	96,51±8,54
EF20	99,55±0,7	100±0	100±0
EF40	97,75±1,98	98,74±2,19	100±0
EF80	96,3±1,43	96,45±1,71	98,79±2,98
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF1	0,3939	0,3095	0,3939
CTR vs. EF5	0,8182	0,3939	0,6991
CTR vs. EF10	0,9372	0,3095	0,3939
CTR vs. EF20	0,8182	0,3939	0,6991
CTR vs. EF40	0,0152*	0,1797	0,6991
CTR vs. EF80	0,0022*	0,026*	0,3939

Tabla 5. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de extracto fenólico (EF) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar, normalizados respecto al control. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de EF; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; EF1-EF80: células expuestas a concentraciones crecientes de EF (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

1.3 DL-3,4-dihidroxifenil glicol

En lo que respecta al efecto del DHFG sobre la viabilidad celular, los resultados de la técnica de LIVE/DEAD revelaron la misma tendencia que se describió para el EF. En concreto, se observó que todas las concentraciones de DHFG inferiores a 80 µg/mL eran seguras para los queratinocitos en los tres tiempos experimentales, no existiendo diferencias significativas con respecto al CTR. Sin embargo, DHFG80 resultó en una disminución significativa del porcentaje de viabilidad celular, en comparación con el grupo CTR a las 24, 48 y 72 horas del análisis, especialmente, cuando los queratinocitos se cultivaron en presencia del compuesto durante 72 horas (Figura 16 y Figura 17A y Tabla 6).

Cuando se analizó la viabilidad celular mediante cuantificación de ADN, se observó de nuevo que las concentraciones menores de DHFG se asociaron a niveles de viabilidad celular similares a los del CTR. Por el contrario, las condiciones DHFG40 y DHFG80 se asociaron a una reducción significativa del porcentaje de células viables en cada uno de los tiempos analizados, en comparación con el CTR (Figura 17B y Tabla 7).

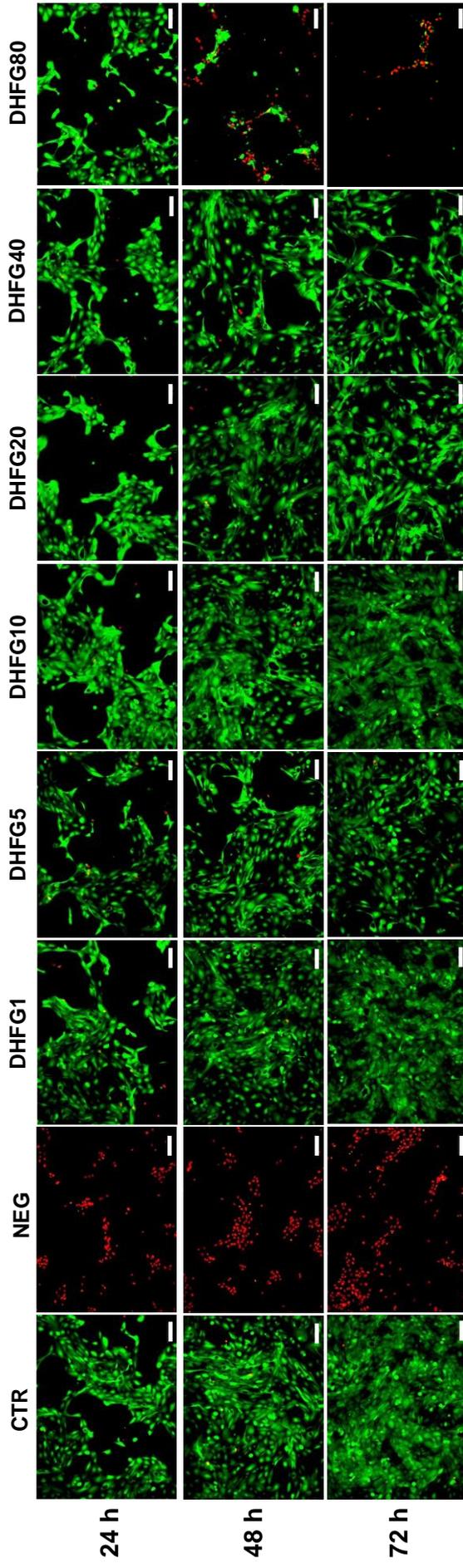


Figura 16. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de DL-3,4-dihidroxiifenil glicol (DHFG) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin DHFG. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. Las células vivas se marcan en color verde y las células muertas, en color rojo. La barra de escala corresponde a 100 μm .

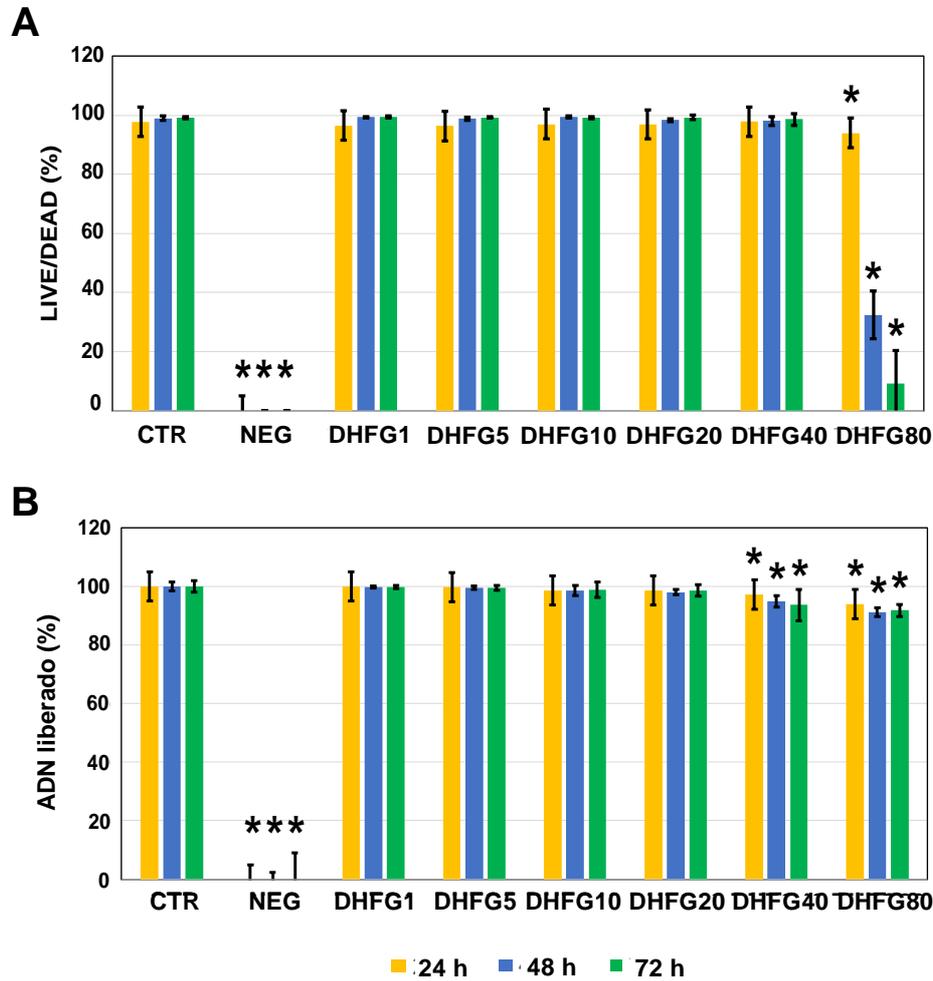


Figura 17. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin DHFG. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. A: Cuantificación de las células vivas y muertas analizadas mediante la técnica de LIVE/DEAD. B: Cuantificación del ADN liberado al medio por las células. Los valores de ADN fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

LIVE/DEAD (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	97,76±1,39	99±0,66	99,1±0,36
NEG	0±0	0±0	0±0
DHFG1	96,42±1,66	99,3±0,29	99,48±0,40
DHFG5	96,32±0,60	98,84±0,55	99,19±0,28
DHFG10	96,93±1,53	99,35±0,30	99,15±0,48
DHFG20	96,88±1,09	98,31±0,51	99,2±0,74
DHFG40	97,85±0,92	98,06±1,58	98,54±1,92
DHFG80	93,97±1,98	32,33±8,03	9,09±11,29
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. DHFG1	0,1797	0,6991	0,0931
CTR vs. DHFG5	0,0931	0,6991	0,6991
CTR vs. DHFG10	0,3939	0,3939	0,9372
CTR vs. DHFG20	0,2403	0,1320	0,8182
CTR vs. DHFG40	0,9372	0,4848	0,5887
CTR vs. DHFG80	0,0087*	0,0022*	0,0022*

Tabla 6. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) mediante la técnica de LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de DHFG; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; DHFG1-DHFG80: células expuestas a concentraciones crecientes de DHFG (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ADN LIBERADO (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±0,97	100±1,43	100±1,97
NEG	0±2,89	0±2,47	0±9,12
DHFG1	100±0	99,97±0,07	99,79±0,52
DHFG5	100,12±0,23	99,99±0,44	99,55±0,76
DHFG10	99±1,03	99,33±1,69	98,94±2,60
DHFG20	99,17±0,39	98,66±0,89	98,63±1,94
DHFG40	97,73±0,85	95,61±1,96	93,71±5,39
DHFG80	94,36±1,11	91,86±1,45	91,81±2,02
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. DHFG1	0,9372	0,3939	0,3095
CTR vs. DHFG5	0,8182	0,5887	0,2403
CTR vs. DHFG10	0,1320	0,3939	0,2403
CTR vs. DHFG20	0,1320	0,0931	0,1797
CTR vs. DHFG40	0,0022*	0,0022*	0,0087*
CTR vs. DHFG80	0,0022*	0,0022*	0,0022*

Tabla 7. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar, normalizados respecto al control. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de DHFG; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; DHFG1-DHFG80: células expuestas a concentraciones crecientes de DHFG (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

1.4 Oleuropeína

Por último, se analizó si la OLP producía efecto citotóxico sobre las células mantenidas en cultivo. Cuando se aplicó la técnica de LIVE/DEAD, se demostró la ausencia de cambios significativos en la viabilidad celular, en cualquiera de las concentraciones analizadas, y en cualquiera de los tiempos de estudio, con respecto al grupo CTR (Figura 18 y Figura 19A y Tabla 8).

No obstante, el análisis de viabilidad mediante cuantificación de ADN reveló una reducción significativa del porcentaje de células viables en el grupo OLP40 correspondiente a las 24 horas y en el grupo OLP80 a las 24 y 48 horas en comparación con el CTR (Figura 19B y Tabla 9).

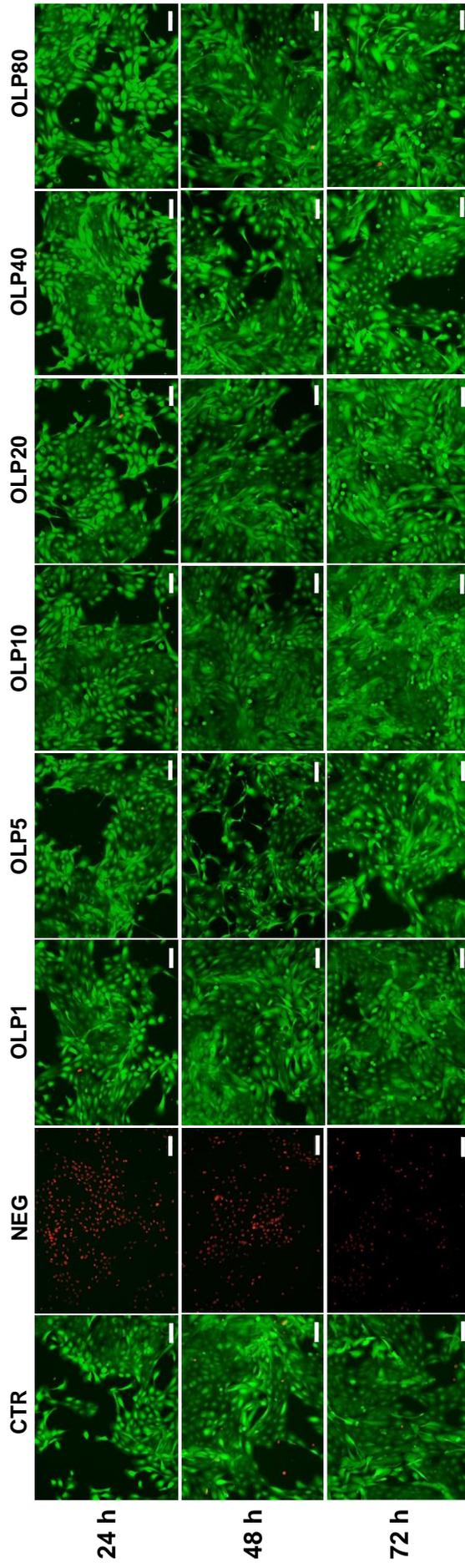


Figura 18. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica de LIVE/DEAD de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de oleuropeína (OLP) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin OLP. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. Las células vivas se marcan en color verde y las células muertas, en color rojo. La barra de escala corresponde a 100 μm .

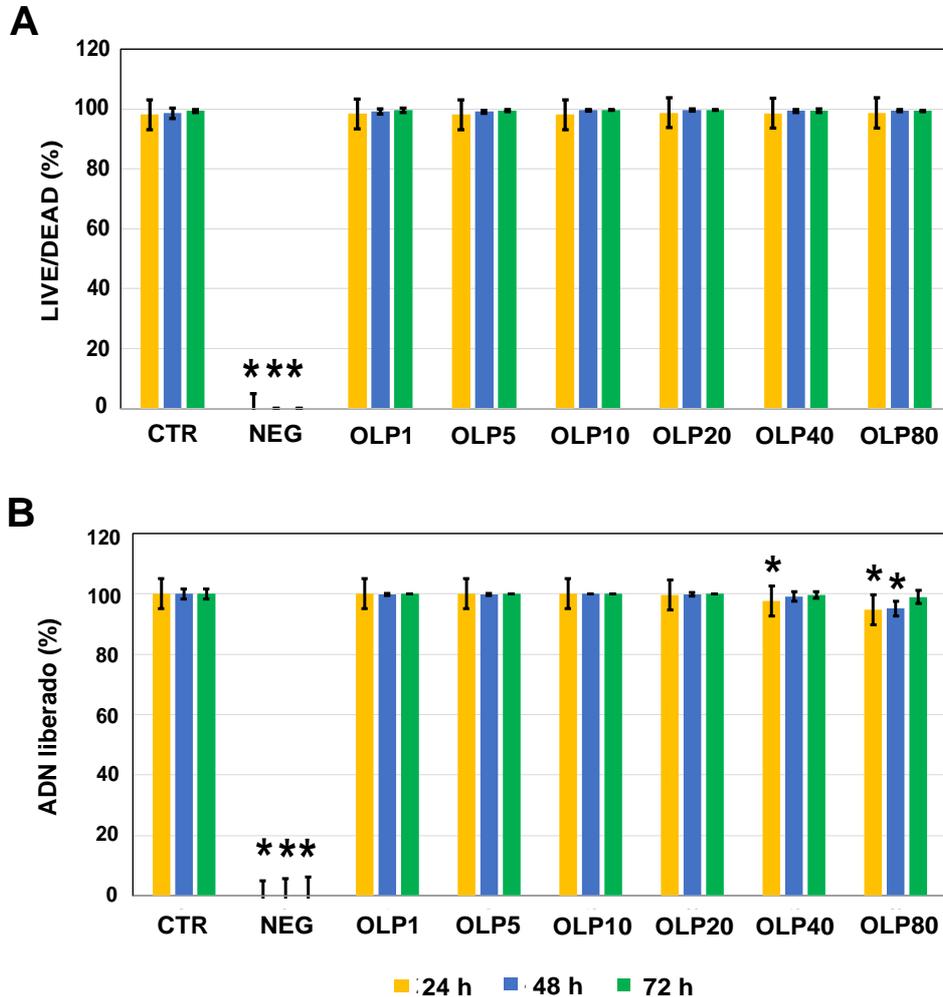


Figura 19. Análisis de la viabilidad celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de oleuropeína (OLP) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin OLP. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. A: Cuantificación de las células vivas y muertas mediante la técnica de LIVE/DEAD. B: Cuantificación del ADN liberado al medio por las células. Los valores de ADN fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

LIVE/DEAD (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	98,12±1,10	98,57±1,65	99,28±0,40
NEG	0±0	0±0	0±0
OLP1	98,34±0,89	99,18±0,85	99,53±0,69
OLP5	98,13±0,54	99,13±0,49	99,45±0,41
OLP10	98,06±1,14	99,54±0,23	99,67±0,16
OLP20	98,78±1,13	99,61±0,44	99,69±0,12
OLP40	98,5±0,92	99,29±0,57	99,45±0,70
OLP80	98,67±0,82	99,37±0,44	99,33±0,31
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP1	0,6991	0,5887	0,1797
CTR vs. OLP5	0,8182	0,9372	0,3939
CTR vs. OLP10	0,8182	0,1797	0,0931
CTR vs. OLP20	0,2403	0,0931	0,0931
CTR vs. OLP40	0,6991	0,5887	0,4848
CTR vs. OLP80	0,3939	0,5887	0,9372

Tabla 8. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células vivas en presencia de oleuropeína (OLP) mediante la técnica de LIVE/DEAD en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de OLP; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; OLP1-OLP80: células expuestas a concentraciones crecientes de OLP (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ADN LIBERADO (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±1,89	100±1,72	100±1,65
NEG	0±5,50	0±5,66	0±6,26
OLP1	100±0	99,83±0,41	100±0
OLP5	100±0	99,83±0,42	100±0
OLP10	100±0	100±0	100±0
OLP20	99,62±0,49	99,75±0,62	100±0
OLP40	97,69±1,58	99,07±1,52	99,55±1,09
OLP80	94,81±1,74	95,14±2,38	98,97±2,11
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP1	0,3939	0,3095	0,3939
CTR vs. OLP5	0,3939	0,3095	0,3939
CTR vs. OLP10	0,3939	0,3939	0,3939
CTR vs. OLP20	0,9372	0,3095	0,3939
CTR vs. OLP40	0,0411*	0,1320	0,3095
CTR vs. OLP80	0,0022*	0,0043*	0,1797

Tabla 9. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de ADN liberado en presencia de oleuropeína (OLP) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células vivas expresados como media y desviación estándar, normalizados respecto al control. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de OLP; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; OLP1-OLP80: células expuestas a concentraciones crecientes de OLP (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

2. Análisis del efecto inductor de la proliferación celular de los diferentes componentes bioactivos del aceite de oliva virgen sobre queratinocitos de la piel humana mantenidos en cultivos previamente establecidos

Para el análisis de proliferación celular, los queratinocitos de la piel humana mantenidos en cultivo se analizaron utilizando dos métodos cuantitativos, tanto a las 24 horas, como a las 48 y 72 horas de cultivo. El primero de ellos, consistió en contar las células existentes en el cultivo tras cada tiempo de cultivo, utilizando para ello, citometría de flujo. El segundo, en determinar la actividad metabólica de las células, utilizando la técnica WST-1. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los componentes bioactivos analizados en la presente Tesis Doctoral (AM, EF, DHFG y OLP).

2.1 Ácido maslínico

En primer lugar, se evaluó el efecto pro-proliferativo del AM aplicado a diferentes concentraciones sobre cultivos de queratinocitos humanos. Cuando se cuantificó el número de células existentes en cada una de las condiciones de estudio utilizando citometría de flujo, se identificaron numerosas diferencias respecto al grupo CTR (Figura 20A y Tabla 10). En concreto, los resultados revelaron que la aplicación de AM durante 24 horas se asoció a un incremento significativo del número de células en todas las concentraciones (5 a 80 $\mu\text{g/mL}$), excepto AM1, respecto del grupo CTR. A las 48 horas, todas las concentraciones excepto AM80 (1 a 40 $\mu\text{g/mL}$) eran capaces de incrementar significativamente el número de células respecto al CTR. En cambio, a las 72 horas, se producía un aumento significativo del número de células únicamente cuando las células eran expuestas a 5 $\mu\text{g/mL}$ de AM (AM5). Por el contrario, se observó una reducción del número de células en cultivo de forma significativa en presencia de AM80, en este tiempo de estudio.

El análisis del posible efecto pro-proliferativo del AM sobre queratinocitos humanos se llevó a cabo, por otro lado, utilizando ensayos metabólicos WST-1. Como se observa en la Figura 20B y

Tabla 11, los resultados demuestran un incremento significativo de la proliferación y actividad metabólica celular en todas las concentraciones y tiempos de estudio, respecto al grupo CTR, excepto en AM1 y AM10 correspondientes a las 24 horas de cultivo.

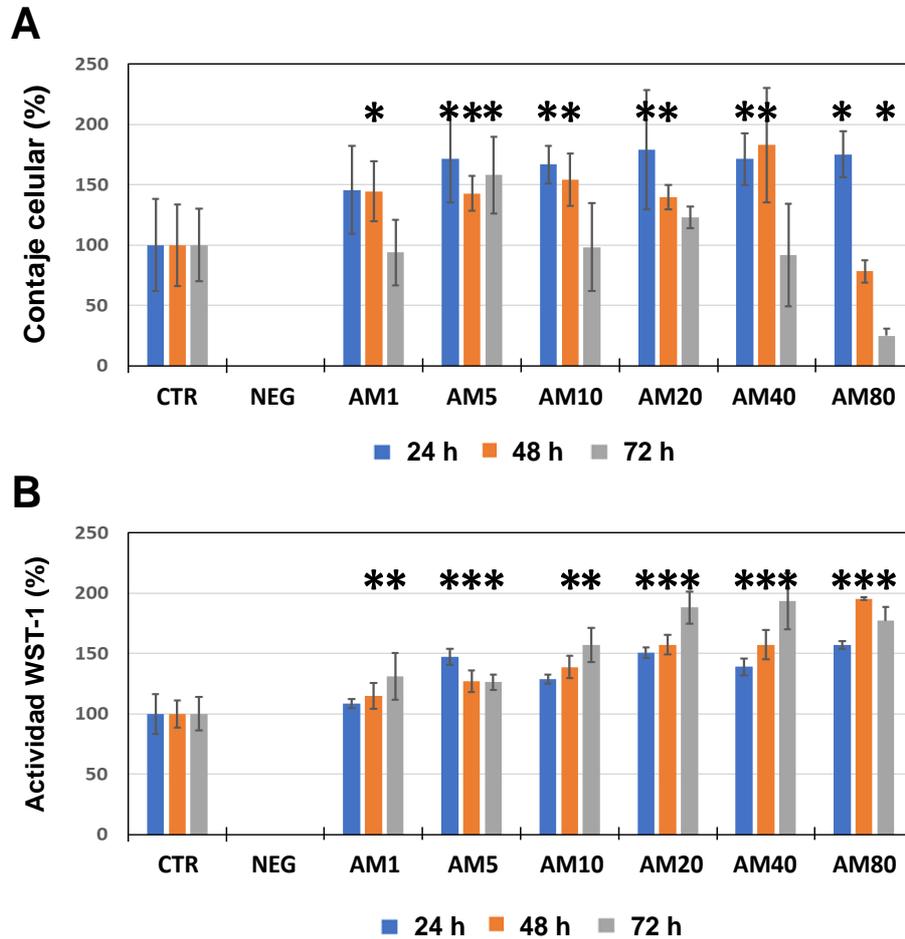


Figura 20. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de ácido maslínico (AM) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B). Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin AM. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. En ambos casos, el grupo CTR y el NEG fueron considerados como el 100% y el 0%, respectivamente. Todos los valores fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

CONTAJE CELULAR (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±38,19	100±33,75	100±29,99
NEG	0±0	0±0	0±0
AM1	145,71±36,52	144,59±24,85	93,94±27,29
AM5	171,75±36,31	142,77±14,37	158,01±31,86
AM10	166,71±15,70	154,02±21,64	98,2±36,37
AM20	179,1±49,40	139,73±9,88	123,21±8,90
AM40	171,42±21,29	182,91±47,53	91,8±42,56
AM80	175,22±19,14	78,34±9,12	25,01±5,74
CTR vs. NEG	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
CTR vs. AM1	0,0542	0,0250*	0,7488
CTR vs. AM5	0,0250*	0,0176*	0,0163*
CTR vs. AM10	0,0039*	0,0104*	0,8728
CTR vs. AM20	0,0250*	0,0065*	0,1093
CTR vs. AM40	0,0039*	0,0250*	0,5218
CTR vs. AM80	0,0039*	0,1495	0,0039*

Tabla 10. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de ácido maslínico (AM) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células normalizado respecto a los controles (considerados como 100% de cantidad de células) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de AM; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; AM1-AM80: células expuestas a concentraciones crecientes de AM (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ACTIVIDAD WST-1 (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±16,58	100±11,41	100±13,81
NEG	0±0	0±0	0±0
AM1	108,36±3,81	114,97±10,59	131,04±19,52
AM5	147,3±6,52	126,96±9,09	126,37±6,32
AM10	128,72±3,89	138,65±9,25	157,34±14,15
AM20	150,55±4,26	157,34±7,91	188,14±13,28
AM40	139,08±6,96	157,3±12,12	193,25±22,94
AM80	157,08±3,00	195,5±1,18	177,09±11,71
CTR vs. NEG	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
CTR vs. AM1	0,0547	0,0374*	0,0285*
CTR vs. AM5	0,0039*	0,0039*	0,0062*
CTR vs. AM10	0,0547	0,0039*	0,0062*
CTR vs. AM20	0,0039*	0,0039*	0,0062*
CTR vs. AM40	0,0104*	0,0039*	0,0062*
CTR vs. AM80	0,0039*	0,0039*	0,0062*

Tabla 11. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de ácido maslínico (AM) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de actividad metabólica normalizada respecto a los controles (considerados como 100% de actividad WST-1) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de AM; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; AM1-AM80: células expuestas a concentraciones crecientes de AM (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

2.2 Extracto fenólico

Cuando se determinó la proliferación de células cultivadas en presencia de EF mediante citometría de flujo, se encontraron varias diferencias significativas respecto al grupo CTR (Figura 21A y Tabla 12). Por un lado, se observó un aumento significativo del número de células cuando se utilizó EF a una concentración de 10 µg/mL (grupo EF10) durante 48 y 72 horas. Por otro lado, la utilización de EF40 durante 24 horas o de EF80 a las 24, 48 y 72 horas resultó en el efecto contrario, encontrándose una disminución significativa del número celular, respecto al CTR.

A su vez, el análisis de proliferación mediante la técnica del WST-1 mostró que las concentraciones de 1 y 10 µg/mL (grupos EF1 y EF10) a las 72 horas eran capaces de inducir un aumento estadísticamente significativo de la proliferación de los queratinocitos si se comparaban con el CTR. Por el contrario, la concentración más elevada de EF (80 µg/mL) se asoció a una disminución significativa de la proliferación y actividad metabólica celular, en los tres tiempos analizados (Figura 21B y Tabla 13).

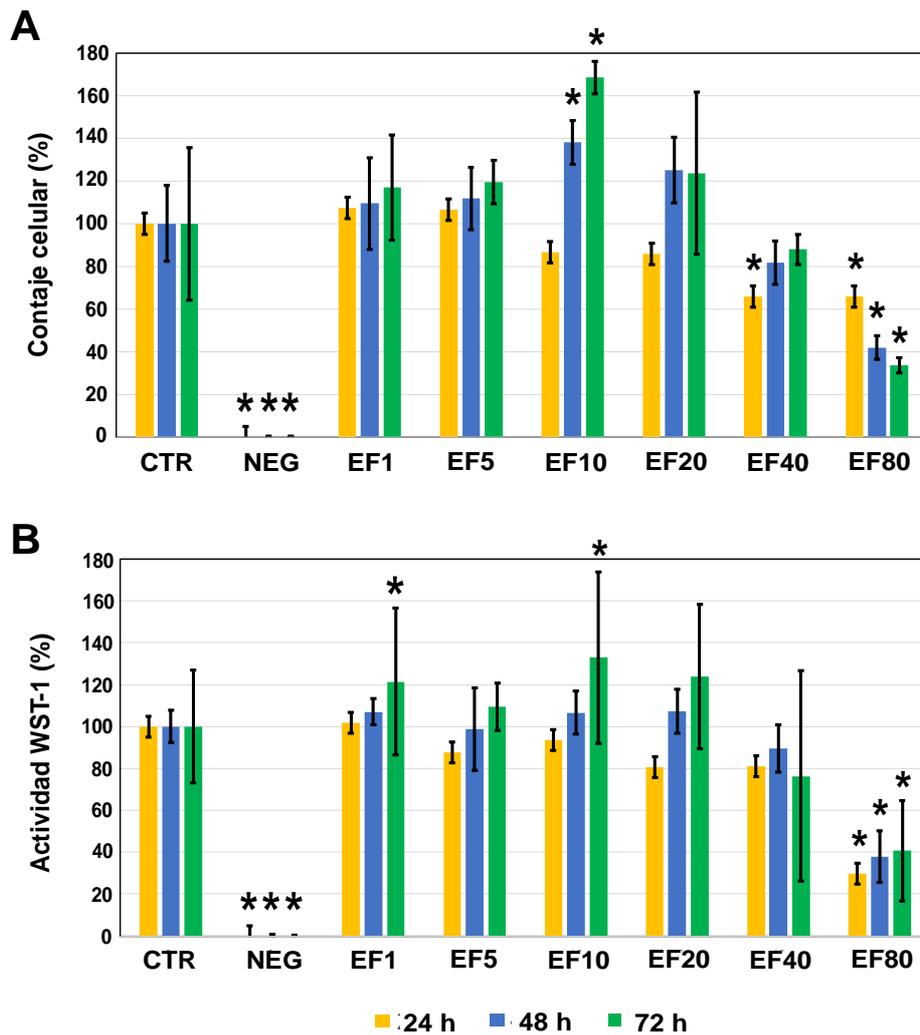


Figura 21. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto fenólico (EF) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B). Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin EF. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. En ambos casos, el grupo CTR y el NEG fueron considerados como el 100% y el 0%, respectivamente. Todos los valores fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

CONTAJE CELULAR (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±32,67	100±17,81	100±35,68
NEG	0±1,01	0±0,51	0±0,50
EF1	107,24±15,10	109,43±19,14	116,87±19,01
EF5	106,72±12,39	111,82±14,63	119,54±10,23
EF10	86,77±8,46	138,14±10,22	168,46±7,59
EF20	85,75±9,81	125,1±15,43	123,58±38,08
EF40	65,84±13,30	81,86±10,19	87,89±7,18
EF80	65,8±9,25	41,91±5,55	33,6±3,56
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF1	0,5887	0,4848	0,5887
CTR vs. EF5	0,6991	0,3939	0,3939
CTR vs. EF10	0,2403	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF20	0,3095	0,0649	0,6991
CTR vs. EF40	0,0411*	0,0649	0,0649
CTR vs. EF80	0,0411*	0,0022*	0,026*

Tabla 12. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de extracto fenólico (EF) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células normalizado respecto a los controles (considerados como 100% de cantidad de células) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de EF; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; EF1-EF80: células expuestas a concentraciones crecientes de EF (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ACTIVIDAD WST-1 (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±36,45	100±17,81	100±26,90
NEG	0±4,84	0±0,51	0±0,29
EF1	101,86±21,92	107,09±6,43	136,81±28,04
EF5	87,83±4,08	98,88±17,63	109,51±11,17
EF10	93,71±5,21	106,71±10,34	133,01±40,94
EF20	80,71±12,92	107,26±10,52	124±34,45
EF40	80,92±14,93	89,49±11,21	76,37±50,30
EF80	29,81±6,27	37,84±12,27	40,74±24,03
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF1	0,6991	0,1320	0,0411*
CTR vs. EF5	0,9372	0,9372	0,6991
CTR vs. EF10	0,9372	0,3095	0,0411*
CTR vs. EF20	0,6991	0,1797	0,4848
CTR vs. EF40	0,3939	0,0649	0,4848
CTR vs. EF80	0,0022*	0,0022*	0,0152*

Tabla 13. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de extracto fenólico (EF) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de actividad metabólica normalizada respecto a los controles (considerados como 100% de actividad WST-1) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de EF; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; EF1-EF80: células expuestas a concentraciones crecientes de EF (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

2.3 DL-3,4-dihidroxifenil glicol

En lo que respecta al análisis del efecto pro-proliferativo del DHFG, los resultados del conteo celular utilizando citometría de flujo revelaron que, en general, la mayoría de las condiciones experimentales evaluadas en la presente Tesis Doctoral no lograron aumentar de forma significativa la proliferación celular (Figura 22A y Tabla 14). De hecho, únicamente se encontró un aumento significativo respecto al CTR en los grupos DHFG5 a las 24 horas y DHFG1 a las 48 horas. Además, se pudo comprobar un efecto contrario en determinados grupos de estudio, existiendo una disminución significativa del número de células cultivadas en presencia de DHFG20 a las 48 horas, DHFG40 a las 48 y 72 horas y DHFG80 a los tres tiempos de estudio.

Asimismo, el análisis de proliferación celular utilizando el ensayo metabólico WST-1 (Figura 22B y Tabla 15) reveló que únicamente uno de los grupos de estudio fue capaz de incrementar la proliferación celular (DHFG20 a las 72 horas), existiendo una reducción significativa de este parámetro en los grupos DHFG5 a las 72 horas, DHFG20 a las 24 horas, DHFG40 a las 72 horas y DHFG80 a los tres tiempos analizados.

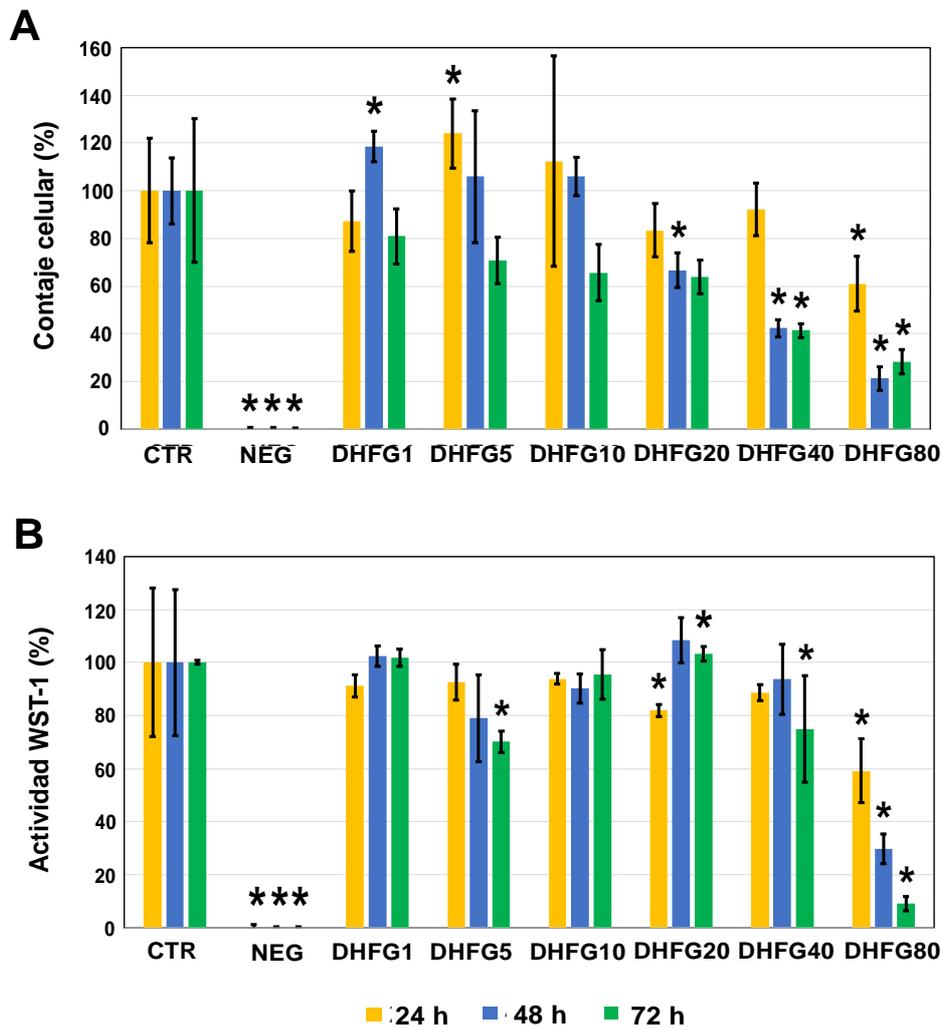


Figura 22. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B). Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin DHFG. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. En ambos casos, el grupo CTR y el NEG fueron considerados como el 100% y el 0%, respectivamente. Todos los valores fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

CONTAJE CELULAR (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±22,03	100±8,84	100±30,19
NEG	0±0,71	0±0,78	0±0,47
DHFG1	87,17±12,67	118,59±4,99	80,82±11,49
DHFG5	124,03±11,23	105,9±27,70	70,72±9,71
DHFG10	112,36±44,11	105,95±8,19	65,52±11,79
DHFG20	83,38±11,26	66,57±7,18	63,83±7,10
DHFG40	92,04±11,06	42,24±3,62	41,3±3,00
DHFG80	60,95±11,65	21,24±4,97	28,17±5,18
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. DHFG1	0,3939	0,0022*	0,3939
CTR vs. DHFG5	0,0411*	0,6991	0,1797
CTR vs. DHFG10	0,8182	0,3095	0,0931
CTR vs. DHFG20	0,1797	0,0022*	0,1320
CTR vs. DHFG40	0,5887	0,0022*	0,0022*
CTR vs. DHFG80	0,0043*	0,0022*	0,0022*

Tabla 14. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células normalizado respecto a los controles (considerados como 100% de cantidad de células) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de DHFG; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; DHFG1-DHFG80: células expuestas a concentraciones crecientes de DHFG (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ACTIVIDAD WST-1 (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±27,95	100±27,57	100±0,62
NEG	0±1,27	0±0,44	0±0,29
DHFG1	91,12±4,21	102,4±3,97	101,86±3,37
DHFG5	92,61±6,69	79±16,32	70,1±3,92
DHFG10	93,81±2,01	90,24±5,40	95,5±9,24
DHFG20	81,9±2,37	108,53±8,44	105,54±2,30
DHFG40	88,63±2,93	93,69±13,14	74,91±20,13
DHFG80	59,15±12,14	29,84±5,58	9,11±2,74
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. DHFG1	0,6991	0,0931	0,0649
CTR vs. DHFG5	0,5887	0,1320	0,0022*
CTR vs. DHFG10	0,3095	0,6991	0,1320
CTR vs. DHFG20	0,0022*	0,1797	0,0022*
CTR vs. DHFG40	0,9372	0,9372	0,0022*
CTR vs. DHFG80	0,0022*	0,0022*	0,0022*

Tabla 15. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de DL-3,4-dihidroxifenil glicol (DHFG) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de actividad metabólica normalizada respecto a los controles (considerados como 100% de actividad WST-1) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de DHFG; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; DHFG1-DHFG80: células expuestas a concentraciones crecientes de DHFG (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

2.4 Oleuropeína

Cuando se analizó la OLP, los resultados obtenidos mediante cuantificación celular por citometría de flujo mostraron un incremento significativo en el número de células correspondientes al grupo OLP5, a las 24, 48 y 72 horas. De igual forma, todas las concentraciones analizadas lograron asimismo incrementar significativamente el número de células, en comparación con el grupo CTR, a las 72 horas. Sin embargo, los grupos de estudio OLP10, OLP40 y OLP80 resultaron en una disminución significativa del conteo celular, a las 48 horas del estudio (Figura 23A y Tabla 16).

Por otro lado, el análisis de proliferación celular de los diferentes grupos OLP utilizando ensayos metabólicos WST-1 mostró un incremento significativo en todos los grupos de estudio, respecto al grupo CTR (Figura 23B y Tabla 17).

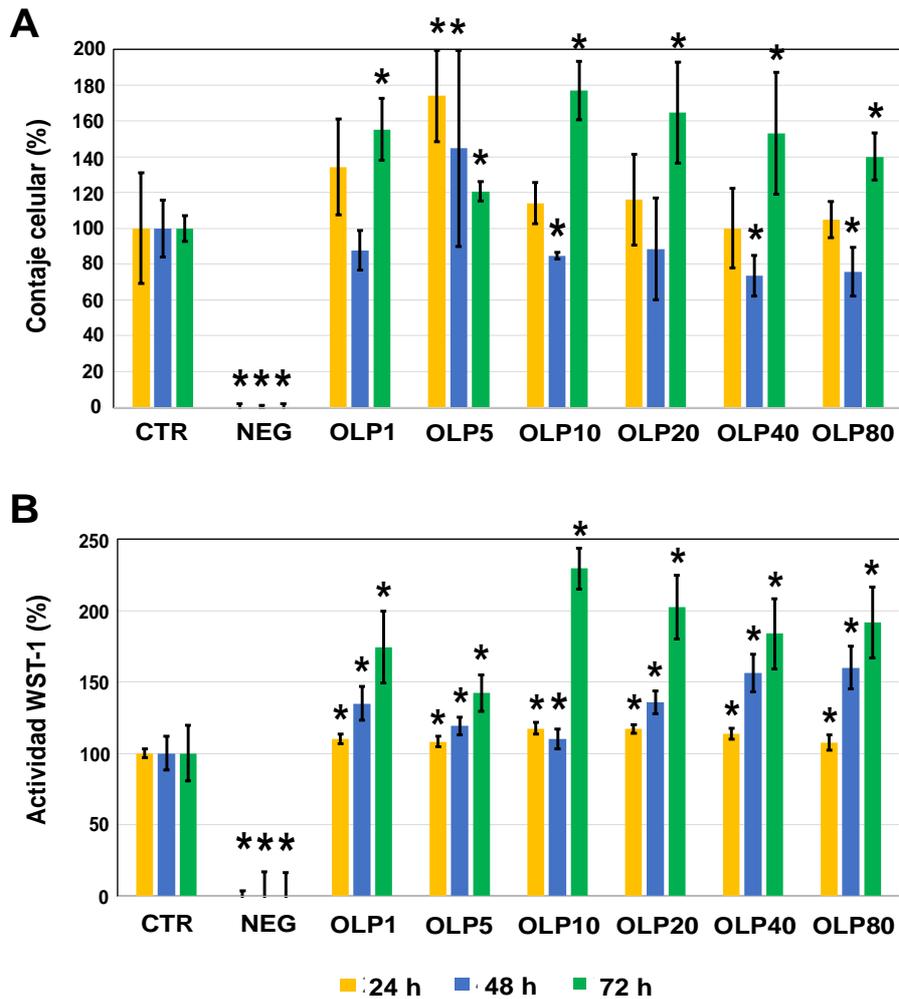


Figura 23. Análisis de la proliferación celular de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de diferentes concentraciones de oleuropeína (OLP) (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas mediante cuantificación celular por citometría de flujo (A) y mediante la técnica WST-1 (B). Como control positivo (CTR), se emplearon células que fueron cultivadas en medio sin OLP. Como control negativo (NEG), se emplearon células que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%. En ambos casos, el grupo CTR y el NEG fueron considerados como el 100% y el 0%, respectivamente. Todos los valores fueron normalizados con respecto al grupo CTR. Las desviaciones estándar están representadas mediante barras de error y los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTR.

CONTAJE CELULAR (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±30,96	100±12,32	100±7,26
NEG	0±1,94	0±1,29	0±2,18
OLP1	134,28±26,77	87,65±11,10	155,28±17,43
OLP5	173,92±25,41	144,65±54,66	120,64±5,31
OLP10	114,12±11,35	84,54±1,39	177,13±16,26
OLP20	116,03±25,46	88,52±28,30	164,74±28,21
OLP40	100,06±22,15	73,45±11,29	153,05±33,89
OLP80	104,75±10,04	75,75±12,16	140,06±13,09
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP1	0,1320	0,1320	0,0022*
CTR vs. OLP5	0,0022*	0,0087*	0,0022*
CTR vs. OLP10	0,5887	0,0043*	0,0022*
CTR vs. OLP20	0,3939	0,6991	0,0022*
CTR vs. OLP40	0,9372	0,0022*	0,0411*
CTR vs. OLP80	0,8182	0,0043*	0,0022*

Tabla 16. Valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación mediante citometría de flujo de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de oleuropeína (OLP) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células normalizado respecto a los controles (considerados como 100% de cantidad de células) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de OLP; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; OLP1-OLP80: células expuestas a concentraciones crecientes de OLP (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

ACTIVIDAD WST-1 (%)	24 h	48 h	72 h
CTR	100±3,26	100±10,68	100±19,43
NEG	0±3,42	0±17,05	0±16,55
OLP1	109,95±3,38	134,84±11,86	174,25±25,01
OLP5	108,21±3,32	119,26±6,15	142,21±12,72
OLP10	117,32±4,14	110,07±6,22	229,28±14,23
OLP20	116,98±3,07	135,74±8,00	202,43±22,29
OLP40	113,67±3,81	156,11±13,08	183,71±24,66
OLP80	107,49±5,28	159,83±14,93	191,63±25,02
CTR vs. NEG	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP1	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP5	0,0152*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP10	0,0022*	0,0411*	0,0022*
CTR vs. OLP20	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP40	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP80	0,0087*	0,0022*	0,0022*

Tabla 17. Valores obtenidos para la cuantificación de la actividad WST-1 de queratinocitos humanos inmortalizados cultivados en presencia de oleuropeína (OLP) en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de actividad metabólica normalizada respecto a los controles (considerados como 100% de actividad WST-1) y expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de células cultivadas en ausencia de OLP; NEG: células muertas que fueron tratadas con tritón X-100 al 2%; OLP1-OLP80: células expuestas a concentraciones crecientes de OLP (1, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL).

3. Análisis de expresión génica de queratinocitos de la piel humana mantenidos en cultivo con los diferentes compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen

Una vez llevados a cabo los estudios de viabilidad y proliferación celular en los diferentes grupos de estudio, se procedió a evaluar el posible efecto de los diferentes compuestos bioactivos sobre la expresión génica de los queratinocitos de piel humana mantenidos en cultivo. Para ello, se seleccionaron los grupos experimentales que mostraron los resultados más prometedores en los análisis descritos previamente, esto es, las menores concentraciones que mostraron un incremento significativo de la proliferación celular, sin alterar la viabilidad celular.

A este respecto, se seleccionaron, de acuerdo con los resultados descritos en los puntos 1 y 2 de los Resultados de esta Tesis Doctoral, los siguientes grupos experimentales, para su estudio mediante qPCR:

- AM5
- EF10
- OLP5

En el caso del DHFG, se consideró que ninguna de las condiciones experimentales fue capaz de inducir significativamente la proliferación, sin alterar la viabilidad celular.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los tres grupos seleccionados, en comparación con el grupo CTR.

3.1 Ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL (AM5)

El análisis de expresión de genes relacionados con diversas funciones relevantes en la fisiología del queratinocito mediante qPCR mostró 5 genes sobreexpresados en el grupo AM5, en comparación con el grupo CTR cultivado en ausencia de AM (Tabla 18). El primero de estos genes fue *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*), gen relacionado con la proliferación celular, cuyos niveles de expresión superaron en un 80% los que se encontraron en el grupo CTR. En segundo lugar, de los tres genes relacionados con diferenciación epitelial evaluados en la presente Tesis Doctoral (*BGN*, *FLG* y *IVL*), se encontró que sólo uno de ellos (*BGN*) estaba significativamente sobreexpresado en el grupo AM5, existiendo un incremento del 70% en la expresión de este gen, respecto al CTR. Respecto a los 5 genes relacionados con membrana basal que se analizaron, se encontró sobreexpresión de uno de ellos (*COL4A1*), el cual alcanzó niveles superiores

al 100% de incremento respecto al CTR. De los 9 genes relacionados con el desarrollo de uniones celulares que se evaluaron, se encontró que *PPL* (periplaquina) estaba sobreexpresado más del 60% respecto al CTR. Finalmente, el análisis de 9 genes que codifican para diferentes citoqueratinas mostró sobreexpresión de *KRT3* (citoqueratina 3) en el grupo AM5, con niveles de expresión que triplicaban los del grupo CTR. Ninguno de los genes analizados en el grupo AM5 se encontró significativamente disminuido respecto del grupo CTR.

Tipo de gen	Abreviación	Nombre del gen	Expresión relativa en AM5	Expresión en AM5
Proliferación	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	1,87	Sobreexpresado (p=0,0280)
Diferenciación epitelial	BGN	Biglican	1,70	Sobreexpresado (p=0,0280)
	FLG	Filagrina	1,14	Sin cambio (p > 0,05)
	IVL	Involucrina	1,16	Sin cambio (p > 0,05)
Membrana basal	COL4A1	Cadena alfa 1 del colágeno tipo IV	2,05	Sobreexpresado (p=0,0280)
	LAMA1	Subunidad alfa 1 de la laminina	0,85	Sin cambio (p > 0,05)
	LAMA3	Subunidad alfa 3 de la laminina	1,34	Sin cambio (p > 0,05)
	LAMB1	Subunidad beta 1 de la laminina	1,48	Sin cambio (p > 0,05)
	LAMC1	Subunidad gamma 1 de la laminina	1,16	Sin cambio (p > 0,05)
Uniones intercelulares	DSP	Desmoplaquina	0,93	Sin cambio (p > 0,05)
	FN1	Fibronectina 1	0,84	Sin cambio (p > 0,05)
	GJA1	Proteína de unión GAP Alfa 1	1,23	Sin cambio (p > 0,05)
	GJA4	Proteína de unión GAP Alfa 4	0,97	Sin cambio (p > 0,05)
	JUP	Junction Plakoglobin	1,44	Sin cambio (p > 0,05)
	PKP1	Placofilina 1	1,06	Sin cambio (p > 0,05)
	PPL	Periplaquina	1,66	Sobreexpresado (p=0,0280)
	TJP1	Proteína de unión estrecha 1	1,16	Sin cambio (p > 0,05)
	TJP2	Proteína de unión estrecha 2	1,04	Sin cambio (p > 0,05)
Citoqueratinas	KRT3	Citoqueratina 3	3,03	Sobreexpresado (p=0,0280)
	KRT5	Citoqueratina 5	1,40	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT6A	Citoqueratina 6A	1,05	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT7	Citoqueratina 7	1,03	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT8	Citoqueratina 8	0,94	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT10	Citoqueratina 10	1,03	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT13	Citoqueratina 13	1,47	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT16	Citoqueratina 16	1,06	Sin cambio (p > 0,05)
	KRT19	Citoqueratina 19	1,42	Sin cambio (p > 0,05)

Tabla 18. Análisis de expresión génica de queratinocitos humanos cultivados en ausencia de factores bioactivos (CTR) y en presencia de 5 µg/mL de ácido maslínico (AM5). Para cada gen, se muestra la media de la expresión relativa en el grupo AM5 respecto al CTR, así como el valor p de significación estadística para la comparación de ambos grupos, y si dicho gen se encontraba sobreexpresado, disminuido o sin cambio en el grupo AM5.

3.2 Extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL (EF10)

Los análisis de expresión génica en queratinocitos humanos cultivados en presencia de 10 µg/mL de extracto fenólico (grupo EF10) mostraron sobreexpresión de 3 genes y disminución de la expresión de 6 genes (Tabla 19). En primer lugar, se encontró que los dos genes relacionados con proliferación celular evaluados en este grupo de estudio, se encontraron significativamente sobreexpresados en EF10, en comparación con el grupo CTR, siendo la expresión de ambos genes aproximadamente un 70% superior en EF10 que en el grupo CTR. Por otra parte, de los tres genes relacionados con diferenciación epitelial evaluados en este grupo, los resultados mostraron la sobreexpresión de *BGN* (bligican) (con más del 90% de incremento respecto al CTR) y la disminución de *FLG* (filagrina) (con una expresión de aproximadamente la mitad respecto al CTR). Ninguno de los 5 genes relacionados con la síntesis de una membrana basal mostró diferencias significativas con el CTR. Respecto a los 9 genes implicados en uniones intercelulares, sólo se encontraron cambios en los genes *JUP* (*junction plakoglobin*) y *PKP1* (placofilina 1), con una reducción significativa de ambos, siendo la expresión en EF10 cercana al 60% de aquella encontrada en el grupo CTR. Por último, el análisis de 11 genes relacionados con citoqueratinas demostró que la expresión de 3 de ellos (KRT1, KRT3 y KRT10) resultó significativamente disminuida en el grupo EF10, siendo ésta cercana al 30-40% de la del CTR.

Tipo de gen	Abreviación	Nombre del gen	Expresión relativa en EF10	Expresión en EF10
Proliferación	<i>MKI67</i>	Marcador de proliferación KI67	1,79	Sobreexpresado (p=0.0411)
	<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen	1,69	Sobreexpresado (p=0.0152)
Diferenciación epitelial	<i>BGN</i>	Biglican	1,91	Sobreexpresado (p=0.0411)
	<i>FLG</i>	Filagrina	0,55	Disminuido (p=0.0411)
	<i>IVL</i>	Involucrina	0,57	Sin cambio (p > 0,05)
Membrana basal	<i>COL4A1</i>	Cadena alfa 1 del colágeno tipo IV	1,53	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMA1</i>	Subunidad alfa 1 de la laminina	1,60	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMA3</i>	Subunidad alfa 3 de la laminina	0,71	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMB1</i>	Subunidad beta 1 de la laminina	1,65	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMC1</i>	Subunidad gamma 1 de la laminina	1,97	Sin cambio (p > 0,05)
Uniones intercelulares	<i>DSP</i>	Desmoplaquina	0,60	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>FN1</i>	Fibronectina 1	2,45	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>GJA1</i>	Proteína de unión GAP Alfa 1	1,48	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>GJA4</i>	Proteína de unión GAP Alfa 4	1,75	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>JUP</i>	Junction Plakoglobin	0,60	Disminuido (p=0.0260)
	<i>PKP1</i>	Placofilina 1	0,59	Disminuido (p=0.0411)
	<i>PPL</i>	Periplaquina	0,91	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>TJP1</i>	Proteína de unión estrecha 1	1,38	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>TJP2</i>	Proteína de unión estrecha 2	1,38	Sin cambio (p > 0,05)
Citoqueratinas	<i>KRT1</i>	Citoqueratina 1	0,37	Disminuido (p=0.0260)
	<i>KRT3</i>	Citoqueratina 3	0,43	Disminuido (p=0.0087)
	<i>KRT5</i>	Citoqueratina 5	0,64	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT6A</i>	Citoqueratina 6A	0,57	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT7</i>	Citoqueratina 7	0,95	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT8</i>	Citoqueratina 8	0,91	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT10</i>	Citoqueratina 10	0,30	Disminuido (p=0.0152)
	<i>KRT13</i>	Citoqueratina 13	0,56	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT18</i>	Citoqueratina 18	0,65	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT19</i>	Citoqueratina 19	0,93	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRTCAP2</i>	Keratin Associated Protein 2	1,43	Sin cambio (p > 0,05)

Tabla 19. Análisis de expresión génica de queratinocitos humanos cultivados en ausencia de factores bioactivos (CTR) y en presencia de 10 µg/mL de extracto fenólico (EF10). Para cada gen, se muestra la media de la expresión relativa en el grupo EF10 respecto al CTR, así como el valor p de significación estadística para la comparación de ambos grupos, y si dicho gen se encontraba sobreexpresado, disminuido o sin cambio en el grupo EF10.

3.3 Oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL (OLP5)

Cuando se evaluó el efecto de OLP utilizado a una concentración de 5 µg/mL, se encontraron 2 genes sobreexpresados y 4 genes con expresión disminuida en el grupo OLP5, comparado con el grupo CTR (Tabla 20). Por un lado, los resultados mostraron una sobreexpresión significativa del gen *PCNA* en el grupo OLP5, el cual mostraba una expresión un 50% más alta en OLP5 que en el grupo CTR. Sin embargo, el incremento de expresión del gen *MKI67* no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, el análisis de 9 genes relacionados con uniones intercelulares mostró que uno de ellos (*GJA4*) se encontraba significativamente sobreexpresado (con más del doble de expresión en OLP5 respecto al grupo CTR), mientras que otro de ellos (*JUP*) se encontraba significativamente disminuido (con una expresión inferior a la mitad en OLP5 respecto al grupo CTR). Respecto a los 11 genes de citoqueratinas analizados en esta Tesis Doctoral, 3 de ellos (*KRT8*, *KRT18* y *KRT19*) mostraron una disminución significativa en el grupo OLP5, respecto al CTR, mostrando los tres genes una expresión de aproximadamente la mitad del CTR. No se encontraron diferencias significativas en los genes relacionados con diferenciación epitelial o con componentes de la membrana basal.

Tipo de gen	Abreviación	Nombre del gen	Expresión relativa en OLP5	Expresión en OLP5
Proliferación	<i>MKI67</i>	Marcador de proliferación KI67	1,49	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen	1,50	Sobreexpresado (p=0,0260)
Diferenciación epitelial	<i>BGN</i>	Biglican	1	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>FLG</i>	Filagrina	4,99	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>IVL</i>	Involucrina	1,27	Sin cambio (p > 0,05)
Membrana basal	<i>COL4A1</i>	Cadena alfa 1 del colágeno tipo IV	0,79	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMA1</i>	Subunidad alfa 1 de la laminina	1,38	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMA3</i>	Subunidad alfa 3 de la laminina	0,67	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMB1</i>	Subunidad beta 1 de la laminina	1,38	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>LAMC1</i>	Subunidad gamma 1 de la laminina	1,24	Sin cambio (p > 0,05)
Uniones intercelulares	<i>DSP</i>	Desmoplaquina	0,92	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>FN1</i>	Fibronectina 1	1,35	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>GJA1</i>	Proteína de unión GAP Alfa 1	0,94	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>GJA4</i>	Proteína de unión GAP Alfa 4	2,61	Sobreexpresado (p=0,0022)
	<i>JUP</i>	Junction Plakoglobin	0,44	Disminuido (p=0,0260)
	<i>PKP1</i>	Placofilina 1	0,67	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>PPL</i>	Periplaquina	0,73	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>TJP1</i>	Proteína de unión estrecha 1	0,99	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>TJP2</i>	Proteína de unión estrecha 2	1,18	Sin cambio (p > 0,05)
Citoqueratinas	<i>KRT1</i>	Citoqueratina 1	2,53	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT3</i>	Citoqueratina 3	0,76	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT5</i>	Citoqueratina 5	1,01	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT6A</i>	Citoqueratina 6A	1,21	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT7</i>	Citoqueratina 7	1,23	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT8</i>	Citoqueratina 8	0,56	Disminuido (p=0,0260)
	<i>KRT10</i>	Citoqueratina 10	1,31	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT13</i>	Citoqueratina 13	0,74	Sin cambio (p > 0,05)
	<i>KRT18</i>	Citoqueratina 18	0,53	Disminuido (p=0,0043)
	<i>KRT19</i>	Citoqueratina 19	0,51	Disminuido (p=0,0152)
	<i>KRTCAP2</i>	Keratin Associated Protein 2	1,52	Sin cambio (p > 0,05)

Tabla 20. Análisis de expresión génica de queratinocitos humanos cultivados en ausencia de factores bioactivos (CTR) y en presencia de 5 µg/mL de oleuropeína (OLP5). Para cada gen, se muestra la media de la expresión relativa en el grupo OLP5 respecto al CTR, así como el valor p de significación estadística para la comparación de ambos grupos, y si dicho gen se encontraba sobreexpresado, disminuido o sin cambio en el grupo OLP5.

4. Eficacia de las condiciones seleccionadas para mejorar el establecimiento de cultivos primarios de queratinocitos a partir de biopsias de piel humana

Una vez identificadas las condiciones experimentales con mayor probabilidad de ejercer un efecto bioactivo sobre los cultivos de queratinocitos humanos (AM5, EF10 y OLP5), se procedió a analizar el potencial de dichas condiciones a la hora de optimizar los métodos actuales de cultivo de queratinocitos humanos a partir de biopsias de piel. En concreto, se evaluó el efecto de las diferentes biomoléculas sobre el porcentaje de colonias de queratinocitos obtenidas tras 21 días de cultivo, tras utilizar técnicas de digestión enzimática con tripsina de las muestras de piel humana.

Los resultados muestran que, del total de colonias de queratinocitos obtenidas en cultivos primarios establecidos a partir de biopsias de piel, el 13,61% de estas colonias pertenecían al grupo CTR, mientras que el 40,31% correspondían al grupo AM5, el 31,94%, al grupo EF10, y el 14,14%, al grupo OLP5. Cuando se normalizaron estos valores frente al CTR, se encontró que AM5 fue capaz de generar 2,96 veces más colonias que el CTR (considerado como 1), mientras que EF10 generó 2,35 colonias, y OLP5, 1,04 colonias (Figura 24). Las diferencias resultaron estadísticamente significativas para la comparación de AM5 frente a CTR ($p < 0,0001$ para el test exacto de Fisher) y de EF10 frente a CTR ($p = 0,0040$). Sin embargo, las diferencias entre OLP5 y el grupo CTR no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,9999$). Imágenes ilustrativas de algunas de las colonias de queratinocitos obtenidas en la presente Tesis Doctoral se muestran en las Figura 25 y Figura 26.

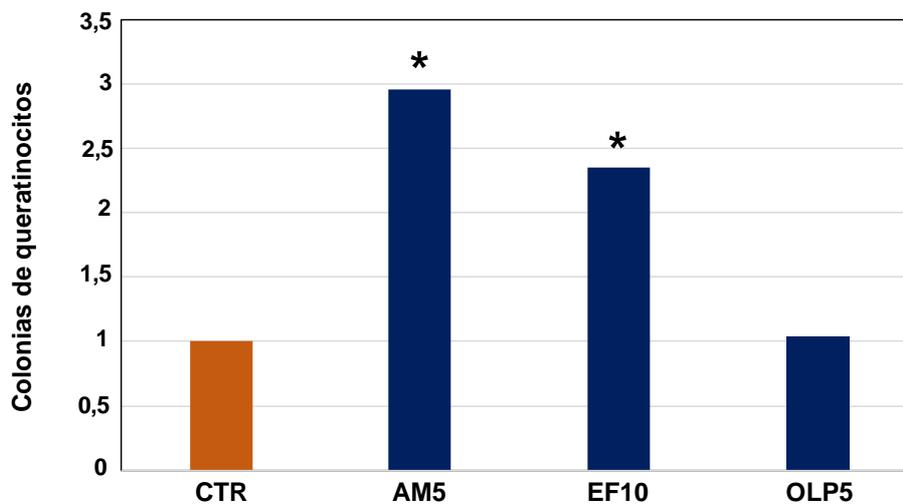


Figura 24. Eficiencia de las condiciones experimentales seleccionadas en la optimización de los actuales métodos para el establecimiento de cultivos primarios de queratinocitos a partir de biopsias de piel humana. Los valores corresponden al porcentaje de colonias generadas en cada grupo experimental, tras 21 días de cultivo, tras normalizar respecto al grupo CTR, considerado como el 100%. CTR: cultivos establecidos en ausencia de compuestos bioactivos (grupo control); AM5: medio de cultivo enriquecido con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico; EF10: medio de cultivo enriquecido con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico; OLP5: medio de cultivo enriquecido con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína. Los grupos con diferencias significativas respecto al CTR se han señalado con asteriscos (*).

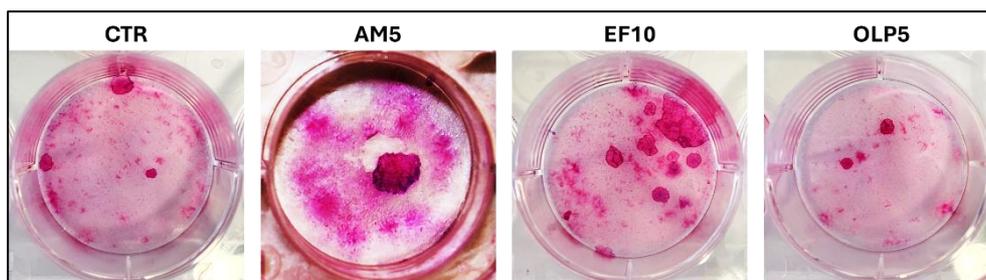


Figura 25. Imágenes ilustrativas de colonias de cultivos primarios de queratinocitos correspondientes a 21 días de cultivo en cada grupo experimental. CTR: cultivos establecidos en ausencia de compuestos bioactivos (grupo control); AM5: medio de cultivo enriquecido con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico; EF10: medio de cultivo enriquecido con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico; OLP5: medio de cultivo enriquecido con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína.

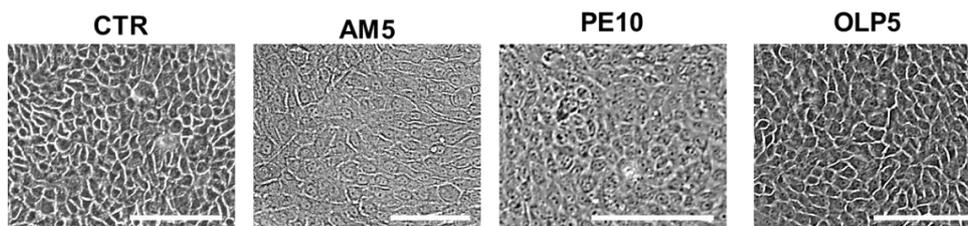


Figura 26. Imágenes ilustrativas de cultivos primarios de queratinocitos humanos establecidos a partir de biopsias de piel sometidas a digestión enzimática. CTR: cultivos establecidos en ausencia de compuestos bioactivos (grupo control); AM5: medio de cultivo enriquecido con 5 µg/mL de ácido maslínico; EF10: medio de cultivo enriquecido con 10 µg/mL de extracto fenólico; OLP5: medio de cultivo enriquecido con 5 µg/mL de oleuropeína. La barra de escala representa 100 µm.

5. Generación de nuevos modelos de piel artificial humana funcionalizados con compuestos bioactivos procedentes del aceite de oliva virgen

La aplicación de los métodos descritos en el apartado Materiales y Métodos de la presente Tesis Doctoral permitió generar nuevos sustitutos de piel humana mediante IT. El análisis histológico de los nuevos tejidos artificiales utilizando la tinción de H-E (Figura 27) reveló la presencia de un sustituto dérmico constituido por una matriz extracelular fibrilar en la que se apreciaban numerosas células de aspecto elongado, fusiforme o estrellado, compatibles con fibroblastos humanos normales. En la superficie de este sustituto dérmico se apreció un epitelio que mostraba distinto nivel de estratificación y de espesor, dependiendo del grupo de estudio y del tiempo de cultivo. En concreto, las muestras correspondientes a 24 horas de cultivo presentaron escasas células epiteliales sobre la superficie del sustituto dérmico, no existiendo un epitelio continuo en ninguno de los casos. Cuando se analizaron las muestras a los 4 días de cultivo, se observó un epitelio que cubría toda la superficie del sustituto dérmico en los grupos CTR, AM5, EF10 y OLP5, pero no en MEZCLA 3C. Tras 8 días de desarrollo, se observaron ciertas diferencias, con una tendencia a un mayor desarrollo epitelial en todos los grupos, llegando a formarse un epitelio simple que cubría toda la superficie del sustituto dérmico en el grupo MEZCLA 3C. Finalmente, el análisis de los diferentes tejidos artificiales a los 12 días de desarrollo reveló un ligero incremento del espesor del epitelio, especialmente evidente en el grupo EF10.

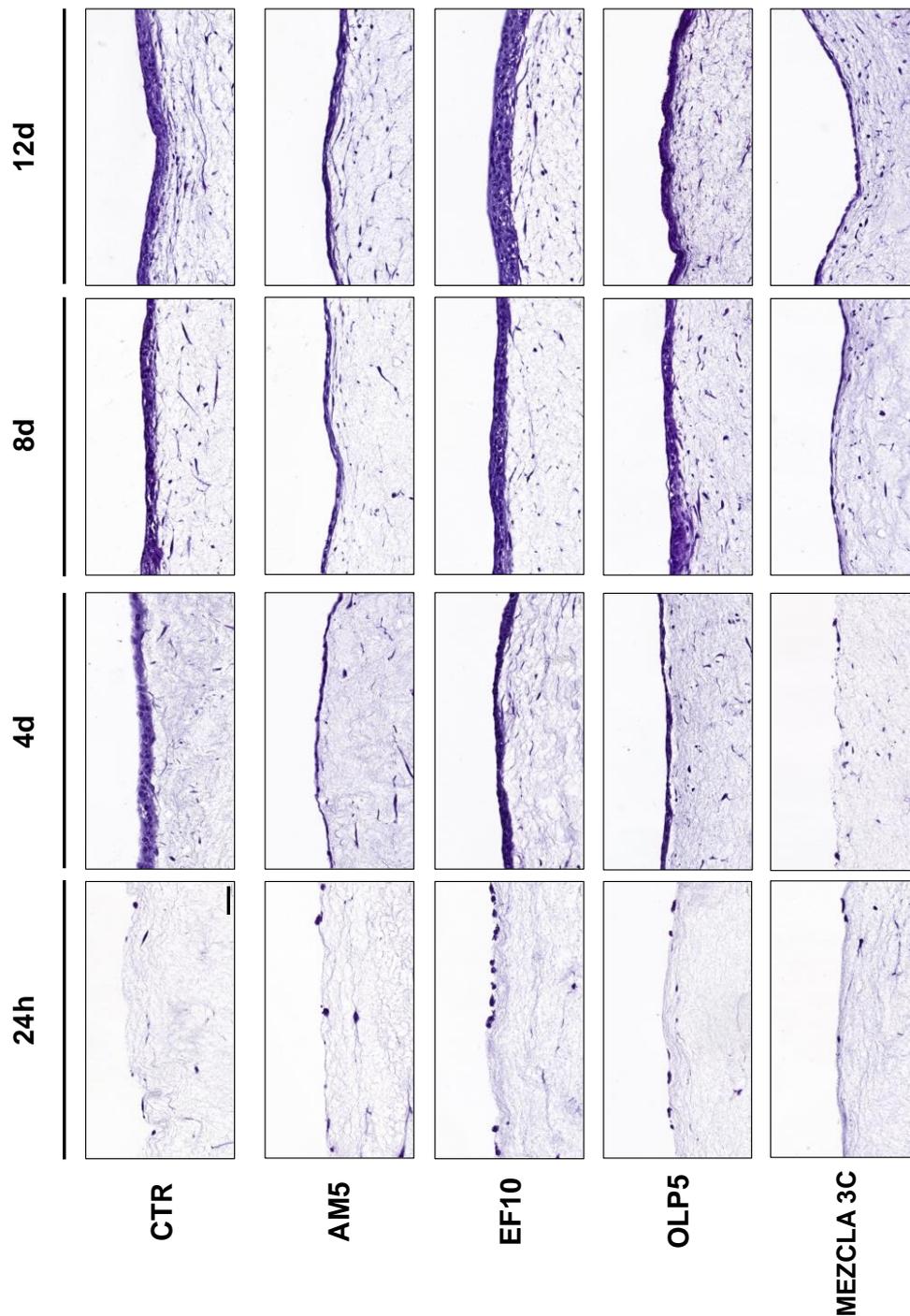


Figura 27. Sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular. Se muestran imágenes histológicas ilustrativas de cada condición y cada tiempo de evolución tras la tinción con hematoxilina-eosina. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína). Cada condición se analizó tras 24 horas y 4, 8 y 12 días de desarrollo en cultivo. La barra de magnificación mostrada en el control de 24 horas es aplicable a todas las imágenes y corresponde a 50 μm .

6. Caracterización de los nuevos modelos de piel artificial humana funcionalizados con compuestos bioactivos procedentes del aceite de oliva virgen

6.1 Análisis del desarrollo de la epidermis en los constructos durante 12 días

En primer lugar, se evaluó el desarrollo progresivo del epitelio de los distintos sustitutos de piel humana funcionalizados determinando el espesor y el número de estratos existente en la capa epitelial de cada grupo experimental.

Cuando se cuantificó el espesor del epitelio en cada condición experimental, se encontró una tendencia a aumentar el espesor de esta capa con el tiempo de cultivo, especialmente en AM5, EF10 y MEZCLA 3C. Cuando se comparó el espesor epidérmico entre las distintas muestras, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre determinados grupos de estudio (Figura 28 y Tabla 21). A las 24 horas, todos los grupos experimentales presentaban escaso espesor epitelial, no existiendo diferencias con el grupo CTR. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas respecto al espesor epitelial para el resto de los tiempos de evolución en cultivo. En concreto, a los 4 días, el espesor epitelial fue significativamente superior en el grupo CTR que en los grupos AM5, OLP5 y MEZCLA 3C, siendo similar al grupo EF10. A los 8 días, se observó una disminución significativa del espesor en AM5 y MEZCLA 3C respecto al CTR, siendo OLP5 similar a CTR y EF10, significativamente superior a CTR. Finalmente, a los 12 días EF10 mostró un epitelio de espesor significativamente mayor que el grupo CTR, mientras que AM5, OLP5 y MEZCLA 3C fueron significativamente inferiores al CTR.

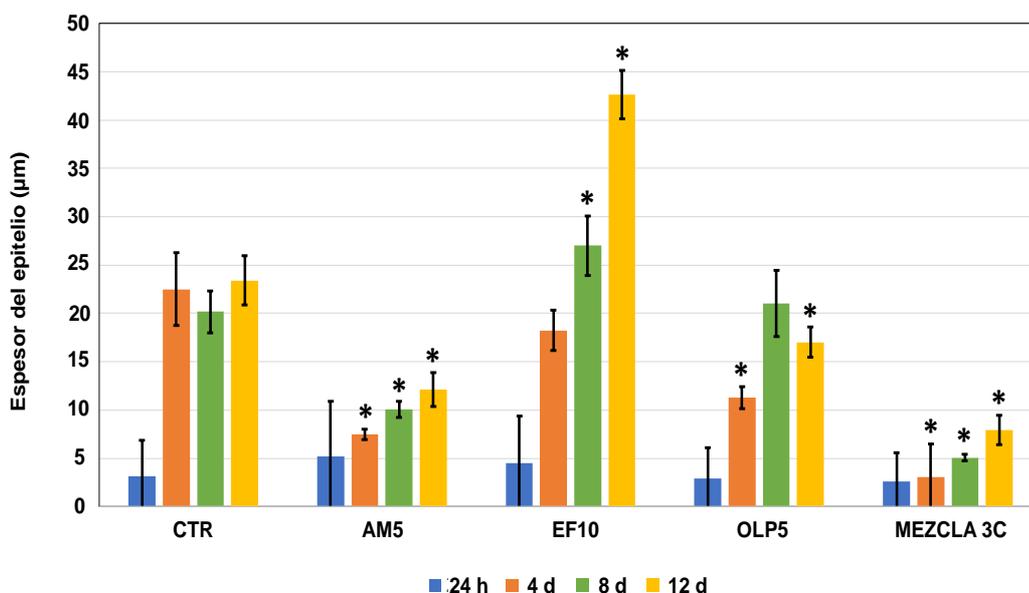


Figura 28. Espesor del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo. Los valores se muestran como micrómetros de espesor de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína). Las diferencias significativas respecto al grupo control se han señalado con asteriscos (*).

ESPESOR DEL EPITELIO (μm)	24 h	4 d	8 d	12 d
CTR	3,16 \pm 3,70	22,5 \pm 3,78	20,17 \pm 2,17	23,42 \pm 2,53
AM5	5,21 \pm 5,71	7,52 \pm 0,53	10,09 \pm 0,84	12,14 \pm 1,77
EF10	4,49 \pm 4,93	18,24 \pm 2,11	27,01 \pm 3,07	42,65 \pm 2,52
OLP5	2,91 \pm 3,22	11,28 \pm 1,17	21,03 \pm 3,39	17,01 \pm 1,57
MEZCLA 3C	2,65 \pm 2,94	3,08 \pm 3,42	5,09 \pm 0,34	7,95 \pm 1,55
CTR vs. AM5	0,4848	0,0022*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF10	0,5887	0,0931	0,0022*	0,0022*
CTR vs. OLP5	0,9372	0,0022*	0,9372	0,0022*
CTR vs. MEZCLA 3C	0,8182	0,0022*	0,0022*	0,0022*
AM5 vs. EF10	0,4848	0,0022*	0,0022*	0,0022*
AM5 vs. OLP5	0,4848	0,0022*	0,0022*	0,0043*
AM5 vs. MEZCLA 3C	0,4848	0,0043*	0,0022*	0,0043*
EF10 vs. OLP5	0,4848	0,0022*	0,0152*	0,0022*
EF10 vs. MEZCLA 3C	0,4848	0,0022*	0,0022*	0,0022*
OLP5 vs. MEZCLA 3C	0,8182	0,0022*	0,0022*	0,0022*

Tabla 21. Valores obtenidos para la cuantificación del espesor del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como micrómetros de espesor de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores *p* de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína).

Tras cuantificar el espesor del epitelio, se procedió a analizar el número de estratos epiteliales encontrados en cada condición experimental (Figura 29 y Tabla 22). Los resultados mostraron muy escasas diferencias a las 24 horas, que no fueron estadísticamente significativas. A los 4 días de evolución, las muestras correspondientes al grupo MEZCLA 3C presentaron menor número de estratos epiteliales que el grupo CTR, no siendo significativas las diferencias entre el grupo CTR y el resto de los grupos de estudio. Tras 8 días de cultivo, las muestras de piel artificial del grupo EF10 mostraron un número significativamente superior de estratos que el CTR, mientras que los grupos AM5 y MEZCLA 3C presentaron un número significativamente inferior que el grupo CTR. Para OLP5, el número de estratos fue similar al CTR. Cuando se analizaron los valores correspondientes al número de estratos epidérmicos a los 12 días de evolución, se encontró que EF10 fue significativamente superior al grupo CTR, mientras que el resto de los grupos resultó significativamente inferior al grupo CTR.

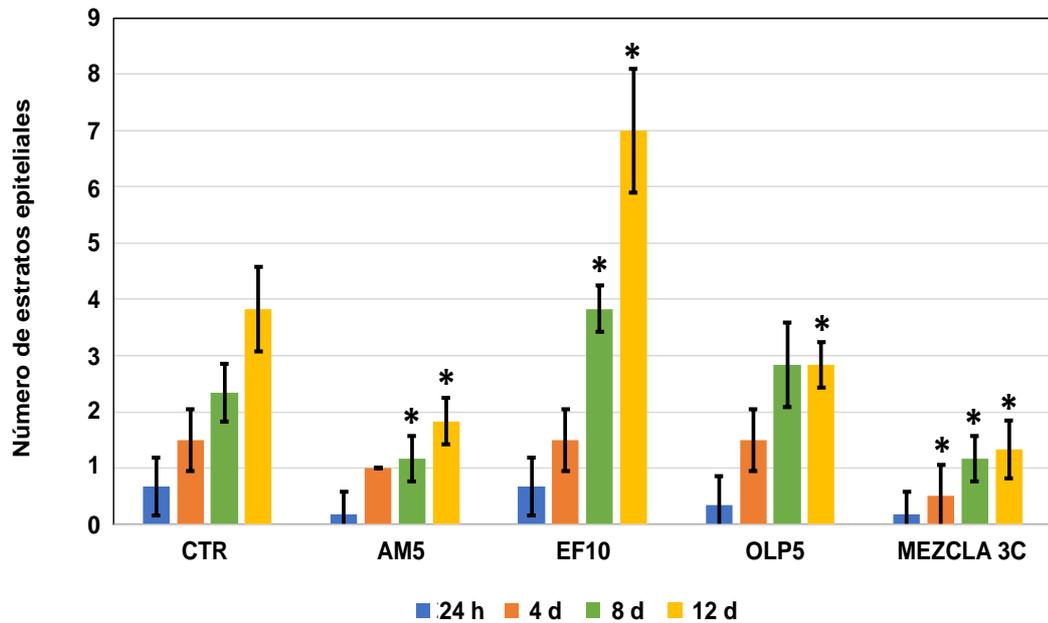


Figura 29. Número de estratos del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo. Los valores se muestran como número de estratos de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína). Las diferencias significativas respecto al grupo control se han señalado con asteriscos (*).

NÚMERO DE ESTRATOS DEL EPITELIO	24 h	4 d	8 d	12 d
CTR	0,67±0,52	1,5±0,55	2,33±0,52	3,83±0,75
AM5	0,17±0,41	1±0	1,17±0,41	1,83±0,41
EF10	0,67±0,52	1,5±0,55	3,83±0,41	7±1,10
OLP5	0,33±0,52	1,5±0,55	2,83±0,75	2,83±0,41
MEZCLA 3C	0,17±0,41	0,5±0,55	1,17±0,41	1,33±0,52
CTR vs. AM5	0,1797	0,1797	0,0087*	0,0022*
CTR vs. EF10	0,9372	0,9372	0,0043*	0,0022*
CTR vs. OLP5	0,3939	0,9372	0,3095	0,0411*
CTR vs. MEZCLA 3C	0,1797	0,0260*	0,0087*	0,0022*
AM5 vs. EF10	0,1797	0,1797	0,0022*	0,0022*
AM5 vs. OLP5	0,6991	0,1797	0,0043*	0,0087*
AM5 vs. MEZCLA 3C	0,9372	0,1797	0,9372	0,1797
EF10 vs. OLP5	0,3939	0,9372	0,0411*	0,0022*
EF10 vs. MEZCLA 3C	0,1797	0,0260*	0,0022*	0,0022*
OLP5 vs. MEZCLA 3C	0,6991	0,0260*	0,0043*	0,0043*

Tabla 22. Valores obtenidos para la cuantificación del número de estratos del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como número de estratos de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína).

6.2 Análisis de proliferación de la epidermis de la piel artificial

El análisis de células en fase activa de proliferación determinada mediante el marcador KI67 reveló algunas diferencias entre las distintas condiciones experimentales analizadas en la presente Tesis Doctoral (Figura 30 y Figura 31 y Tabla 23). En concreto, se apreció una tendencia a un mayor número de células en proliferación a los 4 días de evolución, tendiendo ésta a disminuir en los días 8 y 12. Cuando se analizaron los diferentes compuestos bioactivos, se observaron escasas diferencias entre los distintos grupos de estudio, siendo la mayor parte de éstos comparables al grupo CTR. Sin embargo, el grupo EF10 mostró un porcentaje significativamente superior de células KI67-positivas en comparación con el grupo CTR a los 8 días del estudio.

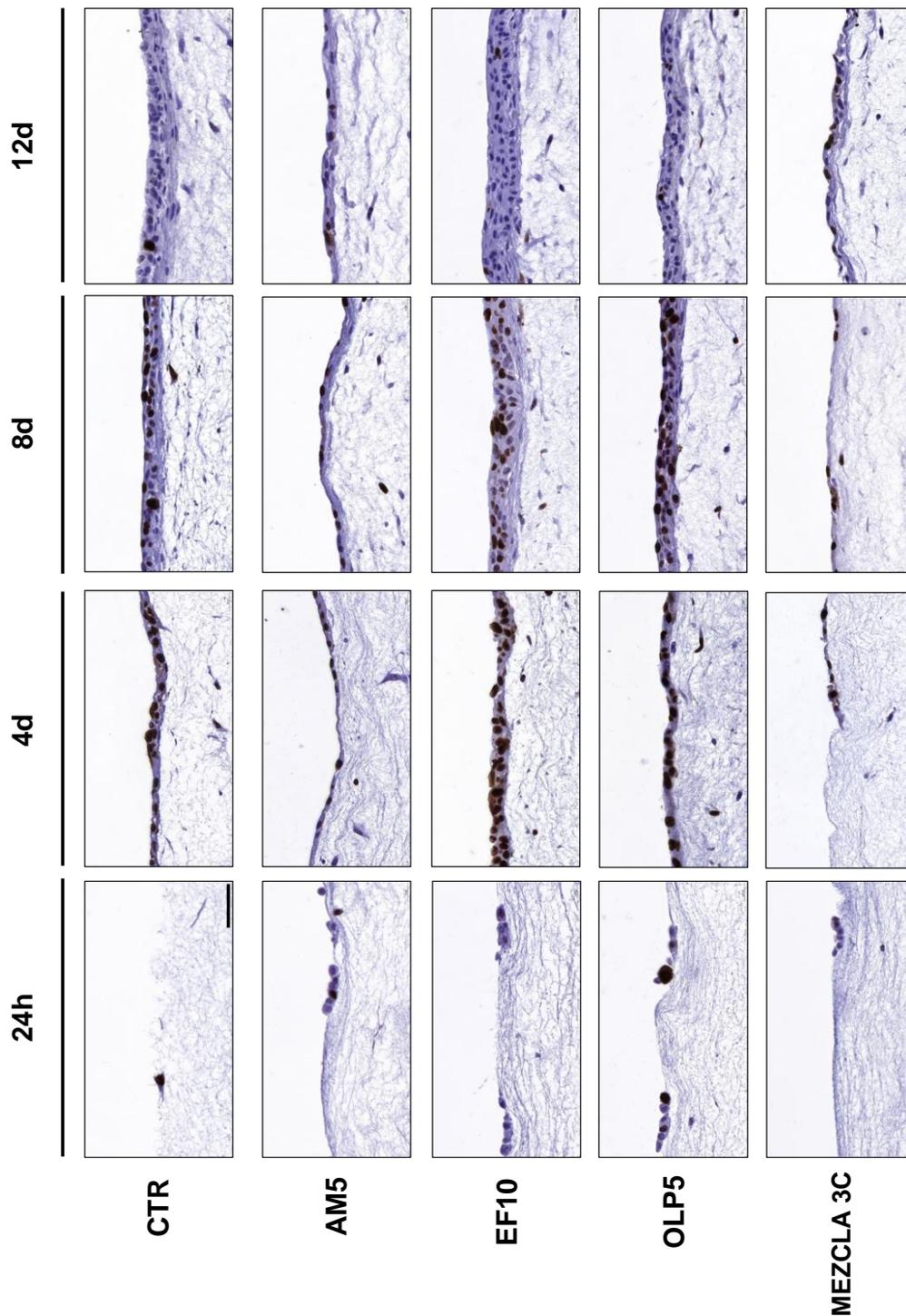


Figura 30. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de proliferación KI67 de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína). Cada condición se analizó tras 24 horas y 4, 8 y 12 días de desarrollo en cultivo. La barra de magnificación mostrada en el control de 24h es aplicable a todas las imágenes y corresponde a 50 µm.

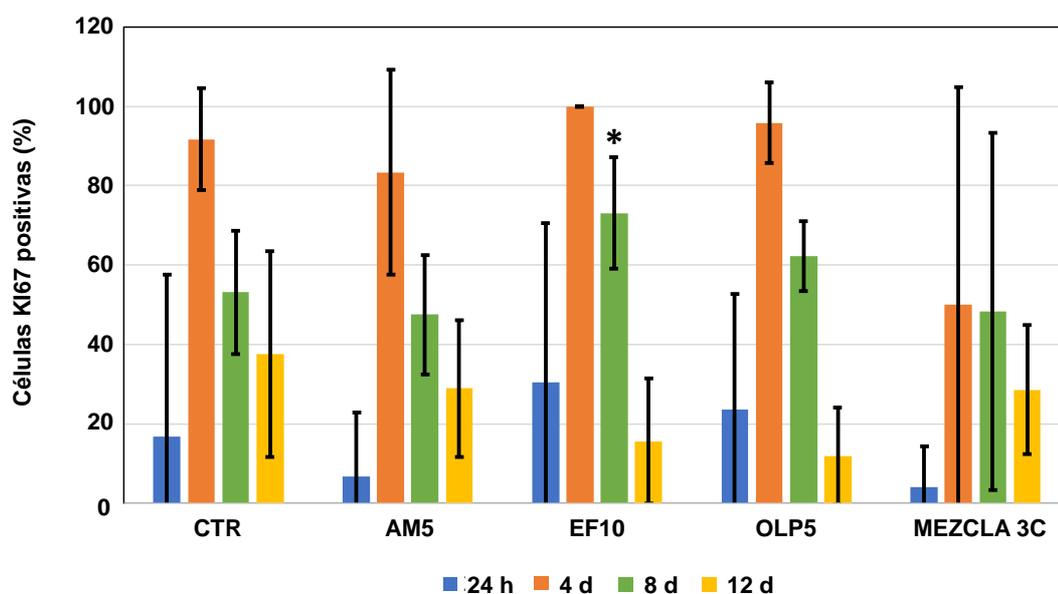


Figura 31. Análisis de proliferación de las células del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinada mediante KI67. Los valores se muestran como porcentaje de células positivas para el marcador KI67 de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína).

Células KI67 positivas (%)	24 h	4 d	8 d	12 d
CTR	16,67±40,82	91,67±12,91	53,19±15,52	37,53±25,99
AM5	6,67±16,33	83,33±25,82	47,5±15,08	28,89±17,34
EF10	30,56±40,02	100±0	73,06±14,08	15,65±15,69
OLP5	23,61±29,07	95,83±10,21	62,23±8,71	11,87±12,24
MEZCLA 3C	4,17±10,21	50±54,77	48,33±44,91	28,61±16,34
CTR vs. AM5	0,9372	0,8182	0,3939	0,5887
CTR vs. EF10	0,4848	0,3939	0,0260*	0,0931
CTR vs. OLP5	0,4848	0,6991	0,3095	0,1320
CTR vs. MEZCLA 3C	0,9372	0,3939	0,5887	0,6991
AM5 vs. EF10	0,3095	0,3939	0,0260*	0,2403
AM5 vs. OLP5	0,3095	0,5887	0,0649	0,0931
AM5 vs. MEZCLA 3C	0,9372	0,3939	0,9372	0,9372
EF10 vs. OLP5	0,9372	0,6991	0,1320	0,9372
EF10 vs. MEZCLA 3C	0,2403	0,1797	0,3095	0,3095
OLP5 vs. MEZCLA 3C	0,3095	0,2403	0,3939	0,1320

Tabla 23. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células positivas para el marcador de proliferación celular KI67 en el epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células positivas para KI67 en la capa epitelial de los sustitutos de piel humana expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína).

Asimismo, se cuantificó el porcentaje de células en proliferación mediante el estudio inmunohistoquímico para el marcador PCNA (Figura 32 y Figura 33 y Tabla 24). Los resultados mostraron una tendencia a aumentar la proliferación a partir de los 4 días de evolución, no existiendo una clara relación con el tiempo de cultivo. En la comparación entre diferentes grupos experimentales, se encontraron muy escasas diferencias, que no resultaron significativas, a las 24 horas, 4 y 12 días, siendo los compuestos bioactivos comparables al grupo CTR. Sin embargo, a los 8 días de evolución se apreció un aumento significativo de la proliferación celular en los grupos EF10 y OLP5 en comparación con el grupo CTR, no existiendo diferencias entre el grupo CTR y AM5 o MEZCLA 3C.

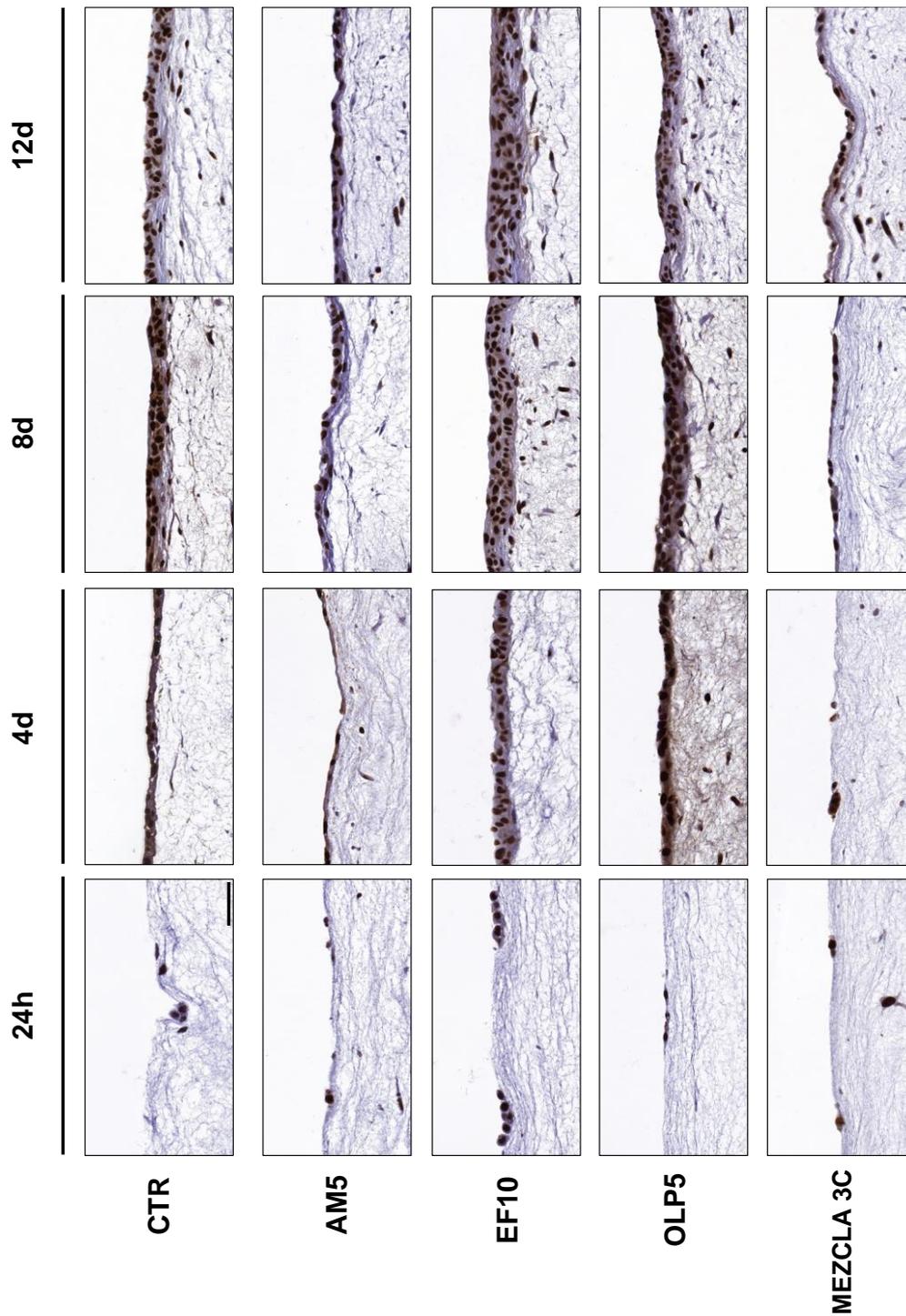


Figura 32. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de proliferación PCNA de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína). Cada condición se analizó tras 24 horas y 4, 8 y 12 días de desarrollo en cultivo. La barra de magnificación mostrada en el control de 24 horas es aplicable a todas las imágenes y corresponde a 50 μm .

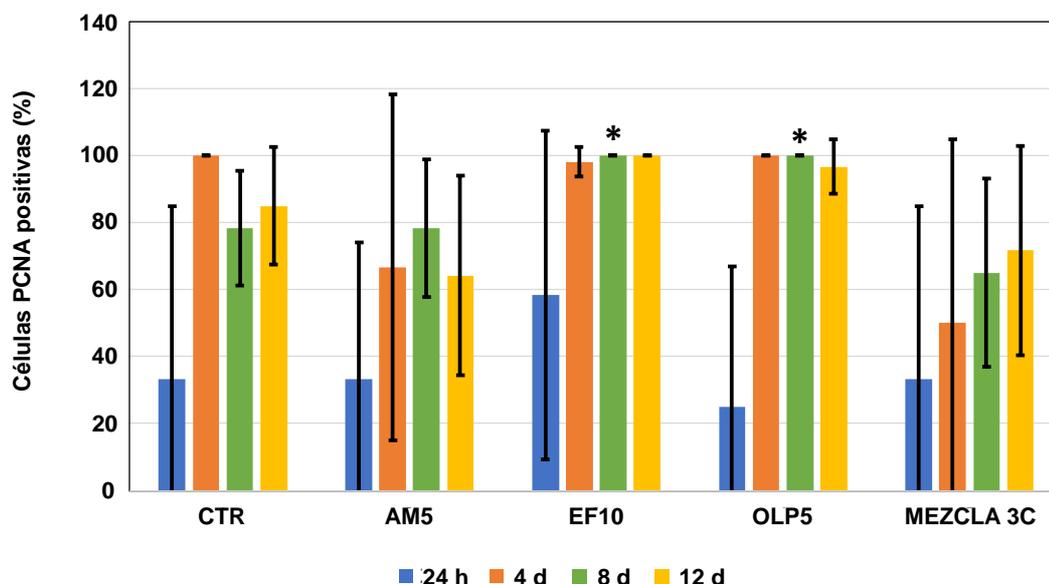


Figura 33. Análisis de proliferación de las células del epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinada mediante PCNA.

Los valores se muestran como porcentaje de células positivas para el marcador PCNA de la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína).

CÉLULAS PCNA POSITIVAS (%)	24 h	4 d	8 d	12 d
CTR	33,33±51,64	100±0	78,33±17,22	85±17,61
AM5	33,33±40,82	66,67±51,64	78,33±20,41	64,17±29,73
EF10	58,33±49,16	98,15±4,54	100±0	100±0
OLP5	25±41,83	100±0	100±0	96,67±8,16
MEZCLA	33,33±51,64	50±54,77	65±28,11	71,67±31,25
CTR vs. AM5	0,9372	0,3939	0,9372	0,1797
CTR vs. EF10	0,4848	0,6991	0,0152*	0,1797
CTR vs. OLP5	0,9372	0,9372	0,0152*	0,3095
CTR vs. MEZCLA 3C	0,9372	0,1797	0,3939	0,4848
AM5 vs. EF10	0,3939	0,5887	0,0649	0,0649

AM5 vs. OLP5	0,6991	0,3939	0,0649	0,0931
AM5 vs. MEZCLA 3C	0,9372	0,6991	0,3939	0,8182
EF10 vs. OLP5	0,3095	0,6991	0,9372	0,6991
EF10 vs. MEZCLA 3C	0,4848	0,2403	0,0649	0,1797

Tabla 24. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de células positivas para el marcador de proliferación celular PCNA en el epitelio en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de células positivas para PCNA en la capa epitelial de los sustitutos de piel humana expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores *p* de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína).

6.3. Análisis de diferenciación de la epidermis de la piel artificial

La evaluación de los niveles de diferenciación del epitelio de los sustitutos de piel humana generados en la presente Tesis Doctoral utilizando el marcador epitelial AE1-AE3 revelaron una tendencia a aumentar la intensidad de tinción inmunohistoquímica de este marcador con el tiempo de evolución (Figura 34 y Figura 35 y Tabla 25). La comparación de los niveles de expresión de AE1-AE3 a las 24 horas no reveló diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio. Sin embargo, a los 4 y 8 días de evolución en cultivo, se observó que el grupo tratado con EF10 mostraba niveles significativamente superiores al grupo CTR, mientras que los grupos AM5 y MEZCLA 3C resultaron significativamente inferiores al CTR. No se encontraron diferencias entre el grupo CTR y OLP5. Por último, el estudio de expresión de AE1-AE3 a los 12 días de evolución mostró un incremento significativo de la expresión de este marcador en EF10, siendo significativamente inferior en el grupo MEZCLA 3C, sin que existieran diferencias significativas entre CTR y los grupos AM5 o OLP5.

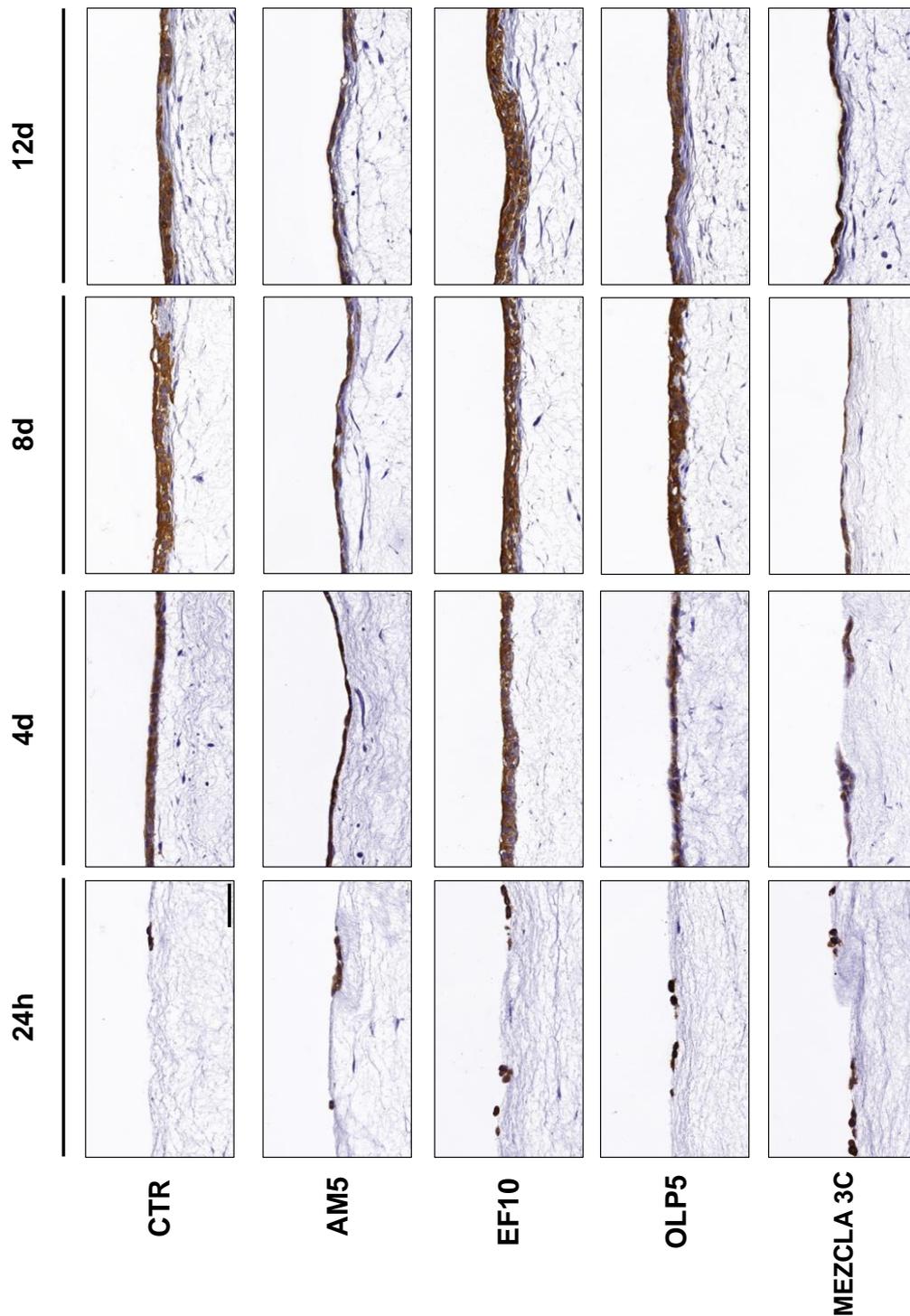


Figura 34. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de diferenciación AE1-AE3 de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína). Cada condición se analizó tras 24 horas y 4, 8 y 12 días de desarrollo en cultivo. La barra de magnificación mostrada en el control de 24 horas es aplicable a todas las imágenes y corresponde a 50 μm .

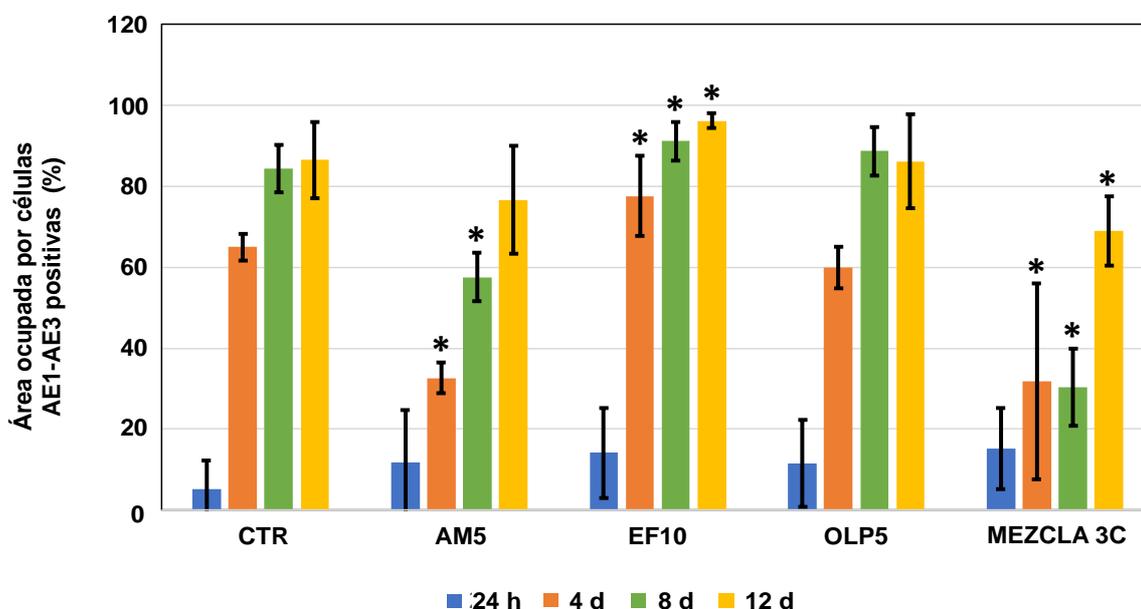


Figura 35. Análisis de diferenciación epitelial en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinado mediante inmunohistoquímica para el marcador AE1-AE3. Los valores se muestran como porcentaje de área de epitelio que mostró positividad para el marcador AE1-AE3 en la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína).

ÁREA OCUPADA POR CÉLULAS AE1-AE3 POSITIVAS (%)	24 h	4 d	8 d	12 d
CTR	5,06±7,26	64,98±3,23	84,41±5,80	86,54±9,48
AM5	11,8±12,91	32,61±3,76	57,63±5,99	76,7±13,30
EF10	14,12±11,03	77,6±9,90	91,16±4,72	96,19±1,86
OLP5	11,51±10,77	59,92±5,08	88,72±5,97	86,17±11,67
MEZCLA 3C	15,16±10,04	31,87±24,18	30,37±9,42	69,08±8,56
CTR vs. AM5	0,1797	0,0022*	0,0022*	0,1797
CTR vs. EF10	0,0931	0,0260*	0,0260*	0,0087*
CTR vs. OLP5	0,3939	0,0931	0,1797	0,9372
CTR vs. MEZCLA 3C	0,0649	0,0152*	0,0022*	0,0087*
AM5 vs. EF10	0,6991	0,0022*	0,0022*	0,0022*
AM5 vs. OLP5	0,9372	0,0022*	0,0022*	0,2403
AM5 vs. MEZCLA 3C	0,4848	0,3939	0,0022*	0,3095
EF10 vs. OLP5	0,6991	0,0087*	0,5887	0,0649
EF10 vs. MEZCLA 3C	0,8182	0,0043*	0,0022*	0,0022*
OLP5 vs. MEZCLA 3C	0,5887	0,1797	0,0022*	0,0260*

Tabla 25. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de área de epitelio que mostraba señal positiva para el marcador de diferenciación epitelial AE1-AE3 en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de positividad para AE1-AE3 en la capa epitelial de los sustitutos de piel humana expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína).

Por otro lado, los análisis inmunohistoquímicos para el marcador de diferenciación epitelial involucrina (Figura 36 y Figura 37 y Tabla 26) mostraron una tendencia a incrementar la señal de este marcador en dependencia del tiempo. Cuando se analizaron los diferentes grupos de estudio, todos los grupos mostraron escasa expresión de involucrina a las 24 horas de desarrollo. A los 4 días de evolución, los niveles de expresión fueron significativamente inferiores en los grupos AM5 y MEZCLA 3C en comparación con el grupo CTR. Respecto a los días 8 y 12 del estudio, se observó un aumento de los niveles de expresión de involucrina en el grupo EF10 comparado con el grupo CTR, así como una disminución significativa en los grupos AM5 y MEZCLA 3C en comparación con el grupo CTR, sin que existieran diferencias significativas entre los grupos OLP5 y CTR.

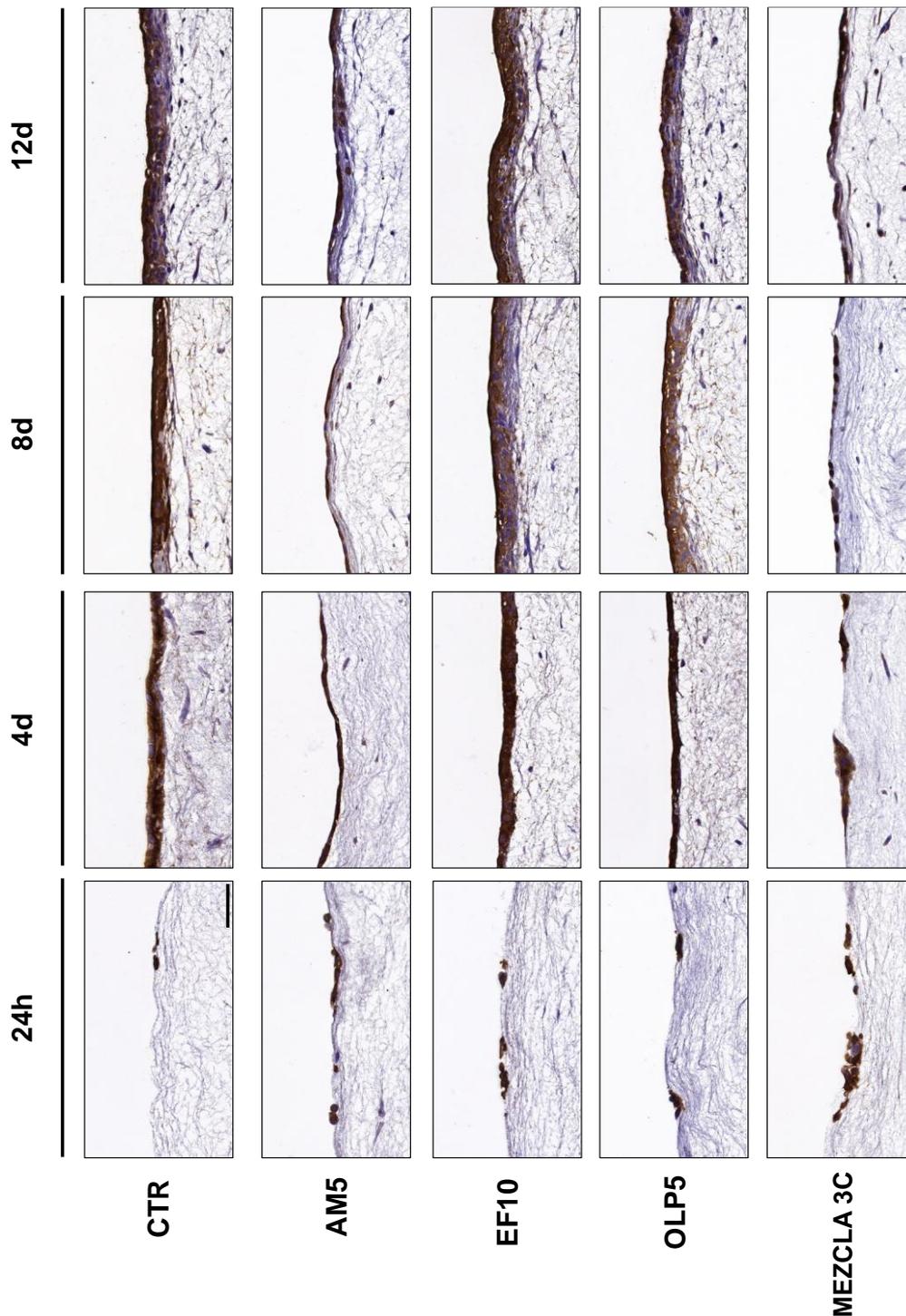


Figura 36. Análisis inmunohistoquímico para el marcador de diferenciación involucrina de los sustitutos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína). Cada condición se analizó tras 24 horas y 4, 8 y 12 días de desarrollo en cultivo. La barra de magnificación mostrada en el control de 24 horas es aplicable a todas las imágenes y corresponde a 50 μm .

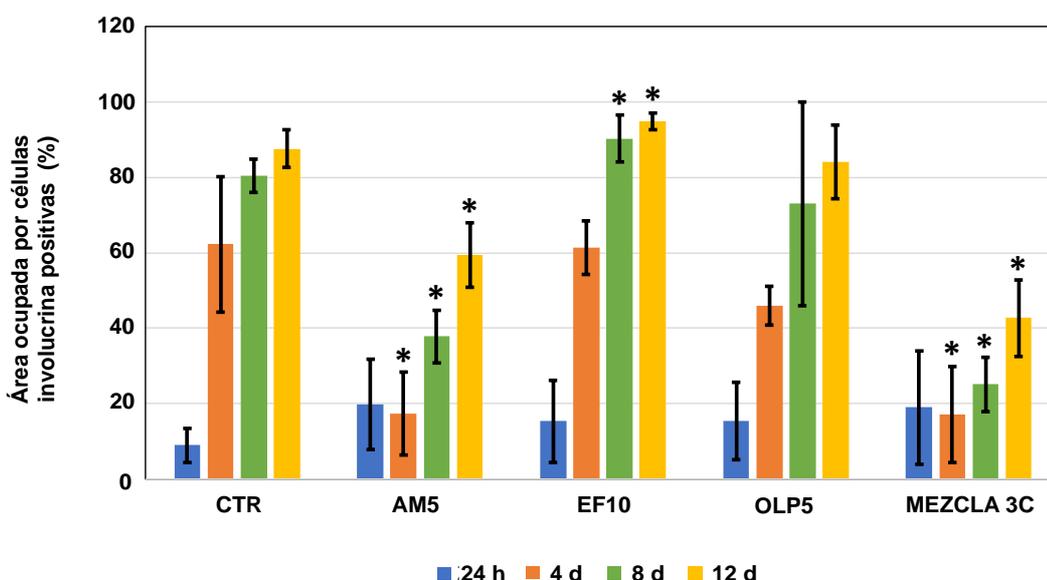


Figura 37. Análisis de diferenciación epitelial en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo determinado mediante inmunohistoquímica para el marcador involucrina. Los valores se muestran como porcentaje de área de epitelio que mostró positividad para el marcador involucrina en la capa epitelial de los sustitutos de piel humana, expresados como medias y desviaciones estándar. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido maslínico, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto fenólico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína).

ÁREA OCUPADA POR CÉLULAS INVOLUCRINA POSITIVAS (%)	24 h	4 d	8 d	12 d
CTR	9,01±4,54	62,24±18,09	80,43±4,31	87,66±5,06
AM5	19,77±11,94	17,36±11,01	37,81±7,05	59,51±8,53
EF10	15,29±10,78	61,45±7,07	90,34±6,23	94,95±2,18
OLP5	15,39±10,33	46,01±5,15	73,02±26,97	84,15±9,78
MEZCLA 3C	18,97±15,11	17,19±12,70	25,12±7,23	42,69±10,10
CTR vs. AM5	0,0649	0,0043*	0,0022*	0,0022*
CTR vs. EF10	0,3939	0,3939	0,0260*	0,0022*
CTR vs. OLP5	0,2403	0,0649	0,4848	0,4848
CTR vs. MEZCLA 3C	0,0931	0,0043*	0,0022*	0,0022*
AM5 vs. EF10	0,4848	0,0022*	0,0022*	0,0022*
AM5 vs. OLP5	0,6991	0,0022*	0,0649	0,0043*
AM5 vs. MEZCLA 3C	0,9372	0,6991	0,0260*	0,0152*
EF10 vs. OLP5	0,9372	0,0022*	0,1320	0,0411*
EF10 vs. MEZCLA 3C	0,8182	0,0022*	0,0022*	0,0022*
OLP5 vs. MEZCLA 3C	0,5887	0,0043*	0,0260*	0,0022*

Tabla 26. Valores obtenidos para la cuantificación del porcentaje de área de epitelio que mostraba señal positiva para el marcador de diferenciación epitelial involucrina en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos de cultivo y comparación estadística de los mismos. En las filas superiores, los valores se muestran como porcentaje de positividad para involucrina en la capa epitelial de los sustitutos de piel humana expresados como media y desviación estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de las comparaciones estadísticas entre el control y cada grupo de estudio. CTR: control de piel artificial cultivada en ausencia de compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen; AM5: piel artificial cultivada con ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL; EF10: piel artificial cultivada con extracto fenólico a la concentración de 10 µg/mL; OLP5: piel artificial cultivada con oleuropeína a la concentración de 5 µg/mL; MEZCLA 3C: piel artificial cultivada con una mezcla de los tres compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen (5 µg/mL de ácido maslínico, 10 µg/mL de extracto fenólico y 5 µg/mL de oleuropeína).

DISCUSIÓN

El creciente desarrollo de la IT supone un importante cambio de paradigma en el tratamiento de pacientes afectados de todo tipo de patologías que, hasta el momento, tenían difícil solución o no disponían de tratamiento plenamente eficaz (Allen et al., 2022; Campos, 2019; Wu et al., 2024). De este modo, en la actualidad, se están utilizando diversos tipos de tejidos artificiales para el tratamiento de pacientes afectados de graves alteraciones estructurales de la córnea (Bandeira et al., 2020; Buznyk et al., 2015; González-Andrades et al., 2017; González-Gallardo et al., 2023), la piel (Böttcher-Haberzeth et al., 2010; Chua et al., 2016; Gómez et al., 2011; Martin-Piedra et al., 2023; Meana et al., 1998) y otros órganos y tejidos humanos, con resultados altamente prometedores.

Sin embargo, una de las principales limitaciones de los métodos y técnicas actualmente disponibles para la generación de órganos y tejidos artificiales es la dificultad para generar cultivos celulares en cantidad suficiente y en un tiempo reducido, especialmente, en determinados tipos celulares que muestran baja tasa de proliferación en cultivo, como son las células epiteliales (Merra et al., 2024). Hasta el momento, la mayoría de investigadores recurre a técnicas capaces de incrementar parcialmente la proliferación celular sin alterar la fisiología celular, tales como el uso de determinados factores de crecimiento (en especial, el factor de crecimiento epitelial o EGF) (Hudson & McCawley, 1998; Jost et al., 2000; Rebel et al., 1995) o el cultivo en presencia de células alimentadoras como es el caso de las células 3T3 de origen murino (Czyz et al., 2023; Hynds et al., 2018). Aunque estos métodos contribuyen a incrementar la tasa de proliferación de las células mantenidas en cultivo, los problemas derivados de su uso y su eficacia parcial hacen necesario buscar nuevos métodos y alternativas capaces de mejorar de forma significativa los actuales protocolos de cultivo celular destinados a la generación de tejidos artificiales por IT.

A este respecto, en la presente Tesis Doctoral se han conseguido identificar y evaluar cuatro compuestos obtenidos de una fuente natural y saludable (el aceite de oliva) que previamente habían demostrado utilidad en otros tipos de aplicaciones (Gonçalves et al., 2024; Melguizo-Rodríguez et al., 2022; Pojero et al., 2022). De este modo, se pretende determinar la posible utilidad de dichos compuestos bioactivos a la hora de optimizar los actuales protocolos de cultivo de células epiteliales humanas para uso en IT de la piel.

Uno de los principales requerimientos de la Agencia Europea del Medicamento, así como de las distintas agencias nacionales, incluyendo la AEMPS, es asegurar la bioseguridad de los nuevos productos a utilizar terapéuticamente (Hess et al., 2012). En

este contexto, uno de los principales parámetros a evaluar durante el proceso de caracterización de la bioseguridad del producto es la viabilidad celular (François et al., 2020). De hecho, demostrar que las células tratadas con determinados productos o cultivadas en presencia de factores bioactivos novedosos se mantienen viables, es uno de los principales requisitos a la hora de optimizar protocolos de cultivo celular. Por ello, uno de los primeros estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral ha sido determinar la viabilidad de las células cultivadas en presencia de los nuevos productos bioactivos extraídos del aceite de oliva. A este respecto, es importante señalar que los estudios de viabilidad celular realizados en la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo utilizando más de un método de análisis, lo cual contribuye, como se señaló previamente, a incrementar la validez de los resultados (Stoddart, 2011). De hecho, los resultados obtenidos utilizando un método altamente sensible basado en la función fisiológica y estructural de las células cultivadas en presencia de los diferentes compuestos bioactivos (LIVE/DEAD) (Gustin & Prasad, 2024) coincidieron ampliamente con aquellos obtenidos con un método que evalúa, básicamente, la estabilidad estructural de las células (cuantificación de ADN liberado al medio) (Ortiz-Arrabal et al., 2023). De este modo, se pudieron establecer conclusiones con altos niveles de confianza.

Los resultados de los análisis de viabilidad celular mostraron, en general, que los cuatro compuestos bioactivos derivados del aceite de oliva son seguros para las células, y los cultivos celulares demostraron elevados niveles de viabilidad celular en la mayoría de los casos. De hecho, únicamente las mayores concentraciones de dichos compuestos provocaron un efecto deletéreo en las células, siendo las concentraciones inferiores totalmente seguras. Aunque estos compuestos no habían sido evaluados previamente en cultivos celulares, las concentraciones seguras de estas moléculas se encuentran, aproximadamente, en el rango de concentraciones utilizado para otros componentes, tales como la insulina, componente fundamental del medio de cultivo utilizado universalmente para el cultivo de queratinocitos humanos (Ścieżyńska et al., 2019). El hecho de que todos los compuestos mostraron elevados niveles de bioseguridad relacionados con viabilidad celular a las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/mL, condujo a seleccionar estas concentraciones como las idóneas para su uso en IT.

Tras la viabilidad, uno de los requisitos fundamentales de los productos a utilizar en la generación de cultivos celulares para uso en IT es demostrar la funcionalidad del procedimiento. Por ello, en segundo lugar, en la presente Tesis Doctoral se evaluó la proliferación de las células epiteliales humanas cultivadas en presencia de los diferentes

agentes bioactivos. Al igual que se hizo para la viabilidad, y con el objetivo de incrementar la validez de los resultados (Stoddart, 2011), se utilizó un método de análisis doble. Por un lado, se cuantificó el número de células existente en cada momento del cultivo utilizando métodos de citometría de flujo (Jaber et al., 2024). Por otro, se evaluó la proliferación aplicando un método basado en el análisis de la funcionalidad mitocondrial de las células mantenidas en cultivo, la cual es directamente proporcional a la proliferación celular (método WST-1) (Martin-Piedra et al., 2014). En general, estos estudios revelaron la capacidad de algunos de los compuestos bioactivos para incrementar la proliferación celular.

En concreto, se pudo comprobar el efecto pro-proliferativo del AM a la concentración de 5 µg/mL, tanto a las 24 como a las 48 y 72 horas de cultivo, existiendo diferencias significativas respecto al CTR para ambas técnicas de análisis. Por ello, y teniendo en cuenta que esta concentración se asociaba a un mantenimiento de los niveles de viabilidad celular, se seleccionó esta concentración para futuros estudios.

En el caso del EF, nuestros resultados demostraron el efecto pro-proliferativo de este compuesto cuando se usa a una concentración de 10 µg/mL, especialmente, a las 72 horas de cultivo. Un hallazgo interesante fue la disminución significativa de la proliferación celular cuando se utilizaron las concentraciones más altas de este compuesto, lo cual coincide con los resultados correspondientes al estudio de viabilidad celular, y desaconseja su uso a elevadas concentraciones. Estos resultados nos llevaron a seleccionar la concentración de 10 µg/mL de EF como la más idónea para incrementar la proliferación, sin alterar la viabilidad celular.

En lo que se refiere al DHFG, los resultados mostraron un efecto muy residual de este compuesto a la hora de incrementar la proliferación celular, existiendo diferencias significativas respecto al CTR únicamente en determinadas condiciones experimentales aisladas, sin que se encontrara correlación entre ambas técnicas de análisis (citometría de flujo y método WST-1), aunque, de nuevo, ambas técnicas coincidían en encontrar un efecto negativo en las concentraciones más altas, tal como se apreció en los estudios de viabilidad celular. Por este motivo, no se seleccionó ninguna de las condiciones experimentales, concluyéndose que, probablemente, el DHFG no es capaz de incrementar la proliferación de los queratinocitos de la piel humana mantenidos en cultivo, al menos, en las condiciones utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Por último, el análisis de los resultados obtenidos para la OLP mostró un efecto significativo de este producto a la hora de incrementar la proliferación celular,

especialmente, en la concentración de 5 µg/mL a los tres tiempos analizados (24, 48 y 72 horas) y para ambos métodos de estudio. Al igual que ocurría para el AM, estos resultados nos llevaron a seleccionar la concentración de 5 µg/mL como aquella que mostraba mayor potencialidad para incrementar la proliferación celular sin alterar la viabilidad de los queratinocitos humanos mantenidos en cultivo.

En general, estos hallazgos confirman la posible utilidad de algunos de los compuestos bioactivos derivados del aceite de oliva para disminuir el tiempo requerido para generar cultivos celulares primarios de queratinocitos de la epidermis humana y, por tanto, para la fabricación de la piel artificial. Como se indicó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la baja tasa de proliferación celular de los queratinocitos cultivados en condiciones estándar de laboratorio (Garzón et al., 2015; Martín-Piedra et al., 2019; Zhang et al., 2021b) supone una de las principales limitaciones del tratamiento con piel artificial en pacientes afectados de graves quemaduras cutáneas, debido a la necesidad de esperar 4-5 semanas para generar dicha piel artificial en el laboratorio (J. Wang et al., 2021).

La selección de las concentraciones mencionadas para cada producto nos permitió obtener información sobre el potencial papel pro-proliferativo de tres de los cuatro compuestos analizados en la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, estos estudios se llevaron a cabo sobre células inmortalizadas (queratinocitos de la piel humana inmortalizados). Aunque las células inmortalizadas se han utilizado ampliamente para llevar a cabo estudios *ex vivo* de viabilidad y funcionalidad celular en distintos escenarios, existen determinados condicionantes asociados a su utilización en biomedicina (Chalak et al., 2024; Geraghty et al., 2014). En general, las células inmortalizadas ofrecen gran accesibilidad y disponibilidad, en contraste con los cultivos primarios de células normales, los cuales son difíciles de obtener y requieren disponer de biopsias tisulares (Schularick et al., 2014). Por ello, diversos investigadores han propuesto inmortalizar dichos cultivos utilizando distintos métodos, como la transducción con determinados genes, tales como los oncogenes víricos HPV E6 y E7 (Evans, 2009) o los genes relacionados con la estabilidad telomérica, como hTERT (J. H. Kim et al., 2023), el cual se utilizó en las células empleadas en la presente Tesis Doctoral. A pesar de que estos queratinocitos inmortalizados no presentan idéntica fisiología que las células normales y, en general, muestran mayor potencial de proliferación intrínseca que las células no inmortalizadas, son numerosos los trabajos que las utilizan de forma preliminar, o incluso, para la generación de sustitutos de la piel humana mediante IT (Szymański et al., 2020). En cualquier caso, las diferencias entre los queratinocitos de

la piel humana normal y las células utilizadas en la presente Tesis Doctoral para la determinación de niveles de viabilidad y proliferación celular obligan a tomar estos resultados con cautela, siendo necesario determinar su validez en un modelo de cultivos celulares primarios no inmortalizados.

Una vez determinadas las condiciones experimentales que mostraron mayor potencial a la hora de optimizar los cultivos celulares de queratinocitos de la piel humana, se procedió a evaluar el posible efecto pro-proliferativo de dichas condiciones sobre los cultivos primarios de queratinocitos normales de la piel humana. Para ello, se generaron cultivos primarios a partir de muestras de biopsias de piel procedente de donantes sanos, evaluándose la eficiencia de cada método para generar cultivos primarios útiles en IT. Los resultados de estos estudios demostraron que tanto el AM a concentración de 5 µg/mL como el EF a concentración de 10 µg/mL (especialmente, el primero) resultaron en un aumento significativo del número de colonias de queratinocitos obtenido en cada condición, respecto al grupo CTR en el que no se utilizó ninguno de los compuestos bioactivos. Sin embargo, la utilización de OLP no logró mejorar los resultados del CTR. Aunque estos resultados deberán ser confirmados en estudios independientes, los datos aquí obtenidos abren la puerta a la utilización de AM y de EF para optimizar los métodos actualmente aplicados al cultivo de queratinocitos a partir de biopsias de piel humana procedentes de donantes. El hecho de que la OLP no demostrara efecto significativo en estas condiciones refuerza la idea de que los cultivos de células inmortalizadas no presentan idéntica fisiología que los cultivos primarios de células normales, y confirman la necesidad de comprobar los resultados obtenidos en células inmortalizadas utilizando una fuente celular no inmortalizada (cultivos primarios normales), tal como se sugirió previamente (C. Pan et al., 2009).

Para dilucidar los mecanismos asociados al efecto pro-proliferativo de los compuestos seleccionados, los cultivos establecidos utilizando dichos compuestos se analizaron para determinar niveles de expresión de determinados genes relacionados con la fisiología del queratinocito humano. De este modo, se pudo comprobar que las tres condiciones experimentales seleccionadas en base a los estudios realizados sobre células inmortalizadas se asociaron a un aumento significativo de los genes de proliferación celular *PCNA* o *MKI67*, lo cual confirma el papel pro-proliferativo de los diferentes compuestos bioactivos. Por un lado, el gen *PCNA* es un marcador de proliferación celular ampliamente utilizado para evaluar la proliferación en diferentes tipos de células humanas (Juríková et al., 2016; J. Pan & Zhang, 2021; Shen et al., 2021). El producto de este gen es un antígeno nuclear de proliferación celular

(*proliferating cell nuclear antigen*) que juega un importante papel en diferentes procesos relacionados con la replicación de ADN, la regulación de diferentes vías de señalización intranucleares y el mantenimiento de los telómeros (Shen et al., 2021). Por otro lado, el gen *MKI67* codifica una proteína utilizada ampliamente como marcador de proliferación de células y tejidos humanos debido a su relación con la mitosis celular y la progresión del ciclo celular (Razmi et al., 2024). De hecho, se ha demostrado que esta proteína es esencial para la formación de la envoltura pericromosómica que rodea a los cromosomas durante la mitosis (Sun & Kaufman, 2018). Ambos marcadores se han utilizado frecuentemente para determinar la proliferación de cultivos celulares de queratinocitos de la piel humana (Endo et al., 2021).

Junto con los marcadores de proliferación *PCNA* y *MKI67*, los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral evaluaron el comportamiento de distintos genes relacionados con diferenciación epitelial, así como con la síntesis de diferentes componentes fundamentales de las células epiteliales, tales como las citoqueratinas, las uniones intercelulares y la membrana basal. A este respecto, nuestros resultados mostraron que, por un lado, la utilización de AM se asoció a un aumento significativo de la expresión de ciertos genes relacionados con todas estas funciones, incluyendo genes relacionados con la síntesis de un componente de las uniones intercelulares, un componente de la membrana basal y una citoqueratina (citoqueratina 3), así como del gen que codifica para biglicán. Este último componente es un proteoglicano que juega un papel importante en la homeostasis de la matriz extracelular, pero que también es capaz de regular la función de los queratinocitos humanos, incrementando su presencia en la superficie de los queratinocitos diferenciados, tal como se demostró previamente (Bianco et al., 1990). Aunque la mayor parte de los genes analizados no experimentó ningún cambio significativo, el hecho de que determinados genes mostraron un incremento de su expresión tras el cultivo con AM sugiere que este compuesto podría contribuir a mantener las células cultivadas en un estado de diferenciación queratinocítico.

Por otro lado, el cultivo en presencia de EF se asoció, asimismo, a variaciones significativas en la expresión de determinados genes relacionados con función queratinocítica. Al igual que en el caso del AM, la mayor parte de los genes analizados no sufrió ningún cambio significativo, aunque sí se encontró un aumento significativo del gen que codifica para biglicán, lo cual vuelve a sugerir que estos compuestos podrían contribuir al mantenimiento de la diferenciación queratinocítica de las células mantenidas en cultivo. Sin embargo, en el caso del EF, se encontró una disminución

significativa en la expresión de los genes que codifican para filagrina, dos uniones intercelulares y dos citoqueratinas, respecto a las células cultivadas en medio carente de este compuesto bioactivo. Por último, los cultivos establecidos en presencia de OLP mostraron un incremento en la expresión del gen que codifica para una proteína de unión intercelular, mientras que se encontró una disminución en otro gen relacionado con uniones intercelulares y en tres genes relacionados con citoqueratinas. En ambos casos (EF y OLP), estos resultados parecen indicar un estado de diferenciación intermedio, en el que habría un incremento en la expresión de determinados genes relacionados con diferenciación queratinocítica, junto con una disminución de otros genes igualmente relacionados con esta función. Estos resultados dispares, junto con el hecho de que la mayor parte de los genes no modificaron su expresión (con la excepción arriba indicada de los genes de proliferación celular), nos llevan a concluir que, probablemente, las células cultivadas en presencia de ambos compuestos bioactivos mantienen niveles intermedios de diferenciación celular en cultivos *ex vivo*. A este respecto, es importante señalar que la mayor parte de las células mantenidas en cultivo experimentan un incremento de su proliferación celular asociado a una disminución de los niveles de diferenciación celular (Guillouzo et al., 2007; Pignatelli, 1993). Sin embargo, su implante *in vivo* en animales de experimentación es capaz de revertir este fenotipo, obteniéndose células con escasa capacidad de proliferación y altos niveles de diferenciación celular (Alfonso-Rodríguez et al., 2015; Garzón et al., 2009; Martín-Piedra et al., 2017).

Finalmente, en la presente Tesis Doctoral se evaluó el efecto de los componentes seleccionados utilizando un modelo tridimensional de tejido artificial generado por IT. Los resultados de estos estudios mostraron un incremento en la tasa de proliferación de las células epiteliales que constituían la epidermis del tejido artificial, tanto en el grupo de EF como en el de la OLP, lográndose incrementar el porcentaje de células positivas para los marcadores de proliferación celular PCNA o KI67, aunque únicamente en determinados días de seguimiento. Tal como ocurría en los cultivos bidimensionales, el incremento de la tasa de proliferación celular en el tejido artificial podría contribuir a desarrollar modelos de piel artificial en un tiempo reducido, lo cual redundaría en una mejora significativa del tratamiento a aplicar en pacientes grandes quemados en los que el tiempo del tratamiento constituye un factor crucial para la supervivencia (Gacto-Sanchez, 2017).

Junto con la proliferación, se analizó la diferenciación epidérmica en los modelos de piel artificial generados en presencia de los diferentes compuestos bioactivos. De este

modo, se encontró un mayor desarrollo epitelial (espesor y número de estratos) en la piel artificial generada en presencia de EF tras 8 y 12 días de cultivo *ex vivo*. Además, la generación de piel artificial en presencia de EF logró incrementar la presencia de dos marcadores de diferenciación epidérmica (involucrina y citoqueratinas determinadas mediante el marcador AE1-AE3). Estos hallazgos nos permiten concluir que la utilización de los diversos compuestos bioactivos derivados del aceite de oliva, que ya demostraron un efecto biológico significativo en cultivos bidimensionales, se asocia asimismo a un efecto sobre la diferenciación de los sustitutos de piel artificial generados mediante IT. En concreto, estos resultados permiten afirmar que la utilización de EF, a la concentración determinada en esta Tesis Doctoral, resultó útil a la hora de potenciar la formación de un estrato epidérmico de mayor desarrollo respecto al CTR, existiendo un epitelio más grueso y con mayor número de capas celulares, en comparación con el grupo CTR. De este modo, podemos inferir que la utilización de este compuesto podría contribuir a desarrollar piel artificial con mayores niveles de diferenciación epidérmica y a disminuir el tiempo requerido para la fabricación de la piel artificial contribuyendo, por tanto, a mejorar el grado de biomimetismo de estos tejidos artificiales respecto a la piel humana nativa. A este respecto, desarrollar sustitutos tisulares capaces de reproducir con exactitud la estructura de los tejidos nativos es uno de los principales retos de la IT actual (Tian et al., 2024).

Por el contrario, la generación de piel artificial utilizando otros compuestos bioactivos no resultó en un incremento de la diferenciación epidérmica, llegando incluso, a disminuir los niveles de diferenciación en determinados casos. En concreto, llama la atención el hecho de que el AM, que contribuyó significativamente a incrementar la proliferación celular en cultivos 2D, no logró demostrar un efecto similar en los tejidos artificiales y, además, se asoció a una reducción de la diferenciación del epitelio de la piel artificial. Este hecho no es sorprendente, si se tiene en cuenta que el AM ya demostró su efecto inhibitorio de ciertos genes relacionados con diferenciación celular, como se observó en los estudios de expresión génica anteriormente mencionados, y lleva a pensar que el AM podría jugar un papel importante en el mantenimiento del estado de indiferenciación parcial de las células cultivadas. De hecho, algunos autores ya describieron la capacidad de este compuesto para inhibir ciertas funciones celulares, tales como la función osteoclástica (Li et al., 2011) o la liberación de mediadores de la inflamación (Ooi et al., 2021), así como la activación de determinadas rutas celulares como la apoptosis (Yang et al., 2015). En el caso de la piel artificial, estos resultados avalarían el uso de AM durante la fabricación de sustitutos de piel humana mediante IT en los que se desee generar un producto con niveles parciales de diferenciación celular y tisular,

como es el caso de los ensayos *ex vivo* para el estudio de rutas genéticas y parámetros histológicos de desarrollo de la piel humana en cultivo.

En conjunto, en la presente Tesis Doctoral se ha podido demostrar el papel biológico que podrían jugar determinados compuestos bioactivos derivados del aceite de oliva a la hora de optimizar los actuales protocolos de cultivo celular de queratinocitos de la piel humana, encontrando determinadas condiciones experimentales en las que se lograba potenciar la proliferación celular sin disminuir la viabilidad. Asimismo, se comprobó que ciertas condiciones de cultivo podían incrementar la fabricación de sustitutos de piel artificial basados en biomateriales de fibrina-agarosa, generándose, en determinados casos, tejidos artificiales con mayores niveles de diferenciación epitelial y, en otros casos, tejidos artificiales con menor grado de diferenciación epitelial. Todo ello permite poner a disposición de los investigadores protocolos optimizados de cultivo celular y de IT, adaptables a necesidades específicas.

CONCLUSIONES

De los resultados de la presente Tesis Doctoral, podemos inferir las siguientes conclusiones:

1. El análisis de los efectos de los compuestos bioactivos del aceite de oliva sobre la viabilidad de los queratinocitos de la piel humana mostró que los cuatro compuestos analizados presentaban excelente biocompatibilidad, asociándose a elevados niveles de viabilidad celular determinada mediante las técnicas de LIVE/DEAD y cuantificación de ADN liberado al medio, excepto en las concentraciones más altas, en las que se apreció una disminución de este parámetro. A su vez, el análisis de proliferación celular demostró un efecto pro-proliferativo cuando se utilizaron diversas concentraciones de cada uno de los compuestos, existiendo diferencias significativas respecto al grupo control para determinadas condiciones.
2. Los resultados de los análisis de viabilidad y proliferación celular nos permiten seleccionar, como condiciones experimentales óptimas a la hora de incrementar la proliferación celular sin afectar la viabilidad celular, las concentraciones de 5 µg/mL de ácido maslínico (AM5), 10 µg/mL de extracto fenólico (EF10) y 5 µg/mL de oleuropeína (OLP5), que mostraron diferencias significativas respecto al grupo control. Estas condiciones experimentales demostraron, asimismo, su potencial para optimizar los actuales protocolos de generación de cultivos primarios de queratinocitos a partir de biopsias de piel humana, observándose un incremento en la eficiencia de dichos protocolos, especialmente, cuando se utilizó ácido maslínico a la concentración de 5 µg/mL, seguida del extracto fenólico a 10 µg/mL. Estos resultados fueron corroborados a nivel de expresión génica y demuestran la capacidad de estos compuestos para incrementar rutas genéticas relacionadas con proliferación celular y para modular otras rutas relacionadas con diferenciación celular.
3. La aplicación de protocolos de Ingeniería Tisular basados en biomateriales biocompatibles de fibrina-agarosa y cultivos de células de la piel humana permitió generar en el laboratorio nuevos modelos de piel artificial humana que incorporaban los nuevos compuestos bioactivos derivados del aceite de oliva. Estos sustitutos de la piel humana generados con los agentes bioactivos previamente seleccionados en los estudios llevados a cabo sobre cultivos celulares mostraron la presencia de un estroma artificial compuesto por biomateriales y células estromales, y de un epitelio constituido por queratinocitos de aspecto normal.

4. La evaluación de los nuevos modelos de piel artificial generados mediante Ingeniería Tisular reveló elevados niveles de biomimetismo respecto a la piel utilizada como control. Sin embargo, el uso de extracto fenólico se asoció a una mayor proliferación de las células del epitelio de la piel artificial, así como a mayores niveles de diferenciación epidérmica, lo cual apoya su utilización para el tratamiento de pacientes afectados de grandes quemaduras utilizando tejidos artificiales con mayor diferenciación. A su vez, la oleuropeína contribuyó a incrementar el desarrollo y la proliferación del epitelio, sin modificar la diferenciación epidérmica. Finalmente, el uso de ácido maslínico se asoció a menores niveles de diferenciación epitelial, por lo que su aplicación podría servir para generar piel artificial con menor diferenciación epidérmica para experimentación *ex vivo* y otras aplicaciones que requieran menores niveles diferenciativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abate, M., Citro, M., Pisanti, S., Caputo, M., & Martinelli, R. (2021). Keratinocytes Migration Promotion, Proliferation Induction, and Free Radical Injury Prevention by 3-Hydroxytyrosol. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2438. <https://doi.org/10.3390/ijms22052438>
2. Agra, L. C., Ferro, J. N. S., Barbosa, F. T., & Barreto, E. (2015). Triterpenes with healing activity: A systematic review. *The Journal of Dermatological Treatment*, 26(5), 465–470. <https://doi.org/10.3109/09546634.2015.1021663>
3. Ahamad, J., Toufееq, I., Khan, M. A., Ameen, M. S. M., Anwer, E. T., Uthirapathy, S., Mir, S. R., & Ahmad, J. (2019). Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. *Phytotherapy Research: PTR*, 33(12), 3112–3128. <https://doi.org/10.1002/ptr.6511>
4. Alaminos, M., Del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Muñoz-Avila, J. I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., & Campos, A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(8), 3311–3317. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1647>
5. Alfonso-Rodríguez, C. A., González-Andrades, E., Jaimes-Parra, B. D., Fernández-Valadés, R., Campos, A., Sánchez-Quevedo, M. C., Alaminos, M., & Garzón, I. (2015). Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes. *Histology and Histopathology*, 30(11), 1321–1332.
6. Allen, B. N., Wang, Q., Filali, Y., Worthington, K. S., & Kacmarynski, D. S. F. (2022). Full-Thickness Oral Mucoperiosteal Defects: Challenges and Opportunities. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 28(4), 813–829. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0044>
7. Aparicio-Soto, M., Sánchez-Hidalgo, M., Rosillo, M. Á., Castejón, M. L., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2016). Extra virgin olive oil: A key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food & Function*, 7(11), 4492–4505. <https://doi.org/10.1039/c6fo01094f>
8. Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, 32(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
9. Bae, H. J., Kim, J., Kim, J., Goo, N., Cai, M., Cho, K., Jung, S. Y., Kwon, H., Kim, D. H., Jang, D. S., & Ryu, J. H. (2020). The effect of maslinic acid on cognitive dysfunction induced by cholinergic blockade in mice. *British Journal of Pharmacology*, 177(14), 3197–3209. <https://doi.org/10.1111/bph.15042>
10. Bai, X., Zhang, Y., Jiang, H., Yang, P., Li, H., Zhang, Y., & He, P. (2016). Effects of maslinic acid on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 117–122. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4552>
11. Bandeira, F., Goh, T.-W., Setiawan, M., Yam, G. H.-F., & Mehta, J. S. (2020). Cellular therapy of corneal epithelial defect by adipose mesenchymal stem cell-derived epithelial progenitors. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1533-1>
12. Barzegar, F., Zaefizadeh, M., Yari, R., & Salehzadeh, A. (2019). Synthesis of Nano-Paramagnetic Oleuropein to Induce KRAS Over-Expression: A New Mechanism to Inhibit AGS Cancer Cells. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(7), 388. <https://doi.org/10.3390/medicina55070388>
13. Batarfi, W. A., Mohd Yunus, M. H., & Hamid, A. A. (2023). The Effect of Hydroxytyrosol in Type II Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Skin Wound Healing. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(6), 2652. <https://doi.org/10.3390/molecules28062652>
14. Bayry, J., & Radstake, T. R. (2013). Immune-mediated inflammatory diseases: Progress in molecular pathogenesis and therapeutic strategies. *Expert Review of Clinical Immunology*, 9(4), 297–299. <https://doi.org/10.1586/eci.13.10>
15. Benincasa, C., La Torre, C., Fazio, A., Perri, E., Caroleo, M. C., Plastina, P., & Cione, E. (2021). Identification of Tyrosyl Oleate as a Novel Olive Oil Lipophenol with

Proliferative and Antioxidant Properties in Human Keratinocytes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1051. <https://doi.org/10.3390/antiox10071051>

16. Bermudez, B., Lopez, S., Ortega, A., Varela, L. M., Pacheco, Y. M., Abia, R., & Muriana, F. J. G. (2011). Oleic acid in olive oil: From a metabolic framework toward a clinical perspective. *Current Pharmaceutical Design*, 17(8), 831–843. <https://doi.org/10.2174/138161211795428957>

17. Bertelli, M., Kiani, A. K., Paolacci, S., Manara, E., Kurti, D., Dhuli, K., Bushati, V., Miertus, J., Pangallo, D., Baglivo, M., Beccari, T., & Michelini, S. (2020). Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *Journal of Biotechnology*, 309, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.016>

18. Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1), 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>

19. Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., & Robey, P. G. (1990). Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 38(11), 1549–1563. <https://doi.org/10.1177/38.11.2212616>

20. Blanco-Elices, C., Oruezabal, R. I., Sánchez-Porras, D., Chato-Astrain, J., Campos, F., Alaminos, M., Garzón, I., & Campos, A. (2023). A novel 3D biofabrication strategy to improve cell proliferation and differentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells for cell therapy and tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1235161. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1235161>

21. Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann, T., & Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 36(4), 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.08.016>

22. Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214(4), 516–559. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>

23. Butt, M. S., Tariq, U., lahtisham-Ul-Haq, null, Naz, A., & Rizwan, M. (2021). Neuroprotective effects of oleuropein: Recent developments and contemporary research. *Journal of Food Biochemistry*, 45(12), e13967. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13967>

24. Buznyk, O., Pasychnikova, N., Islam, M. M., Iakymenko, S., Fagerholm, P., & Griffith, M. (2015). Bioengineered Corneas Grafted as Alternatives to Human Donor Corneas in Three High-Risk Patients. *Clinical and Translational Science*, 8(5), 558–562. <https://doi.org/10.1111/cts.12293>

25. Campos, A. (2019). Ingeniería Tisular, Universidad y Sistema de Salud. *ANALES RANM*, 136(02), 124–130. <https://doi.org/10.32440/ar.2019.136.02.rev06>

26. Carranco, N., Farrés-Cebrián, M., Saurina, J., & Núñez, O. (2018). Authentication and Quantitation of Fraud in Extra Virgin Olive Oils Based on HPLC-UV Fingerprinting and Multivariate Calibration. *Foods*, 7(4), 44. <https://doi.org/10.3390/foods7040044>

27. Carresi, C., Scicchitano, M., Scarano, F., Macrì, R., Bosco, F., Nucera, S., Ruga, S., Zito, M. C., Mollace, R., Guarnieri, L., Coppoletta, A. R., Gliozzi, M., Musolino, V., Maiuolo, J., Palma, E., & Mollace, V. (2021). The Potential Properties of Natural Compounds in Cardiac Stem Cell Activation: Their Role in Myocardial Regeneration. *Nutrients*, 13(1), 275. <https://doi.org/10.3390/nu13010275>

28. Carriel, V., Garzón, I., Jiménez, J.-M., Oliveira, A.-C.-X., Arias-Santiago, S., Campos, A., Sánchez-Quevedo, M.-C., & Alaminos, M. (2012a). Epithelial and Stromal Developmental Patterns in a Novel Substitute of the Human Skin Generated with Fibrin-Agarose Biomaterials. *Cells Tissues Organs*, 196(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000330682>

29. Carriel, V., Garzón, I., Jiménez, J.-M., Oliveira, A.-C.-X., Arias-Santiago, S., Campos, A., Sánchez-Quevedo, M.-C., & Alaminos, M. (2012b). Epithelial and Stromal Developmental Patterns in a Novel Substitute of the Human Skin Generated with Fibrin-Agarose Biomaterials. *Cells Tissues Organs*, *196*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000330682>
30. Cases-Perera, O., Blanco-Elices, C., Chato-Astrain, J., Miranda-Fernández, C., Campos, F., Crespo, P. V., Sánchez-Montesinos, I., Alaminos, M., Martín-Piedra, M. A., & Garzón, I. (2022). Development of secretome-based strategies to improve cell culture protocols in tissue engineering. *Scientific Reports*, *12*(1), 10003. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14115-y>
31. Chalak, M., Hesaraki, M., Mirbahari, S. N., Yeganeh, M., Abdi, S., Rajabi, S., & Hemmatzadeh, F. (2024). Cell Immortality: In Vitro Effective Techniques to Achieve and Investigate Its Applications and Challenges. *Life (Basel, Switzerland)*, *14*(3), 417. <https://doi.org/10.3390/life14030417>
32. Chato-Astrain, J., Sánchez-Porras, D., García-García, Ó. D., Vairo, C., Villar-Vidal, M., Villullas, S., Sánchez-Montesinos, I., Campos, F., Garzón, I., & Alaminos, M. (2021). Improvement of Cell Culture Methods for the Successful Generation of Human Keratinocyte Primary Cell Cultures Using EGF-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *Biomedicines*, *9*(11), 1634. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111634>
33. Chua, A. W. C., Khoo, Y. C., Tan, B. K., Tan, K. C., Foo, C. L., & Chong, S. J. (2016). Skin tissue engineering advances in severe burns: Review and therapeutic applications. *Burns & Trauma*, *4*, 3. <https://doi.org/10.1186/s41038-016-0027-y>
34. Covas, M.-I., de la Torre, R., & Fitó, M. (2015). Virgin olive oil: A key food for cardiovascular risk protection. *The British Journal of Nutrition*, *113* Suppl 2, S19-28. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000136>
35. Czyz, C. M., Kunth, P. W., Gruber, F., Kremslehner, C., Hammers, C. M., & Hundt, J. E. (2023). Requisite instruments for the establishment of three-dimensional epidermal human skin equivalents-A methods review. *Experimental Dermatology*, *32*(11), 1870–1883. <https://doi.org/10.1111/exd.14911>
36. D'Angelo, C., Franceschelli, S., Quiles, J. L., & Speranza, L. (2020). Wide Biological Role of Hydroxytyrosol: Possible Therapeutic and Preventive Properties in Cardiovascular Diseases. *Cells*, *9*(9), 1932. <https://doi.org/10.3390/cells9091932>
37. De Santis, S., Cariello, M., Piccinin, E., Sabbà, C., & Moschetta, A. (2019). Extra Virgin Olive Oil: Lesson from Nutrigenomics. *Nutrients*, *11*(9), 2085. <https://doi.org/10.3390/nu11092085>
38. Díaz-Valenzuela, A., García-Fernández, F. P., Carmona Fernández, P., Valle Cañete, M. J., & Pancorbo-Hidalgo, P. L. (2019). Effectiveness and safety of olive oil preparation for topical use in pressure ulcer prevention: Multicentre, controlled, randomised, and double-blinded clinical trial. *International Wound Journal*, *16*(6), 1314–1322. <https://doi.org/10.1111/iwj.13191>
39. Ditano-Vázquez, P., Torres-Peña, J. D., Galeano-Valle, F., Pérez-Caballero, A. I., Demelo-Rodríguez, P., Lopez-Miranda, J., Katsiki, N., Delgado-Lista, J., & Alvarez-Sala-Walther, L. A. (2019). The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. *Nutrients*, *11*(11), 2833. <https://doi.org/10.3390/nu11112833>
40. Donato-Trancoso, A., Monte-Alto-Costa, A., & Romana-Souza, B. (2016). Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. *Journal of Dermatological Science*, *83*(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.03.012>
41. Egea-Guerrero, J. J., Carmona, G., Correa, E., Mata, R., Arias-Santiago, S., Alaminos, M., Gacto, P., & Cuende, N. (2019). Transplant of Tissue-Engineered Artificial Autologous Human Skin in Andalusia: An Example of Coordination and Institutional Collaboration. *Transplantation Proceedings*, *51*(9), 3047–3050. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.08.014>

42. Endo, Y., Yoshida, H., Ota, Y., Akazawa, Y., Sayo, T., Hanai, U., Imagawa, K., Sasaki, M., & Takahashi, Y. (2021). Accelerated human epidermal turnover driven by increased hyaluronan production. *Journal of Dermatological Science*, *101*(2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.12.002>
43. Evans, D. G. R. (2009). Neurofibromatosis 2 [Bilateral acoustic neurofibromatosis, central neurofibromatosis, NF2, neurofibromatosis type II]. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *11*(9), 599–610. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ac9a27>
44. Fatimah, S. S., Chua, K., Tan, G. C., Azmi, T. I., Tan, A. E., & Abdul Rahman, H. (2013). Organotypic culture of human amnion cells in air-liquid interface as a potential substitute for skin regeneration. *Cytotherapy*, *15*(8), 1030–1041. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.003>
45. Finicelli, M., Di Salle, A., Galderisi, U., & Peluso, G. (2022). The Mediterranean Diet: An Update of the Clinical Trials. *Nutrients*, *14*(14), 2956. <https://doi.org/10.3390/nu14142956>
46. Finicelli, M., Squillaro, T., Di Cristo, F., Di Salle, A., Melone, M. A. B., Galderisi, U., & Peluso, G. (2019). Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5807–5826. <https://doi.org/10.1002/jcp.27506>
47. François, P., Giraud, L., Veran, J., Bertrand, B., Dumoulin, C., Aboudou, H., Grimaud, F., Vogtensperger, M., Velier, M., Arnaud, L., Lyonnet, L., Simoncini, S., Guillet, B., Dignat-George, F., Magalon, J., & Sabatier, F. (2020). Development and Validation of a Fully GMP-Compliant Process for Manufacturing Stromal Vascular Fraction: A Cost-Effective Alternative to Automated Methods. *Cells*, *9*(10), 2158. <https://doi.org/10.3390/cells9102158>
48. Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature*, *445*(7130), 834–842. <https://doi.org/10.1038/nature05659>
49. Fuchs, E. (2016). Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address. *Current Topics in Developmental Biology*, *116*, 357–374. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.033>
50. Fuchs, E., & Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews. Genetics*, *3*(3), 199–209. <https://doi.org/10.1038/nrg758>
51. Gacto-Sanchez, P. (2017). Surgical treatment and management of the severely burn patient: Review and update. *Medicina Intensiva*, *41*(6), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2017.02.008>
52. Gan, Q., Lin, C., Lu, C., Chang, Y., Che, Q., Zhang, G., Zhu, T., Gu, Q., Wu, Z., Li, M., & Li, D. (2020). Staprexanthonones, Xanthone-Type Stimulators of Pancreatic β -Cell Proliferation from a Mangrove Endophytic Fungus. *Journal of Natural Products*, *83*(10), 2996–3003. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00535>
53. Gantenbein, K. V., & Kanaka-Gantenbein, C. (2021). Mediterranean Diet as an Antioxidant: The Impact on Metabolic Health and Overall Wellbeing. *Nutrients*, *13*(6), 1951. <https://doi.org/10.3390/nu13061951>
54. García-Martínez, O., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Ruiz, C., Milia, E., Lorenzo, M. L., Jimenez, B., Sánchez-Ortiz, A., & Rivas, A. (2016). Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. *PLOS ONE*, *11*(3), e0150045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150045>
55. Garzón, I., Martín-Piedra, M. A., & Alaminos, M. (2015). Human Dental Pulp Stem Cells. A promising epithelial-like cell source. *Medical Hypotheses*, *84*(5), 516–517. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.02.020>
56. Garzón, I., Miyake, J., González-Andrades, M., Carmona, R., Carda, C., Sánchez-Quevedo, M. del C., Campos, A., & Alaminos, M. (2013). Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, *2*(8), 625–632. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0157>

57. Garzón, I., Sánchez-Quevedo, M. C., Moreu, G., González-Jaranay, M., González-Andrades, M., Montalvo, A., Campos, A., & Alaminos, M. (2009). In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *Journal of Periodontal Research*, 44(5), 588–597. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01159.x>
58. Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R. W., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., Vias, M., & Cancer Research UK. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*, 111(6), 1021–1046. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>
59. Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>
60. Giner, E., Recio, M. C., Ríos, J. L., Cerdá-Nicolás, J. M., & Giner, R. M. (2016). Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(2), 242–255. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500605>
61. Gómez, C., Galán, J. M., Torrero, V., Ferreiro, I., Pérez, D., Palao, R., Martínez, E., Llamas, S., Meana, A., & Holguín, P. (2011). Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: Clinical and functional outcomes. A multicentric study. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 37(4), 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.10.005>
62. Gonçalves, M., Aiello, A., Rodríguez-Pérez, M., Accardi, G., Burgos-Ramos, E., & Silva, P. (2024). Olive Oil Components as Novel Antioxidants in Neuroblastoma Treatment: Exploring the Therapeutic Potential of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Nutrients*, 16(6), 818. <https://doi.org/10.3390/nu16060818>
63. González-Acedo, A., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montes, R., Costela-Ruiz, V. J., Ruiz, C., Melguizo-Rodríguez, L., & García-Martínez, O. (2023). The Benefits of Olive Oil for Skin Health: Study on the Effect of Hydroxytyrosol, Tyrosol, and Oleocanthal on Human Fibroblasts. *Nutrients*, 15(9), 2077. <https://doi.org/10.3390/nu15092077>
64. González-Andrades, M., Mata, R., González-Gallardo, M. D. C., Medialdea, S., Arias-Santiago, S., Martínez-Atienza, J., Ruiz-García, A., Pérez-Fajardo, L., Lizana-Moreno, A., Garzón, I., Campos, A., Alaminos, M., Carmona, G., & Cuende, N. (2017). A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open*, 7(9), e016487. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016487>
65. González-Gallardo, C., Martínez-Atienza, J., Mataix, B., Muñoz-Ávila, J. I., Daniel Martínez-Rodríguez, J., Medialdea, S., Ruiz-García, A., Lizana-Moreno, A., Arias-Santiago, S., de la Rosa-Fraile, M., Garzon, I., Campos, A., Cuende, N., Alaminos, M., González-Andrades, M., & Mata, R. (2023). Successful restoration of corneal surface integrity with a tissue-engineered allogeneic implant in severe keratitis patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 162, 114612. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114612>
66. Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 686. <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
67. Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., & Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003>
68. Gustin, P., & Prasad, A. (2024). EnduroBone: A 3D printed bioreactor for extended bone tissue culture. *HardwareX*, 18, e00535. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2024.e00535>

69. He, Y., Wang, Y., Yang, K., Jiao, J., Zhan, H., Yang, Y., Lv, D., Li, W., & Ding, W. (2022). Maslinic Acid: A New Compound for the Treatment of Multiple Organ Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(24), 8732. <https://doi.org/10.3390/molecules27248732>
70. Hess, R. D., Weber, F., Watson, K., & Schmitt, S. (2012). Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. *Vaccine*, 30(17), 2715–2727. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.015>
71. Hidalgo, M., Prieto, I., Abriouel, H., Villarejo, A. B., Ramírez-Sánchez, M., Cobo, A., Benomar, N., Gálvez, A., & Martínez-Cañamero, M. (2018). Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 73(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0650-1>
72. Hou, C.-C., Feng, M., Wang, K., & Yang, X.-G. (2013). Lanthanides inhibit adipogenesis with promotion of cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 5(6), 715–722. <https://doi.org/10.1039/c3mt00020f>
73. Hudson, L. G., & McCawley, L. J. (1998). Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microscopy Research and Technique*, 43(5), 444–455. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981201\)43:5<444::AID-JEMT10>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981201)43:5<444::AID-JEMT10>3.0.CO;2-C)
74. Hynds, R. E., Bonfanti, P., & Janes, S. M. (2018). Regenerating human epithelia with cultured stem cells: Feeder cells, organoids and beyond. *EMBO Molecular Medicine*, 10(2), 139–150. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708213>
75. Ionescu, A. M., Chato-Astrain, J., Cardona Pérez, J. de la C., Campos, F., Pérez Gómez, M., Alaminos, M., & Garzón Bello, I. (2020). Evaluation of the optical and biomechanical properties of bioengineered human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Journal of Biomedical Optics*, 25(5), 1–16. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.5.055002>
76. Jaber, H. M., Ebdah, S., Al Haj Mahmoud, S. A., Abu-Qatouseh, L., & Jaber, Y. H. (2024). Comparison of T cells mediated immunity and side effects of mRNA vaccine and conventional COVID-19 vaccines administrated in Jordan. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 20(1), 2333104. <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2333104>
77. Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>
78. Johnson, C. L., & Holbrook, K. A. (1989). Development of human embryonic and fetal dermal vasculature. *The Journal of Investigative Dermatology*, 93(2 Suppl), 10S-17S. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12580896>
79. Jost, M., Kari, C., & Rodeck, U. (2000). The EGF receptor—An essential regulator of multiple epidermal functions. *European Journal of Dermatology: EJD*, 10(7), 505–510.
80. Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š., & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, 118(5), 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>
81. Kamel, R. A., Ong, J. F., Eriksson, E., Junker, J. P. E., & Caterson, E. J. (2013). Tissue Engineering of Skin. *Journal of the American College of Surgeons*, 217(3), 533–555. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.03.027>
82. Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology: EJD*, 12(4), 390–399; quiz 400–401.
83. Karim, A., Rehman, A., Feng, J., Noreen, A., Assadpour, E., Kharazmi, M. S., Lianfu, Z., & Jafari, S. M. (2022). Alginate-based nanocarriers for the delivery and controlled-release of bioactive compounds. *Advances in Colloid and Interface Science*, 307, 102744. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102744>
84. Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health.

- Molecules* (Basel, Switzerland), 24(10), 2001. <https://doi.org/10.3390/molecules24102001>
85. Kil, Y.-S., Park, J., Han, A.-R., Woo, H. A., & Seo, E.-K. (2015). A new 9,10-dihydrophenanthrene and cell proliferative 3,4- δ -dehydrotocopherols from *Stemona tuberosa*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(4), 5965–5974. <https://doi.org/10.3390/molecules20045965>
86. Kim, D. Y., Won, K.-J., Yoon, M.-S., Hwang, D. I., Yoon, S. W., Park, J.-H., Kim, B., & Lee, H. M. (2015). Chrysanthemum boreale Makino essential oil induces keratinocyte proliferation and skin regeneration. *Natural Product Research*, 29(6), 562–564. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.952231>
87. Kim, J. H., Oh, E., Song, E. S., Yun, C. W., Lee, S. H., & Song, Y. S. (2023). Carboxylesterase-overexpressing hTERT-immortalized human adipose stem cells in prostate tumor growth inhibition by irinotecan. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 19(7), 1731–1742. https://doi.org/10.4103/jcrt.jcrt_1019_21
88. Kim, M., Kim, J., Shin, Y.-K., & Kim, K.-Y. (2020). Gentisic Acid Stimulates Keratinocyte Proliferation through ERK1/2 Phosphorylation. *International Journal of Medical Sciences*, 17(5), 626–631. <https://doi.org/10.7150/ijms.36484>
89. Koster, M. I., & Roop, D. R. (2007). Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 93–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123357>
90. Kraft, R., Herndon, D. N., Al-Mousawi, A. M., Williams, F. N., Finnerty, C. C., & Jeschke, M. G. (2012). Burn size and survival probability in paediatric patients in modern burn care: A prospective observational cohort study. *Lancet (London, England)*, 379(9820), 1013–1021. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61345-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61345-7)
91. Kwon, P. K., Kim, S. W., De, R., Jeong, S. W., & Kim, K.-T. (2021). Isoprocucumenol Supports Keratinocyte Growth and Survival through Epidermal Growth Factor Receptor Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12579. <https://doi.org/10.3390/ijms222212579>
92. Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
93. Lechler, T., & Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, 437(7056), 275–280. <https://doi.org/10.1038/nature03922>
94. Li, C., Yang, Z., Li, Z., Ma, Y., Zhang, L., Zheng, C., Qiu, W., Wu, X., Wang, X., Li, H., Tang, J., Qian, M., Li, D., Wang, P., Luo, J., & Liu, M. (2011). Maslinic acid suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by regulating RANKL-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(3), 644–656. <https://doi.org/10.1002/jbmr.242>
95. Lin, T.-K., Zhong, L., & Santiago, J. L. (2017). Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 70. <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>
96. Lozano-Castellón, J., López-Yerena, A., Domínguez-López, I., Siscart-Serra, A., Fraga, N., Sámano, S., López-Sabater, C., Lamuela-Raventós, R. M., Vallverdú-Queralt, A., & Pérez, M. (2022). Extra virgin olive oil: A comprehensive review of efforts to ensure its authenticity, traceability, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), 2639–2664. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12949>
97. Lozano-Mena, G., Sánchez-González, M., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2014). Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives—A promising nutraceutical? *Molecules* (Basel, Switzerland), 19(8), 11538–11559. <https://doi.org/10.3390/molecules190811538>
98. MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874–880. <https://doi.org/10.1038/nature05664>
99. Marcelino, G., Hiane, P. A., Freitas, K. de C., Santana, L. F., Pott, A., Donadon, J. R., & Guimarães, R. de C. A. (2019). Effects of Olive Oil and Its Minor Components on

- Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. *Nutrients*, 11(8), 1826. <https://doi.org/10.3390/nu11081826>
100. Martín-Peláez, S., Covas, M. I., Fitó, M., Kušar, A., & Pravst, I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 760–771. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200421>
101. Martín-Piedra, M. A., Alaminos, M., Fernández-Valadés-Gámez, R., España-López, A., Licerias-Licerias, E., Sánchez-Montesinos, I., Martínez-Plaza, A., Sánchez-Quevedo, M. C., Fernández-Valadés, R., & Garzón, I. (2017). Development of a multilayered palate substitute in rabbits: A histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(3), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1489-5>
102. Martín-Piedra, M. A., Alfonso-Rodríguez, C. A., Zapater, A., Durand-Herrera, D., Chato-Astrain, J., Campos, F., Sánchez-Quevedo, M. C., Alaminos, M., & Garzón, I. (2019). Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. *European Cells & Materials*, 37, 233–249. <https://doi.org/10.22203/eCM.v037a14>
103. Martín-Piedra, M. A., Carmona, G., Campos, F., Carriel, V., Fernández-González, A., Campos, A., Cuende, N., Garzón, I., Gacto, P., & Alaminos, M. (2023). Histological assessment of nanostructured fibrin-agarose skin substitutes grafted in burnt patients. A time-course study. *Bioengineering & Translational Medicine*, 8(6), e10572. <https://doi.org/10.1002/btm2.10572>
104. Martín-Piedra, M. A., Garzón, I., Oliveira, A. C., Alfonso-Rodríguez, C. A., Carriel, V., Scionti, G., & Alaminos, M. (2014). Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*, 16(2), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.10.016>
105. M'Boneko, V., & Merker, H. J. (1988). Development and morphology of the periderm of mouse embryos (days 9–12 of gestation). *Acta Anatomica*, 133(4), 325–336. <https://doi.org/10.1159/000146662>
106. Meana, A., Iglesias, J., Del Rio, M., Larcher, F., Madrugal, B., Fresno, M. F., Martín, C., San Roman, F., & Tevar, F. (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 24(7), 621–630. [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(98\)00107-7](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(98)00107-7)
107. Melguizo-Rodríguez, L., González-Acedo, A., Illescas-Montes, R., García-Recio, E., Ramos-Torrecillas, J., Costela-Ruiz, V. J., & García-Martínez, O. (2022). Biological effects of the olive tree and its derivatives on the skin. *Food & Function*, 13(22), 11410–11424. <https://doi.org/10.1039/d2fo01945k>
108. Merra, A., Maurizi, E., & Pellegrini, G. (2024). Impact of culture media on primary human corneal endothelial cells derived from old donors. *Experimental Eye Research*, 240, 109815. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109815>
109. Mirabelli, M., Chiefari, E., Arcidiacono, B., Corigliano, D. M., Brunetti, F. S., Maggisano, V., Russo, D., Foti, D. P., & Brunetti, A. (2020). Mediterranean Diet Nutrients to Turn the Tide against Insulin Resistance and Related Diseases. *Nutrients*, 12(4), 1066. <https://doi.org/10.3390/nu12041066>
110. Mokhtari, K., Pérez-Jiménez, A., García-Salguero, L., A Lupiáñez, J., & Rufino-Palomares, E. E. (2020). Unveiling the Differential Antioxidant Activity of Maslinic Acid in Murine Melanoma Cells and in Rat Embryonic Healthy Cells Following Treatment with Hydrogen Peroxide. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 4020. <https://doi.org/10.3390/molecules25174020>
111. Mokhtari, K., Rufino-Palomares, E. E., Pérez-Jiménez, A., Reyes-Zurita, F. J., Figuera, C., García-Salguero, L., Medina, P. P., Peragón, J., & Lupiáñez, J. A. (2015). Maslinic Acid, a Triterpene from Olive, Affects the Antioxidant and Mitochondrial Status of B16F10 Melanoma Cells Grown under Stressful Conditions. *Evidence-Based*

- Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2015, 272457. <https://doi.org/10.1155/2015/272457>
112. Moll, I., Roessler, M., Brandner, J. M., Eispert, A.-C., Houdek, P., & Moll, R. (2005). Human Merkel cells – aspects of cell biology, distribution and functions. *European Journal of Cell Biology*, 84(2–3), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.023>
113. Moral, R., & Escrich, E. (2022). Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(2), 477. <https://doi.org/10.3390/molecules27020477>
114. Mssillou, I., Bakour, M., Slighoua, M., Laaroussi, H., Saghrouchni, H., Ez-Zahra Amrati, F., Lyoussi, B., & Derwich, E. (2022). Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 298, 115663. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115663>
115. Murillo-Carretero, M., Geribaldi-Doldán, N., Flores-Giubi, E., García-Bernal, F., Navarro-Quiroz, E. A., Carrasco, M., Macías-Sánchez, A. J., Herrero-Foncubierta, P., Delgado-Ariza, A., Verástegui, C., Domínguez-Riscart, J., Daoubi, M., Hernández-Galán, R., & Castro, C. (2017). ELAC (3,12-di-O-acetyl-8-O-tigloilingol), a plant-derived lathyrane diterpene, induces subventricular zone neural progenitor cell proliferation through PKC β activation. *British Journal of Pharmacology*, 174(14), 2373–2392. <https://doi.org/10.1111/bph.13846>
116. Musumeci, G., Trovato, F. M., Pichler, K., Weinberg, A. M., Loreto, C., & Castrogiovanni, P. (2013). Extra-virgin olive oil diet and mild physical activity prevent cartilage degeneration in an osteoarthritis model: An in vivo and in vitro study on lubricin expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2064–2075. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.07.007>
117. Nourian Dehkordi, A., Mirahmadi Babaheydari, F., Chehelgerdi, M., & Raeisi Dehkordi, S. (2019). Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>
118. Nyström, A., & Bruckner-Tuderman, L. (2019). Matrix molecules and skin biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 89, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.07.025>
119. Omar, S., Scott, C., Hamlin, A., & Obied, H. (2018). Olive Biophenols Reduces Alzheimer's Pathology in SH-SY5Y Cells and APP^{swe} Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 125. <https://doi.org/10.3390/ijms20010125>
120. Ooi, B. K., Phang, S. W., Yong, P. V. C., Chellappan, D. K., Dua, K., Khaw, K.-Y., Goh, B. H., Pusparajah, P., & Yap, W. H. (2021). In vitro evaluation of the involvement of Nrf2 in maslinic acid-mediated anti-inflammatory effects in atheroma pathogenesis. *Life Sciences*, 278, 119658. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119658>
121. Ortiz-Arrabal, O., Irastorza-Lorenzo, A., Campos, F., Martín-Piedra, M. Á., Carriel, V., Garzón, I., Ávila-Fernández, P., de Frutos, M. J., Esteban, E., Fernández, J., Janer, A., Campos, A., Chato-Astrain, J., & Alaminos, M. (2023). Fibrin and Marine-Derived Agaroses for the Generation of Human Bioartificial Tissues: An Ex Vivo and In Vivo Study. *Marine Drugs*, 21(3), 187. <https://doi.org/10.3390/md21030187>
122. Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 38(8), 647–659. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00061-2)
123. Pan, C., Kumar, C., Bohl, S., Klingmueller, U., & Mann, M. (2009). Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 8(3), 443–450. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800258-MCP200>

124. Pan, J., & Zhang, J. (2021). Research Progress of PCNA in Reproductive System Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2021, 2391917. <https://doi.org/10.1155/2021/2391917>
125. Parisio, C., Lucarini, E., Micheli, L., Toti, A., Bellumori, M., Cecchi, L., Calosi, L., Bani, D., Di Cesare Mannelli, L., Mulinacci, N., & Ghelardini, C. (2020). Extra virgin olive oil and related by-products (*Olea europaea* L.) as natural sources of phenolic compounds for abdominal pain relief in gastrointestinal disorders in rats. *Food & Function*, 11(12), 10423–10435. <https://doi.org/10.1039/d0fo02293d>
126. Pasban-Aliabadi, H., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Mehdizadeh, A., & Yaghoobi, M. M. (2013). Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. *Rejuvenation Research*, 16(2), 134–142. <https://doi.org/10.1089/rej.2012.1384>
127. Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 5(5), 208–229. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0506>
128. Pérez, A. G., León, L., Pascual, M., Romero-Segura, C., Sánchez-Ortiz, A., de la Rosa, R., & Sanz, C. (2014). Variability of virgin olive oil phenolic compounds in a segregating progeny from a single cross in *Olea europaea* L. and sensory and nutritional quality implications. *PloS One*, 9(3), e92898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092898>
129. Pignatelli, M. (1993). Models of colorectal tumour differentiation. *Cancer Surveys*, 16, 3–13.
130. Piroddi, M., Albin, A., Fabiani, R., Giovannelli, L., Luceri, C., Natella, F., Rosignoli, P., Rossi, T., Taticchi, A., Servili, M., & Galli, F. (2017). Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *BioFactors (Oxford, England)*, 43(1), 17–41. <https://doi.org/10.1002/biof.1318>
131. Pojero, F., Aiello, A., Gervasi, F., Caruso, C., Ligotti, M. E., Calabrò, A., Procopio, A., Candore, G., Accardi, G., & Allegra, M. (2022). Effects of Oleuropein and Hydroxytyrosol on Inflammatory Mediators: Consequences on Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 380. <https://doi.org/10.3390/ijms24010380>
132. Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
133. Puttaswamy, N., Pavan Kumar, G. S., Al-Ghorbani, M., Vigneshwaran, V., Prabhakar, B. T., & Khanum, S. A. (2016). Synthesis and biological evaluation of salicylic acid conjugated isoxazoline analogues on immune cell proliferation and angiogenesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.052>
134. Razmi, M., Tajik, F., Hashemi, F., Yazdanpanah, A., Hashemi-Niasari, F., & Divsalar, A. (2024). The Prognostic Importance of Ki-67 in Gastrointestinal Carcinomas: A Meta-analysis and Multi-omics Approach. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s12029-024-01022-w>
135. Rebel, J. M., Thijssen, C. D., Vermey, M., Zwarthoff, E. C., & Van der Kwast, T. H. (1995). Modulation of intra-epithelial expansion of human T24 bladder-carcinoma cells in murine urothelium by growth factors and extracellular-matrix components. *International Journal of Cancer*, 60(5), 707–711. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910600523>
136. Rigacci, S., & Stefani, M. (2016). Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 843. <https://doi.org/10.3390/ijms17060843>
137. Rodríguez, G., Rodríguez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Jiménez, A. (2007). Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. *European Food Research and Technology*, 224(6), 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0366-1>

138. Roop, D. (1995). Defects in the Barrier. *Science*, 267(5197), 474–475. <https://doi.org/10.1126/science.7529942>
139. Ross, M. H., & Wojciech, P. (2016). *Histología: Texto y atlas: correlación con biología celular y molecular* (A. Alday & M. Giacomucci, Trans.; 7a edición). Wolters Kluwer.
140. Ruiz-Canela, M., & Martínez-González, M. A. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68(3), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.12.002>
141. Ruiz-López, J., Cardona, J. C., Garzón, I., Pérez, M. M., Alaminos, M., Chato-Astrain, J., & Ionescu, A. M. (2022). Optical Behavior of Human Skin Substitutes: Absorbance in the 200-400 nm UV Range. *Biomedicines*, 10(7), 1640. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071640>
142. Ruttanapattanakul, J., Wikan, N., Okonogi, S., Na Takuathung, M., Buacheen, P., Pitchakarn, P., Potikanond, S., & Nimlamool, W. (2021). Boesenbergia rotunda extract accelerates human keratinocyte proliferation through activating ERK1/2 and PI3K/Akt kinases. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 133, 111002. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111002>
143. Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12173–12182. <https://doi.org/10.1021/jf403154e>
144. Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., De Sanctis, P., Giovannini, C., D'Archivio, M., & Masella, R. (2018). Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 18(1), 36–50. <https://doi.org/10.2174/1871530317666171114114321>
145. Schroeder, M., & Zouboulis, C. C. (2007). All-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid: Pharmacokinetics and biological activity in different cell culture models of human keratinocytes. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 39(2), 136–140. <https://doi.org/10.1055/s-2007-961813>
146. Schularick, N. M., Clark, J. J., & Hansen, M. R. (2014). Primary culture of human vestibular schwannomas. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 89, 51093. <https://doi.org/10.3791/51093>
147. Ścieżyńska, A., Nogowska, A., Sikorska, M., Konys, J., Karpińska, A., Komorowski, M., Ołdak, M., & Malejczyk, J. (2019). Isolation and culture of human primary keratinocytes—A methods review. *Experimental Dermatology*, 28(2), 107–112. <https://doi.org/10.1111/exd.13860>
148. Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., Osorio, R., Durán, J. D. G., Alaminos, M., Campos, A., & López-López, M. T. (2014). Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 102(8), 2573–2582. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34929>
149. Shakouri, N., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Bucak, M. N. (2021). Antioxidant effects of supplementation of 3,4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(7), 1004–1014. <https://doi.org/10.1111/rda.13944>
150. Shamshoum, H., Vlavcheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors (Oxford, England)*, 43(4), 517–528. <https://doi.org/10.1002/biof.1366>
151. Shen, M., Young, A., & Autexier, C. (2021). PCNA, a focus on replication stress and the alternative lengthening of telomeres pathway. *DNA Repair*, 100, 103055. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103055>
152. Sherif, I. O., & Al-Gayyar, M. M. H. (2018). Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life Sciences*, 198, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.027>

153. Shevchenko, R. V., James, S. L., & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7(43), 229–258. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0403>
154. Smeriglio, A., Denaro, M., Mastracci, L., Grillo, F., Cornara, L., Shirooie, S., Nabavi, S. M., & Trombetta, D. (2019). Safety and efficacy of hydroxytyrosol-based formulation on skin inflammation: In vitro evaluation on reconstructed human epidermis model. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 27(1), 283–293. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00274-3>
155. Smith, L. T., & Holbrook, K. A. (1986). Embryogenesis of the dermis in human skin. *Pediatric Dermatology*, 3(4), 271–280. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.1986.tb00525.x>
156. Sparber, F. (2014). Langerhans cells: An update: Langerhans cells. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12(12), 1107–1111. <https://doi.org/10.1111/ddg.12506>
157. Squillaro, T., Schettino, C., Sampaolo, S., Galderisi, U., Di Iorio, G., Giordano, A., & Melone, M. A. B. (2018). Adult-onset brain tumors and neurodegeneration: Are polyphenols protective? *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3955–3967. <https://doi.org/10.1002/jcp.26170>
158. Stoddart, M. J. (2011). Cell viability assays: Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 740, 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
159. Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: More than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
160. Szymański, Ł., Jęderka, K., Cios, A., Ciepela, M., Lewicka, A., Stankiewicz, W., & Lewicki, S. (2020). A Simple Method for the Production of Human Skin Equivalent in 3D, Multi-Cell Culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4644. <https://doi.org/10.3390/ijms21134644>
161. Thakor, P., Song, W., Subramanian, R. B., Thakkar, V. R., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2017). Maslinic Acid Inhibits Proliferation of Renal Cell Carcinoma Cell Lines and Suppresses Angiogenesis of Endothelial Cells. *Journal of Kidney Cancer and VHL*, 4(1), 16–24. <https://doi.org/10.15586/jkcvhl.2017.64>
162. Thulabandu, V., Chen, D., & Atit, R. P. (2018). Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.1002/wdev.307>
163. Tian, J., Fu, C., Li, W., Li, N., Yao, L., & Xiao, J. (2024). Biomimetic tri-layered artificial skin comprising silica gel-collagen membrane-collagen porous scaffold for enhanced full-thickness wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266(Pt 1), 131233. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131233>
164. Toledo-Piza, A. R., Nakano, E., Rici, R. E. G., & Maria, D. A. (2013). Proliferation of fibroblasts and endothelial cells is enhanced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. *Cell Proliferation*, 46(1), 97–108. <https://doi.org/10.1111/cpr.12003>
165. Tomé-Carneiro, J., Crespo, M. C., López De Las Hazas, M. C., Visioli, F., & Dávalos, A. (2020). Olive oil consumption and its repercussions on lipid metabolism. *Nutrition Reviews*, 78(11), 952–968. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa014>
166. Tsatmali, M., Ancans, J., & Thody, A. J. (2002). Melanocyte Function and Its Control by Melanocortin Peptides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(2), 125–133. <https://doi.org/10.1177/002215540205000201>
167. Vapniarsky, N., Arzi, B., Hu, J. C., Nolta, J. A., & Athanasiou, K. A. (2015). Concise Review: Human Dermis as an Autologous Source of Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(10), 1187–1198. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0084>
168. Vela-Romera, A., Carriel, V., Martín-Piedra, M. A., Aneiros-Fernández, J., Campos, F., Chato-Astrain, J., Prados-Olleta, N., Campos, A., Alaminos, M., & Garzón, I. (2019). Characterization of the human ridged and non-ridged skin: A comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 151(1), 57–73. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1701-x>

169. Veltri, A., Lang, C., & Lien, W.-H. (2018). Concise Review: Wnt Signaling Pathways in Skin Development and Epidermal Stem Cells. *Stem Cells*, 36(1), 22–35. <https://doi.org/10.1002/stem.2723>
170. Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2017). Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 789. <https://doi.org/10.3390/ijms18040789>
171. Vinje, M. A., & Friedman, D. A. (2023). Exogenous spike-in mouse RNAs for accurate differential gene expression analysis in barley using RT-qPCR. *Biology Methods & Protocols*, 8(1), bpad034. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpad034>
172. Vissers, M. N., Zock, P. L., & Katan, M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(6), 955–965. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601917>
173. Vrdoljak, J., Kumric, M., Vilovic, M., Martinovic, D., Tomic, I. J., Krnic, M., Ticinovic Kurir, T., & Bozic, J. (2022). Effects of Olive Oil and Its Components on Intestinal Inflammation and Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*, 14(4), 757. <https://doi.org/10.3390/nu14040757>
174. Wang, J., Mongan, M., Zhang, X., & Xia, Y. (2021). Isolation and long-term expansion of murine epidermal stem-like cells. *PLOS ONE*, 16(7), e0254731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254731>
175. Wang, N., Ma, Z., Chen, C., & Xiao, N. (2022). Effects of maslinic acid on cardiac function in ischemia-reperfusion injury rats. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 70(1), 20–28. <https://doi.org/10.1136/jim-2021-001927>
176. Wei, Q., Zhang, B., Li, P., Wen, X., & Yang, J. (2019). Maslinic Acid Inhibits Colon Tumorigenesis by the AMPK-mTOR Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(15), 4259–4272. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00170>
177. Wu, K. Y., Tabari, A., Mazerolle, É., & Tran, S. D. (2024). Towards Precision Ophthalmology: The Role of 3D Printing and Bioprinting in Oculoplastic Surgery, Retinal, Corneal, and Glaucoma Treatment. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 9(3), 145. <https://doi.org/10.3390/biomimetics9030145>
178. Xie, Q., Yang, J., Pan, F., & Cai, J. (2021). Preparation of 6-carboxyl chitin and its effects on cell proliferation in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 257, 117638. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117638>
179. Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A.-L. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 67, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.014>
180. Yamakami, Y., Morino, K., Takauji, Y., Kasukabe, R., Miki, K., Hossain, M. N., Ayusawa, D., & Fujii, M. (2019). Extract of *Emblica officinalis* enhances the growth of human keratinocytes in culture. *Journal of Integrative Medicine*, 17(2), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.01.004>
181. Yamauchi, Y., Ferdousi, F., Fukumitsu, S., & Isoda, H. (2021). Maslinic Acid Attenuates Denervation-Induced Loss of Skeletal Muscle Mass and Strength. *Nutrients*, 13(9), 2950. <https://doi.org/10.3390/nu13092950>
182. Yan, C.-M., Chai, E.-Q., Cai, H.-Y., Miao, G.-Y., & Ma, W. (2015). Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Molecular Medicine Reports*, 11(6), 4617–4624. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3266>
183. Yang, Y., Tsai, C., Mong, M., & Yin, M. (2015). Maslinic Acid Protected PC12 Cells Differentiated by Nerve Growth Factor against β -Amyloid-Induced Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10243–10249. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04156>

184. Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2023). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
185. Yu, L., Xie, X., Cao, X., Chen, J., Chen, G., Chen, Y., Li, G., Qin, J., Peng, F., & Peng, C. (2021). The Anticancer Potential of Maslinic Acid and Its Derivatives: A Review. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 3863–3879. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S326328>
186. Yubero-Serrano, E. M., Lopez-Moreno, J., Gomez-Delgado, F., & Lopez-Miranda, J. (2019). Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(Suppl 1), 8–17. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0304-x>
187. Zahmatkesh, M., Manesh, M. J., & Babashahabi, R. (2015). Effect of Olea ointment and Acetate Mafenide on burn wounds—A randomized clinical trial. *Iranian Journal of Nursing and Midwifery Research*, 20(5), 599–603. <https://doi.org/10.4103/1735-9066.164507>
188. Zhang, X., Xu, W., & Hu, X. (2021a). Tissue-Engineered Skin Regenerative Units for Epidermal Keratinocytes Expansion and Wound Healing. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 27, e932978. <https://doi.org/10.12659/MSM.932978>
189. Zhang, X., Xu, W., & Hu, X. (2021b). Tissue-Engineered Skin Regenerative Units for Epidermal Keratinocytes Expansion and Wound Healing. *Medical Science Monitor*, 27. <https://doi.org/10.12659/MSM.932978>
190. Zheng, Y., Liu, Z., Yang, X., Liu, L., & Ahn, K. S. (2022). An updated review on the potential antineoplastic actions of oleuropein. *Phytotherapy Research: PTR*, 36(1), 365–379. <https://doi.org/10.1002/ptr.7325>

El doctorando / The *doctoral candidate* [**Olimpia Ortiz Arrabal**] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [**Carolina Gómez Llorente y Miguel Alaminos Mingorance**]

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

/

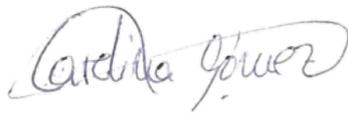
Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been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

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, 24 de julio de 2024

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:



Firma / Signed



Firma / Signed