



**Universidad de Granada**  
**Facultad de Medicina**  
*Departamento de Histología*

# **Generación de Mucosa Oral Artificial por Ingeniería Tisular. Identificación de los Patrones Histológicos e Histoquímicos de la Matriz Extracelular**

***TESIS DOCTORAL***

**Camilo Andrés Alfonso Rodríguez**  
Licenciado en Odontología

Granada, 2014

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Camilo Andrés Alfonso Rodríguez  
ISBN: 978-84-9125-026-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/39819>



**Universidad de Granada**  
**Facultad de Medicina**  
*Departamento de Histología*

# **Generación de Mucosa Oral Artificial por Ingeniería Tisular. Identificación de los Patrones Histológicos e Histoquímicos de la Matriz Extracelular.**

*Memoria que presenta el Licenciado en Odontología*  
**Camilo Andrés Alfonso Rodríguez**  
*para aspirar al título de Doctor.*

Fdo: Camilo Andrés Alfonso Rodríguez



**Universidad de Granada**  
**Facultad de Medicina**  
*Departamento de Histología*

**Generación de Mucosa Oral Artificial por Ingeniería Tisular.  
 Identificación de los Patrones Histológicos e Histoquímicos de la  
 Matriz Extracelular.**

Las doctoras María del Carmen Sánchez Quevedo catedrática de Universidad e Ingrid Garzón Bello, Profesora Contratada Doctor, pertenecientes al Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

Certifican:

Que el trabajo de investigación que recoge esta Memoria de Tesis Doctoral, titulada "Generación de Mucosa Oral Artificial por Ingeniería Tisular. Identificación de los Patrones Histológicos e Histoquímicos de la Matriz Extracelular", presentada por el Licenciado en Odontología, D. Camilo Andrés Alfonso Rodríguez, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa.

**VºBº El director de  
 Tesis**

**Fdo: Dra. María del  
 Carmen Sánchez  
 Quevedo**  
*Catedrático de  
 Universidad  
 Departamento de  
 Histología  
 Universidad de Granada*

**VºBº La directora de  
 Tesis**

**Fdo: Dra. Ingrid  
 Johanna Garzón Bello**  
*Profesora Contratada  
 Doctor  
 Departamento de  
 Histología  
 Universidad de Granada*

## **COMPROMISO DE RESPETO DE LOS DERECHOS DE AUTOR**

El doctorando D. CAMILO ANDRÉS ALFONSO RODRÍGUEZ y los directores de la tesis Dña. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ QUEVEDO y Dña. INGRID JOHANNA GARZÓN BELLO 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.

Granada, 20 Noviembre de 2014

Las Directoras de la Tesis

El Doctorando

Fdo.: María del Carmen Sánchez Quevedo

Fdo.: Camilo Andrés Alfonso R

Fdo.: Ingrid Johanna Garzón Bello

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto de Investigación titulado “Generación de Mucosa oral artificial humana a partir de células madre de la gelatina de Wharton” – PI FIS11/2668 del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i), Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Cofinanciado con fondos FEDER, Unión Europea.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados o están en proceso de publicación en las siguientes revistas científicas:

- Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira AC, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Hernández-Cortés P, Campos A, Alaminos M. Identification of Histological Patterns in Clinically Affected and Unaffected Palm Regions in Dupuytren's Disease. PLoS One. 2014 Nov 7;9(11):e112457. doi: 10.1371/journal.pone.0112457. eCollection 2014.
- Alfonso-Rodríguez CA, González-Andrades E, Jaimes-Parra BD, Fernández-Valadés R, Campos A, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Garzón I. Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes. *Histol and Histopathol.* 2014 (en revisión).

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1.1. La Ingeniería Tisular	10
1.1.1. Células	11
1.1.2. Biomateriales	15
1.1.3. Factores de crecimiento	16
1.2. La Mucosa Oral Humana	17
1.2.1. Epitelio y tejido conectivo de la Mucosa Oral Humana	17
1.2.2. Matriz extracelular de la Mucosa Oral	19
1.3. La Ingeniería Tisular de La Mucosa Oral	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1. Obtención de muestras de tejido humano	36
3.1.1. Muestras de mucosa oral humana	36
3.1.2 Muestras de tejido conectivo humano control	36
3.1.3. Muestras del cordón umbilical humano	37
3.2. Aislamiento de células y obtención de cultivos primarios	37
3.2.1. Fibroblastos de la mucosa oral humana	37
3.2.2. Queratinocitos de la mucosa oral humana	37
3.2.3. Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton	38
3.3. Generación de sustitutos de la mucosa oral humana mediante Ingeniería Tisular	38
3.3.1. Mucosa oral artificial humana ortotópica	38
3.3.2. Mucosa oral artificial humana heterotópica	39
3.4. Evaluación in vivo de los sustitutos de mucosa oral artificial humana ortotípicos y heterotípicos	40
3.5. Análisis histológico mediante microscopía óptica	41

3.6. Análisis histológico mediante microscopía electrónica de transmisión	41
3.7. Análisis histoquímico de componentes fibrilares y no fibrilares de la Matriz Extracelular	41
3.7.1. Tinción mediante el método histoquímico de picrosirius	42
3.7.2. Tinción mediante el método histoquímico de Gomori	42
3.7.3. Tinción mediante el método histoquímico de Verhoeff	43
3.7.4. Tinción mediante el método histoquímico de tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)	43
3.7.5. Tinción mediante el método histoquímico de azul alcían	44
3.7. Análisis inmunohistoquímico de componentes no fibrilares de la Matriz Extracelular	44
3.8. Análisis cuantitativo	45
3.9. Análisis estadístico	46
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
4.1. Generación de Sustitutos de Mucosa Oral Artificial Humana Ortotópica y Heterotópica Mediante Ingeniería Tisular	48
4.2. Análisis Histológico del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica Mediante Tinción de Hematoxilina y Eosina	48
4.3. Análisis Histológico del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica Mediante Microscopía Electrónica de Transmisión	50
4.4. Análisis de Componentes Fibrilares de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica	53
4.4.1. Análisis de Fibras de Colágeno de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica	53
4.4.2. Análisis de Fibras Reticulares de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica	57
4.4.3. Análisis de Fibras Elásticas de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica	60
4.5. Análisis de Componentes no Fibrilares de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica	65
4.5.1. Análisis de Glicoproteínas de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica	65



4.5.2. Análisis de Proteoglicanos de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica	69
4.5.3. Análisis Inmunohistoquímico del Contenido de Agregán en la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica	73
4.5.4. Análisis Inmunohistoquímico del Contenido de Versicán en la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica	77
4.5.5. Análisis Inmunohistoquímico del Contenido de Decorín en la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica	81
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>86</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>99</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La Ingeniería Tisular

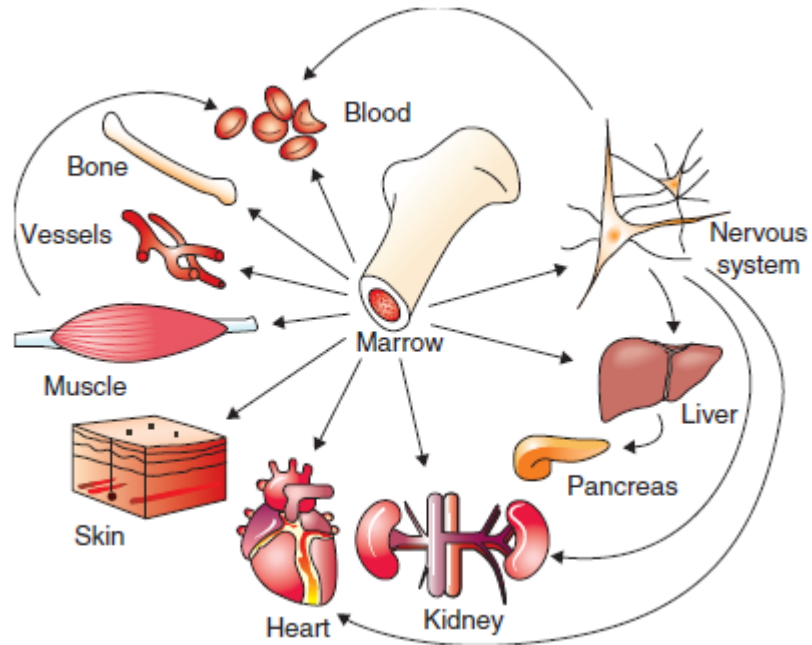
La ingeniería tisular es una novedosa rama del conocimiento que se encarga de utilizar células, biomateriales y factores de crecimiento con el único objetivo de reparar y regenerar la función de los tejidos afectados por diversas patologías. En este sentido, la ingeniería tisular ha desarrollado numerosos sistemas especializados para la generación de los tejidos artificiales *in vitro* a partir de diferentes técnicas de cultivo que permiten el desarrollo y la diferenciación de los tejidos artificiales. La gran amplitud de aplicaciones de la ingeniería tisular incluye su potencial terapéutico, su utilización en estudios toxicológicos y también en estudios relacionados con desarrollo y morfogénesis. El término de Ingeniería Tisular fue acuñado sobre la década de los 80's y fue utilizado prontamente de una forma sutil en el campo de los dispositivos protésicos y a la manipulación de algunos tejidos quirúrgicos. En este sentido, no fue hasta la reunión celebrada a finales de los años 80's, que se logró englobar una definición más completa de la Ingeniería Tisular. Dicha reunión enfatizó e integro los conceptos protésicos y comenzó a introducir algunos conceptos de la integración de células con dichos artefactos protésicos. Todos estos acercamientos en el campo de la evolución del término de Ingeniería Tisular, logran establecer que esta disciplina es un rama científica dedicada a la generación de nuevos tejidos usando los principios de la ingeniería en combinación de las ciencias biológicas" (Vacanti, 2006; Vacanti, 2006).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, las herramientas fundamentales que utiliza la ingeniería tisular para la construcción de tejidos artificiales son las células, los biomateriales y los factores de crecimiento que serán descritos en detalle en el siguiente apartado de la presente tesis doctoral (Atala, 2000; de Ferraris and Campos, 2009; Falke *et al.*, 2000; Vacanti, 2006).

### **1.1.1. Células**

Dentro de las diferentes fuentes que existen para obtener células con potencial uso en ingeniería tisular podemos considerar las células autólogas, alógenicas y xenógenicas.

Las células autólogas son consideradas el gold estándar para desarrollar protocolos de ingeniería tisular. Sin embargo, algunas desventajas han sido atribuidas a estas células. Entre ellas destacan las enfermedades sistémicas asociadas al donante, la edad y en algunos casos, la dificultad de obtener grandes cantidades de células. Por estas razones, se hace necesario cultivarlas en el laboratorio cuando la cantidad de células no es adecuada. Por otro lado, las células de origen alogénico han presentado buen comportamiento en tejidos específicos como la piel, mientras que las células de origen xenogénico tienen un alto potencial de reacción inmunológica y por tanto, es necesario realizar previamente una terapia de inmunosupresión cuando un tejido artificial es construido utilizando este tipo de células (Li *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013) (Figura 1).



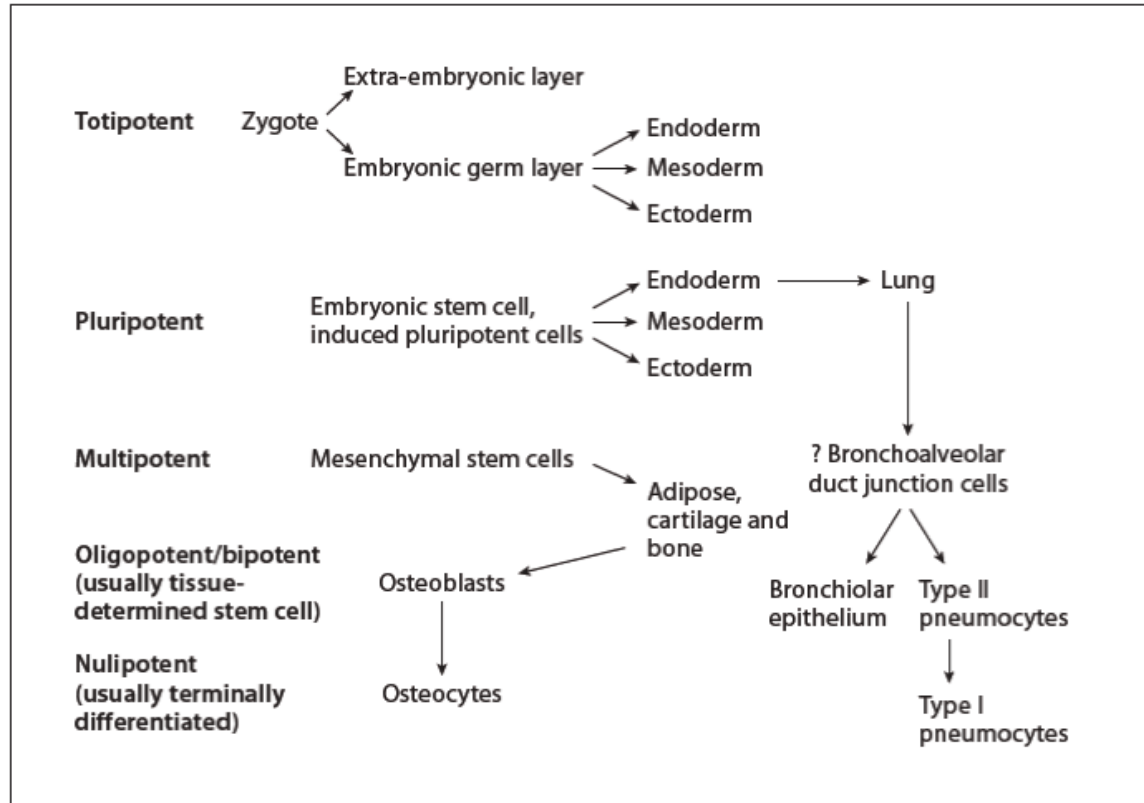
**Figura 1. Esquema ilustrativo del potencial de diferenciación de las células madre de médula ósea en protocolos de Ingeniería Tisular. Holden C, Vogel G. (2002)**

### **Clasificación de las células madre**

Las células madre pueden clasificarse de acuerdo a su potencial de diferenciación y origen. Las células madre que se originan en el periodo de desarrollo embrionario son consideradas embrionarias, pudiendo ser totipotentes o pluripotentes. Por otro lado, las células madre que se originan de tejidos postnatales son las denominadas células madre adultas, pudiendo ser multipotentes o unipotentes (Fernandez Vallone *et al.*, 2013; Kolios and Moodley, 2013) (Figura 2).

A continuación detallaré la clasificación de las células madre de acuerdo a su potencial de diferenciación.

- a. Totipotenciales: Son aquéllas capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: sistema nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios).
- b. Pluripotenciales: Son aquéllas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias.
- c. Multipotenciales: Serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo.
- d. Unipotenciales: Capacidad para formar un único linaje celular. Por ejemplo: células madre epiteliales de la capa basal de la epidermis.



**Figura 2. Esquema de la clasificación de las células madre según su potencial de diferenciación. George Kolios 2013.**

Teniendo en cuenta el origen de las células madre, las podemos clasificar en células madre embrionarias y adultas.

- Embrionarias Existen únicamente durante el periodo embrionario. Se pueden obtener a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio, o bien, de la cresta gonadal (Resnick *et al.*, 1992). Las células madre embrionarias de la masa celular interna del blastocisto son pluripotenciales, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo (Ho *et al.*, 2012; Kolios and Moodley, 2013; Vojnits *et al.*, 2014).

- Adultas: Existen en el adulto, el feto y el cordón umbilical. Tienen una capacidad proliferativa y un potencial de diferenciación menores que las células madre embrionarias. Son células multipotenciales o unipotenciales, y se han podido identificar en casi todos los tejidos del organismo (Fukada *et al.*, 2014).

Las células madre mesenquimales también conocidas como células madre estromales o MSC, son células multipotentes primitivas, con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células, incluyendo osteocitos (células óseas), condrocitos (células del cartílago), adipocitos (células grasas), mioblastos (precursores de células musculosas) cardiomiocitos (células del corazón), neuronas y astrocitos (Células gliales) tanto in vivo como in vitro (Salem and Thiemermann, 2010).

### **1.1.2. Biomateriales**

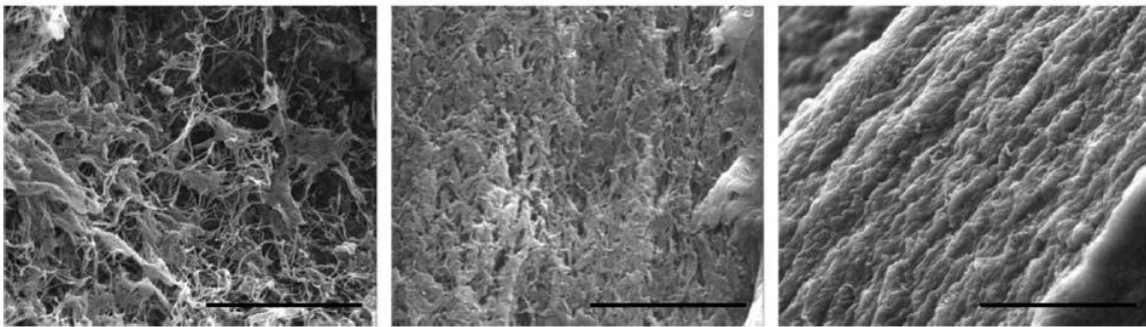
Biomaterial es una matriz extracelular capaz de dirigir el crecimiento celular y prever un microambiente físico, químico y biológico adecuado para optimizar el crecimiento y diferenciación celular (Bhardwaj *et al.*, 2014).

Un biomaterial adecuado debe poseer algunos requisitos básicos, como, por ejemplo, ser biocompatible. Además, no debe ser tóxico ni carcinogénico. El material debe poseer propiedades físicas y mecánicas adecuadas para servir como sustituto de tejidos del cuerpo. Para uso clínico, un biomaterial debe posibilitar su fabricación en diferentes formas y presentar bajo coste (Hoch *et al.*,



2014). Para aplicaciones en ingeniería tisular deben promover viabilidad, desarrollo, proliferación y diferenciación celular.

Además de cumplir los requisitos básicos, los biomateriales deben mimetizar las características del tejido que será reparado. En este contexto, es necesario considerar algunos aspectos como propiedades eléctricas (conductores y aislantes), propiedades térmicas (termoestables, lábiles, conductores y aislantes), propiedades biomecánicas (tensión de compresión, elasticidad, ductilidad, cizalla, densidad, fatiga, fragilidad, desgaste y corrosión), propiedades estructurales y geométricas, y la respuesta celular (bioinerte, bioactivo y bioabsorbible) (Scinti *et al.*, 2014) (Figure 3).



**Figure 3. Biomaterial natural analizado mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Biomaterial desarrollado a partir de la utilización de fibrina y agarosa. Scinti 2013.**

### 1.1.3. Factores de Crecimiento

En la proliferación y diferenciación celular varias proteínas tienen un rol fundamental. Estas proteínas son secretadas de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. Estas proteínas, son llamadas factores de crecimiento.

Dentro los factores de crecimiento más utilizados en Ingeniería Tisular vale la pena mencionar las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF ó FGF-2), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante-b (TGF-b) (Quan *et al.*, 2014; Whelan *et al.*, 2014).

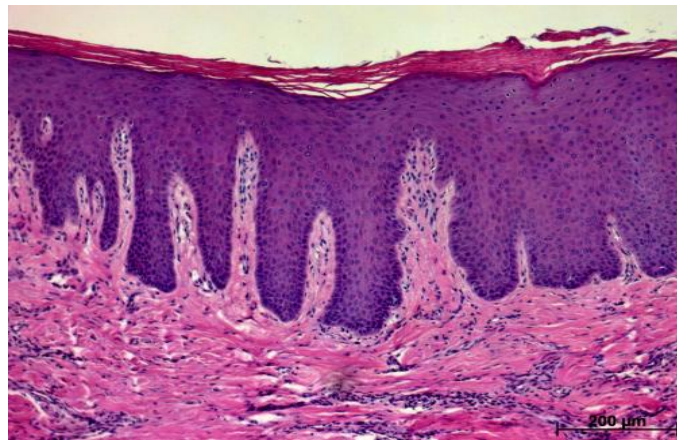
## **1.2. La Mucosa Oral Humana**

La mucosa oral está constituida por el epitelio, el cual es de origen ectodérmico y por el estroma o tejido conectivo, el cual es de origen ectomesenquimal. Ambos tejidos cumplen una función muy importante en el desarrollo y la función de la mucosa oral. Por una parte, el tejido epitelial tiene como función principal prever una barrera física contra agentes externos y el estroma o tejido conectivo brinda soporte estructural y nutrientes al tejido epitelial. En este sentido, la interacción entre ambos tejidos garantiza el correcto funcionamiento de la mucosa oral dentro de la cavidad oral (de Ferraris and Campos, 2009).

### **1.2.1. Epitelio y tejido conectivo de la Mucosa Oral Humana**

El epitelio de la mucosa oral es de tipo estratificado plano, y dependiendo de su ubicación topográfica dentro de la cavidad oral puede ser queratinizado, como ocurre, en la mucosa oral del paladar o bien, paraqueratinizado como en el dorso de la lengua. En el epitelio podemos encontrar diferentes poblaciones celulares, los queratinocitos, constituyen una de las poblaciones celulares más abundantes del tejido epitelial de la mucosa oral. Los queratinocitos que integran el epitelio de la mucosa oral se disponen formando la capa basal, el estrato espinoso, el estrato

granuloso y por último el estrato superficial. Por otro lado, es importante mencionar otros tipos celulares que también se encuentran en el epitelio de la mucosa oral, entre ellos podemos destacar la presencia de melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans. En menor cantidad también podemos encontrar granulocitos, linfocitos y monocitos (de Ferraris and Campos, 2009) (Figura 4).



**Figura 4. Mucosa oral humana. Tinción de Hematoxilina-eosina donde se observa el tejido epitelial queratinizado, el tejido conectivo, crestas epiteliales y papilas coriales. C. Alfonso 2014**

Como mencione anteriormente el estudio del estroma o tejido conectivo adquiere gran importancia a la hora de hablar de la mucosa oral debido a sus funciones de soporte y nutrición. En este sentido cabe destacar que el estroma o tejido conectivo se encuentra íntimamente relacionado con el epitelio gracias a la membrana basal cuyas funciones son de gran importancia en la interacción entre el tejido epitelial y el tejido conectivo. El componente celular del tejido conectivo

está constituido por diferentes tipos de células tales como fibroblastos, macrófagos, leucocitos, células cebadas y células plasmáticas (Gartner, 2008).

Además de dicho componente, el tejido conectivo está compuesto de Matriz extracelular (MEC). Al ser la matriz extracelular el objeto de estudio de esta tesis doctoral es por lo que a continuación se llevara a cabo una descripción detallada de las funciones y los componentes principales de la MEC de la mucosa oral humana.

### **1.2.2. Matriz extracelular de la Mucosa Oral**

La matriz extracelular (MEC) es un complejo organizado de macromoléculas que elaboran las células y eliminan hacia el espacio extracelular (Alcaraz *et al.*, 2014). Algunos tejidos, como el epitelio, forman láminas de células con tan sólo una cantidad escasa de matriz extracelular. En el extremo opuesto se encuentra el tejido conectivo, constituido principalmente de matriz extracelular, con un número limitado de células diseminadas en toda la matriz. Las células conservan sus relaciones con la matriz extracelular y forman uniones especializadas que las unen con las macro moléculas circundantes.

En este sentido, es importante resaltar que la matriz extracelular de la mucosa oral se encarga de nutrir al epitelio y que estas funciones se ven reforzadas puesto que hay vasos y nervios inmersos en dicha matriz. La matriz extracelular de la mucosa oral como todo tejido conectivo presenta células, fibras y sustancia fundamental (de Ferraris and Campos, 2009).

En este contexto, es importante analizar la naturaleza de la matriz extracelular y su relación con los elementos celulares.

Aunque al principio se pensaba que la MEC sólo formaba los elementos esqueléticos del tejido en el que se encontraba, ahora se sabe que también modifica la morfología y funciones de las células, modula la supervivencia celular, influye en el desarrollo celular, regula la migración de las células, dirige la actividad miótica celular y establece relaciones de unión con las células (Gartner, 2008).

La matriz extracelular del tejido conectivo adulto, el tejido conectivo más común del cuerpo, se compone de una sustancia base hidratada similar a un gel, con fibras incluidas en ella. La sustancia fundamental resiste fuerzas de compresión y las fibras soportan fuerzas de tensión. El agua de hidratación permite el intercambio rápido de nutrientes y productos de desecho transportados por el líquido extracelular a medida que se filtra a través de la sustancia base. La sustancia fundamental en la mucosa oral está presente en todas las zonas topográficas en mayor o menor medida dependiendo su necesidad. Por ejemplo, la mucosa oral masticatoria tiene gran cantidad de sustancia fundamental porque necesita amortiguar el choque masticatorio durante la alimentación. Además, los hábitos nutricionales actuales, el consumo de alcohol y tabaco hacen que estas zonas topográficas se alteren con frecuencia (de Ferraris and Campos, 2009; Ross and Pawlina, 2007).

### **Sustancia Fundamental**

La sustancia fundamental es un material semejante a un gel compuesto de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas. Estas tres familias de macromoléculas forman diversas interacciones entre sí, con las fibras y las células

de tejido conectivo. Es importante aclarar antes de describir específicamente cada molécula que la sustancia fundamental es un componente de gran importancia en la composición de la matriz extracelular de la mucosa oral. Por otro lado, en la sustancia fundamental de la mucosa oral existe gran cantidad de glicosaminoglicanos que retienen el agua y permiten la difusión de nutrientes desde los vasos hacia el epitelio (de Ferraris and Campos, 2009).

### **Glicosaminoglicanos**

Los GAG son polisacáridos largos compuestos de cadenas de unidades repetidas de disacáridos. Uno de los dos disacáridos de repetición siempre es un azúcar amino (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina); el otro es de manera característica un ácido urónico (idurónico o glucurónico). Los GAG tienen la capacidad para atraer iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), esto significa que una concentración alta de sodio en la sustancia fundamental atrae líquido extracelular, que favorece la resistencia a fuerzas de compresión. A medida que estas moléculas entran en proximidad cercana entre sí, su carga negativa las repele, lo que da lugar a que tengan una textura resbaladiza, como lo demuestran el moco, el humor vítreo del ojo y el líquido sinovial (Lehninger and Cox, 2006).

La mayoría de los GAG de la matriz extracelular son sulfatados y poseen menos de 300 unidades de disacáridos repetidas. Los GAG sulfatados incluyen sulfato de queratán, sulfato de heparán, heparina, sulfato de condroitina 4, sulfato de condroitina 6 y sulfato de dermatán. Muchas veces estos GAG se unen a menudo de manera covalente a moléculas de proteínas para formar proteoglicanos. El único GAG no sulfatado es el ácido hialurónico (hialuronano) (Gartner, 2008). Es

importante resaltar que todos los GAG se sintetizan dentro del aparato de Golgi por acción de las enzimas residentes, excepto el ácido hialurónico que se produce como un polímero lineal libre en la cara citoplasmática de la membrana plasmática por acción de las sintasas de hialuronano. Estas enzimas son proteínas integrales de la membrana que no solo catalizan la polimerización sino que también facilitan la transferencia de la macromolécula recién formada hacia la matriz extracelular. Se ha sugerido que esta macromolécula también tiene funciones intracelulares. Parte del ácido hialurónico recién liberado ingresa a algunas células por endocitosis, sobre todo durante el ciclo celular; ahí participa en el mantenimiento del espacio y modulación de las actividades de los microtúbulos durante la metafase y anafase de la mitosis, lo que facilita los movimientos cromosómicos. Otras funciones intracelulares podrían incluir la modulación del tránsito intracelular y la influencia en cinasas específicas intracitoplasmáticas e intranucleares (Gartner, 2008; Lehninger and Cox, 2006).

### **Proteoglicanos**

Los proteoglicanos constituyen una familia de macromoléculas; cada una de ellas compuesta de un centro proteico al cual se unen de manera covalente los Glicosaminoglicanos (Lehninger and Cox, 2006).

Cuando los GAG sulfatados forman uniones covalentes con un centro proteico, constituyen una familia de macromoléculas conocida como proteoglicanos, muchos de los cuales ocupan dominios enormes. Los proteoglicanos pueden tener un tamaño variable, de unos 50000 dalton (decorín y betaglucán) hasta 3 millones de dalton (agrecán) (Gartner, 2008; Kreis and Vale, 1999; Lehninger and Cox,

2006). Los centros proteicos de los proteoglicanos se elaboran en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y se transportan al aparato de Golgi, donde las enzimas residentes unen los tetrasacáridos con sus cadenas laterales de serina mediante enlaces covalentes; luego se ensambla el GAG con la adición de azúcares, uno a la vez. La sulfatación, catalizada por sulfotransferasas, y la epimerización (reordenamiento de diversos grupos alrededor de átomos de carbono de las unidades de azúcar), también ocurre en el aparato de Golgi. Muchos proteoglicanos, en especial el agregacán, una macromolécula que se encuentra en cartílago y tejido conectivo, se unen al ácido hialurónico. La forma de unión incluye una interacción iónica no covalente entre los grupos azúcar del ácido hialurónico y la proteína central de la molécula de proteoglicano

Los proteoglicanos resisten la compresión y retrasan el movimiento rápido de microorganismos y células metastásicas, facilitan la locomoción celular. Algunos proteoglicanos como las decorinas, son necesarios para la formación de fibras de colágeno (de Ferraris and Campos, 2009; Gartner, 2008; Lehninger and Cox, 2006).

### **Glicoproteínas**

Son moléculas de adhesión celular que tienen sitios de unión para varios componentes de la matriz extracelular y moléculas de integrina de la membrana celular que facilitan la unión de células de la matriz extracelular (Gartner, 2008).

Las glicoproteínas de adhesión representan un rol importante en la estabilización de la MEC y en su vinculación con la superficie celular. Presentan sitios



específicos especializados e integrinas de la membrana celular para poder unirse a otras moléculas de la MEC (Ross and Pawlina, 2007).

La capacidad de las células para adherirse a componentes de la matriz extracelular es mediada en gran parte por glicoproteínas de adhesión celular. Estas macromoléculas grandes tienen varios dominios, uno de los cuales suele unirse a proteínas de la superficie celular llamadas integrinas, una para fibras de colágeno y otra para proteoglicanos. En esta forma, las glicoproteínas modulan las funciones de la matriz extracelular relacionadas con el movimiento y la migración de las células. Regulan la adhesión y unen entre sí los diversos componentes de los tejidos. Los principales tipos de glicoproteínas de adhesión son fibronectina, laminina, tenascina, y osteopontina (Ross and Pawlina, 2007; Stevens and Lowe, 2006). La fibronectina es una proteína muy abundante del tejido conectivo, es un dímero grande compuesto de dos subunidades polipeptídicas similares, cada una de alrededor de 220.000 dalton, unidas entre sí en sus extremos carboxilo mediante enlaces disulfuro (Guan *et al.*, 1991; Mosher *et al.*, 1991). Cada brazo de esta macromolécula en forma de V, tiene sitios de unión para diversos componentes extracelulares y para integrinas de la membrana celular. Aunque la fibronectina la producen principalmente los fibroblastos, también se encuentra en la sangre como fibronectina del plasma. Además, puede unirse de manera temporal a la membrana plasmática como fibronectina de la superficie celular. La fibronectina marca las vías migratorias para células embrionarias de tal manera que las células en migración del microorganismo en desarrollo pueden llegar a su destino. Esta proteína promueve la adhesión y proliferación celular y se una a diferentes tipos de integrinas (Juliano and Haskill, 1993). La localización de la

laminina casi siempre se limita rígidamente a la lámina basal; por consiguiente, esta glicoproteína tiene sitios de unión para sulfato de heparán, colágeno tipo IV, entactina y la membrana celular (Nunez *et al.*, 2013). La tenascina es una glicoproteína grande compuesta de seis cadenas polipeptídicas unidas entre sí por enlaces disulfuro. Esta macromolécula, que semeja un insecto cuyas seis patas se proyectan en forma radial desde un cuerpo central, tiene sitios de unión para los proteoglicanos sindecanos transmembranales y para fibronectina. La distribución de la tenascina suele limitarse a tejido embrionario, en donde marca vías migratorias para célula específicas (Gartner, 2008; Ross and Pawlina, 2007).

### **Integrinas**

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas que participan principalmente en la unión de las células con la matriz extracelular, aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula. Están presentes en la superficie celular en elevadas concentraciones. Las integrinas son proteínas transmembranales similares a los receptores de la membrana celular porque forman enlaces con ligandos (Gartner, 2008; Larjava *et al.*, 2011).

Las integrinas son una familia de moléculas involucradas en la adhesión celular y algunas participan en procesos de agregación. Las integrinas son heterodímeros obligados que contienen dos tipos de cadenas distintas, la subunidad  $\alpha$  (alfa) y la subunidad  $\beta$  (beta), que se unen de forma no covalente con un peso aproximado de (250 000 dalton) (Clark and Brugge, 1995; Hynes, 1992; Kreis and Vale, 1999). Las integrinas participan en funciones de adherencia, en la transducción de señales bioquímicas en fenómenos intracelulares activando el sistema en

cascatas de segundo mensajero (Nastro Siniscalchi *et al.*, 2010). La funcionalidad de las integrinas en la transducción bioquímica se manifiesta por su capacidad para estimular diversas vías de señalamiento, incluyendo cinasa de proteína activada por mitógeno, cinasa de proteína C y vías de fosfoinositida, que conducen a la activación del ciclo celular, la diferenciación de las células, reorganización del citosqueleto, regulación de la expresión de gen e incluso la muerte celular programada a través de apoptosis.

## **Fibras**

Las fibras de colágeno y las elásticas son las principales proteínas fibrosas del tejido conectivo, tienen propiedades bioquímicas y mecánicas distintivas como consecuencia de sus características estructurales.

Las fibras de la matriz extracelular proporcionan fuerza de tensión y elasticidad a esta sustancia. Se han descrito tres tipos de fibras. Las fibras de colágeno, las fibras reticulares y las fibras elásticas (Stevens and Lowe, 2006). El colágeno constituye una superfamilia de proteínas de la matriz extracelular teniendo como primera función la estabilidad estructural de un tejido (Kreis and Vale, 1999). (Figura 5).

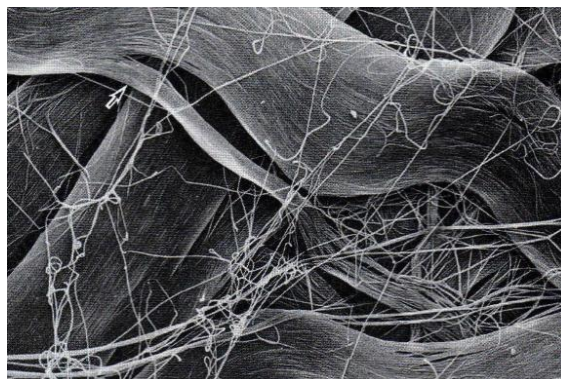
### **Fibras de colágeno: estructura y función**

Las fibras de colágeno están compuestas de subunidades de tropocolágeno cuya cadena alfa de secuencias de aminoácidos permite la clasificación de colágeno en 20 tipos de fibras diferentes. La principal función del colágeno es participar en la integridad estructural de la matriz extracelular y ayudar a la unión celular a la matriz. Diferentes estudios describen tres categorías de colágeno: la formadora de

fibrillas, la relacionada con fibrillas y la formadora de redes (Gartner, 2008; Kreis and Vale, 1999; Stevens and Lowe, 2006).

El colágeno formador de fibrillas incluye cinco tipos moleculares de colágeno diferentes (I, II, III, V y XI) las cuales forman tipos de colágeno flexibles los cuales presentan gran fuerza de tensión. Las fibras de colágeno del tejido conectivo suelen tener un diámetro menor de 10  $\mu\text{m}$  (Maynes, 2012; Stein and Pardee, 2004). Cuando se tiñen con hematoxilina y eosina, aparecen como haces de fibras de eosinófilas, largas y onduladas. Muestras observadas en microscopio electrónico de barrido muestran bandas transversales a intervalos regulares de 67 nm. Cada fibrilla está formada por 300 secuencias de aminoácidos y subunidades de tropocolágeno cada una de 280 nm de largo y 1.5 nm de diámetro (Richardson, 1995). Las cadenas alfa de tropocolágeno están envueltas entre sí en una configuración helicoidal triple con grandes residuos de aminoácidos. Cada tercer aminoácido es glicina y la mayor parte de los aminoácidos restantes están compuestos de prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina. Se ha descrito que la glicina permite la vinculación de las tres cadenas alfa; los enlaces de hidrógeno de la hidroxiprolina conservan juntas las tres cadenas alfa; y la hidroxilisina permite la formación de fibrillas por la unión de moléculas de colágeno entre sí (Brinckmann et al., 2005). Se conocen diferentes tipos de colágeno pero en este apartado de esta tesis doctoral se describirá brevemente algunos de los colágenos más relevantes. El colágeno tipo I, el tipo más común, forma fibras gruesas y se encuentra en tejido conectivo, hueso, dentina y cemento (de Ferraris and Campos, 2009; Ross and Pawlina, 2007). El colágeno tipo II forma fibras más delgadas y se encuentra casi de manera exclusiva en las matrices de cartílago hialino y elástico

(Gudmann *et al.*, 2014). El colágeno tipo III también llamado fibra reticular. Debido al gran contenido de carbohidratos, las fibras de colágeno tipo III se tiñen de manera preferencial por sales argénticas, estas fibras son parte de la estructura del hígado (Nielsen *et al.*, 2014). El colágeno tipo IV es un componente fundamental de la lámina basal y está encargada de formar la lámina densa. El colágeno tipo V forma fibrillas muy delgadas, es un tipo de fibra presente en la mayoría del tejido intersticial (Bronner and Farach-Carson, 2004). Se asocia con el tipo I. Es minoritario de los tejidos no cartilagosos. El colágeno tipo VII también conocido como colágeno alfa-1 funciona como un anclaje fibrilar entre el epitelio externo y el estroma subyacente. Por otra parte, teniendo en cuenta la anterior descripción, es importante destacar el papel de está fibras de colágeno en la mucosa oral. Estas fibras resisten las fuerzas de tracción y tensión y evitan deformaciones de la mucosa oral. Así mismo, participan en procesos regenerativos durante eventos patológicos y tras intervenciones quirúrgicas(de Ferraris and Campos, 2009).



**Figura 5. Fibras de colágeno de nervio ciático de rata. Región del epineuro que denota la presencia de fibras de colágeno. Microscopía electrónica de barrido. Gartner 2008**

## **Fibras elásticas**

A diferencia del colágeno, las fibras elásticas son sumamente ajustables y pueden estirarse una y media veces su longitud en reposo sin romperse. Cuando se libera la fuerza, las fibras elásticas regresan a su longitud en reposo. Las fibras elásticas están compuestas por dos tipos de proteínas: la elastina y la fibrilina. Son fibras más delgadas que las fibras colágenas y abundan en tejidos conectivos laxos (Kreis and Vale, 1999; Ross and Pawlina, 2007).

La elasticidad del tejido conectivo se debe, en gran parte, a la presencia de fibras elásticas en la matriz extracelular. Tiene la capacidad para deformarse incluso cuando se les aplica un pequeño esfuerzo. Presentan grandes propiedades biomecánicas y algunos estudios sugieren que participan en procesos quimiotácticos durante la inflamación (Barnes *et al.*, 2002). Estas fibras suelen ser más delgadas, largas y ramificadas en el tejido conectivo laxo, pero pueden formar haces más gruesos en ligamentos y vainas fenestradas (Gartner, 2008). Los fibroblastos y células de músculo liso de vasos sanguíneos son los encargados de sintetizar este tipo de fibras en el tejido conectivo. Están compuestas de elastina, una proteína rica en glicina, lisina, alanina, valina y prolina, pero que carece de hidroxilisina (Kreis and Vale, 1999). Después de estirarse, las fibras elásticas son capaces de regresar a su longitud de reposo. En este contexto, podemos describir la participación de las fibras elásticas en la mucosa oral. Estas fibras elásticas son las encargadas de devolver el tejido a la normalidad después que la tensión haya actuado sobre este tejido. El número de fibras elásticas en la mucosa oral la hace directamente responsable junto con algunas características del epitelio, de la

mayor o menor distensibilidad de algunas de las regiones que recubren la cavidad oral (de Ferraris and Campos, 2009).

### **1.3. La Ingeniería Tisular de la Mucosa Oral**

La mucosa oral está comúnmente afectada por un gran número de patologías de tipo inflamatorio, infeccioso, neoplásico, degenerativo, traumático o iatrogénico. Para el tratamiento de dichas patologías generalmente se requieren técnicas quirúrgicas e incluso el reemplazo del tejido afectado. La mayoría de las técnicas quirúrgicas utilizadas hasta el momento incluyen el uso de injertos o colgajos cutáneos de espesor parcial o total y trasplante heterólogo e incluso las técnicas de reconstrucción microquirúrgicas. Sin embargo, la mayoría de pacientes con afecciones patológicas de la mucosa oral pueden requerir más de un procedimiento quirúrgico, debido a la extensión y localización de la lesión y a la escasez de donantes. Por estas razones, en la actualidad se torna necesario encontrar nuevas fuentes de mucosa oral normal como sustitutos biocompatibles, anatómicos, estéticos y fisiológicamente adecuados (Garzon *et al.*, 2009).

En este sentido, numerosos estudios en Ingeniería Tisular de la Mucosa Oral, han permitido el desarrollo de modelos tridimensionales tanto *in vitro* como *in vivo* orientados a la aplicación clínica (Figura 6).

En un estudio realizado por (Moharamzadeh *et al.*, 2008; Moharamzadeh *et al.*, 2008) en 2008, se evaluaron constructos desarrollados con 10 tipos de colágeno y con una línea celular de queratinocitos con el objetivo principal de estudiar su biocompatibilidad, bioestabilidad, porosidad y la capacidad de integrarse

adecuadamente en un organismo. Los resultados de este estudio mostraron buenas características de biocompatibilidad pero revelaban carencias en cuanto a su bioestabilidad. Por otra parte, estudios realizados utilizando técnicas de cross-linking en biomateriales de colágeno y quitosan mostraron excelentes resultados de bioestabilidad cuando fueron comparados con biomateriales que no fueron sometidos a cross-linking (Moharamzadeh *et al.*, 2008). Otros estudios desarrollados en la generación de mucosa oral artificial han utilizado biomateriales porosos basados en una mezcla de colágeno, glicosaminoglicanos y quitosan con el objetivo de evaluar la diferenciación celular de las células queratinocíticas dentro de dichos biomateriales naturales. Los resultados de este estudio fueron significativos debido a la gran expresión de citoqueratina 13 en el tejido epitelial (Kinikoglu *et al.*, 2009). Aparte de esto, estudios recientes se han enfocado en la utilización de una fuente alternativa de células diferentes a las células epiteliales con resultados promisorios (Dongari-Bagtzoglou and Kashleva, 2006; Garzon *et al.*, 2013; Yadev *et al.*, 2011).



**Figura 6. Mucosa Oral obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular.**



El grupo de investigación de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ha desarrollado un modelo de mucosa oral artificial utilizando células madre queratinocíticas y fibroblásticas y un material de fibrina-agarosa. Dicho modelo ha sido investigado en sus distintas propiedades para su adecuada transferencia a la clínica. Asimismo el grupo ha utilizado fuentes celulares alternativas con el mismo biomaterial y con resultados inicialmente satisfactorios. (Garzon *et al.*, 2013; San Martín *et al.*, 2013; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007).

En este sentido, la ingeniería tisular de la mucosa oral se ha convertido en una herramienta promisoría que engloba el uso de un arsenal de posibilidades terapéuticas que pueden ser aplicadas en la odontología permitiéndonos generar tejidos artificiales de la mucosa oral sin necesidad de utilizar tejidos heterólogos.

En la presente tesis doctoral se realiza una investigación sobre los patrones histológicos e histoquímicos de la matriz extracelular en mucosa oral construida ortotípicamente y heterotípicamente por ingeniería tisular tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta investigación tiene como objeto fundamental sistematizar dichos patrones en ambos modelos de mucosa oral artificial para evaluar la idoneidad arquitectural de los mismos en relación al uso alternativo de células en la generación de mucosa artificial. A tal efecto y tras enumerar los objetivos generales y específicos describiremos el material y los métodos empleados y muy especialmente los controles utilizados en el desarrollo del estudio experimental realizado. Con posterioridad expondremos los resultados y los discutiremos en el contexto de la bibliografía existente al respecto, finalmente enumeraremos las conclusiones.

## 2. OBJETIVOS

## **Objetivo General**

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es identificar los patrones histológicos e histoquímicos de la matriz extracelular de mucosa oral ortotípica y heterotípica generada por Ingeniería Tisular.

## **Objetivos Específicos**

1- Elaborar modelos ortotípicos y heterotípicos de mucosa oral artificial humana utilizando células madre queratinocíticas, células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, fibroblastos y biomateriales de fibrina-agarosa.

2- Identificar el patrón fibrilar de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial ortotípica y heterotípica con el objeto de sistematizar cualitativa y cuantitativamente la presencia de fibras de colágeno, reticulares y elásticas en el estroma.

3- Identificar el patrón histológico e histoquímico de las glicoproteínas y los proteoglicanos de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial ortotípica y heterotípica con el objeto de sistematizar cualitativa y cuantitativamente la presencia de estos componentes en el estroma.

4- Identificar el patrón histológico e inmunohistoquímico de los componentes no fibrilares agregán y versicán de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial ortotípica y heterotípica con el objeto de sistematizar cualitativa y cuantitativamente la presencia de estos componentes en el estroma.

5- Identificar el patrón histológico e inmunohistoquímico del componente no fibrilares decorín de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial ortotípica y heterotípica con el objeto de sistematizar cualitativa y cuantitativamente la presencia de este componente en el estroma.

6- Evaluar comparativamente los patrones de la matriz extracelular de ambos modelos de mucosa oral para determinar la posible utilidad del modelo de las

células madre de la gelatina de Wharton como fuente alternativa de células en mucosa oral generada por Ingeniería Tisular.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Obtención de muestras de tejido humano**

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron muestras de tejido humano correspondiente a controles de tejido conectivo humano, mucosa oral artificial generada por Ingeniería Tisular ortotípica y mucosa oral artificial generada por Ingeniería Tisular heterotípica. En todos los casos, se obtuvo consentimiento informado por parte de los donantes de tejido.

#### **3.1.1. Muestras de mucosa oral humana**

En primer lugar, se obtuvieron pequeñas biopsias de mucosa oral humana correspondientes a la zona masticatoria de donantes adultos sanos sometidos a procedimientos quirúrgicos menores mediante anestesia local en la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada. Todas las muestras correspondieron a biopsias de alrededor de 2 x 2 x 2 mm.

#### **3.1.2. Muestras de tejido conectivo humano control**

En la presente Tesis Doctoral, se analizaron tres tipos de muestras de tejido conectivo humano control. Concretamente, se obtuvieron muestras de tejido conectivo laxo (TCL), muestras de tejido conectivo denso (TCD) y muestras de tejido conectivo fibroso (TCF).

En el caso de los tejidos TCL y TCF, las muestras se obtuvieron de pacientes que presentaban enfermedad de Dupuytren sometidos a procedimiento quirúrgico en la unidad de traumatología y ortopedia del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Las muestras de TCF correspondieron al cordón fibroso palmar extirpado al paciente, mientras que las muestras de TCL correspondieron a tejido sano de la región del antebrazo del mismo paciente. Todos estos pacientes fueron varones entre los 60 a 66 años de edad con estadios avanzados de enfermedad

de Dupuytren que afectaba al movimiento de uno de los dedos. Ninguno de los pacientes había sido sometido a intervención quirúrgica previa.

En el caso de los tejidos TCD, éstos correspondieron al estroma (corion o lámina propia) de las muestras de biopsia de mucosa oral humana normal.

### **3.1.3. Muestras del cordón umbilical humano**

En la presente Tesis Doctoral se emplearon muestras de cordón umbilical humano, las cuales fueron obtenidas de recién nacidos a término nacidos por cesárea.

## **3.2. Aislamiento de células y obtención de cultivos primarios**

### **3.2.1. Fibroblastos de la mucosa oral humana**

Para obtener cultivos primarios de fibroblastos de mucosa oral, se procedió a disgregar el tejido conectivo de la mucosa oral utilizando digestión enzimática con una solución de colagenasa I (2 mg/ml) de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL Life Technologies). Tras ello, se obtuvieron los fibroblastos mediante centrifugación, cultivándolos en frascos de cultivo con medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomicina, y 0,25 mg/ml de anfotericina B).

### **3.2.2. Queratinocitos de la mucosa oral humana**

Para obtener cultivos primarios de queratinocitos, las muestras fueron cuidadosamente lavadas en solución salina de tampón fosfato (PBS), incubándose posteriormente a 4°C en una solución de dispasa II (2 mg/ml) (Gibco BRL Life

Technologies, Karlsruhe, Germany) con el fin de separar el epitelio del estroma. Inmediatamente, el epitelio separado fue cultivado en frascos de cultivo por medio de la técnica de explante con un medio especial para queratinocitos. Este medio consiste en una proporción de 3:1 de DMEM y medio Ham-F12 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 5 mg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 1,3 ng/ml de triyodotironina, 24 µg/ml de adenina, 0,4 mg/ml de hidrocortisona y antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomina, y 0,25 mg/ml de anfotericina B) (todos ellos de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU).

### **3.2.3. Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton**

Para la obtención de las células mesenquimales de la gelatina de Wharton, los cordones umbilicales humanos se lavaron en PBS, y se obtuvieron fragmentos de la gelatina de Wharton mediante disección mecánica, tras extraer los vasos sanguíneos del cordón. Estos fragmentos de la gelatina de Wharton fueron sometidos a digestión enzimática utilizando una mezcla de colagenasa tipo I (Gibco BRL Life Technologies) y 0,5 g/l de tripsina con 0,2 g/l de EDTA (Gibco BRL Life Technologies). Las células aisladas fueron cultivadas en medio de cultivo AmnioMAX (Gibco BRL Life Technologies).

## **3.3. Generación de sustitutos de la mucosa oral humana mediante Ingeniería Tisular**

### **3.3.1. Mucosa oral artificial humana ortotípica (MO)**

Para elaborar sustitutos ortotípicos de la mucosa oral humana mediante Ingeniería Tisular (MO), se utilizaron las células epiteliales (queratinocitos) y estromales (fibroblastos) de mucosa oral previamente aislados y mantenidos en cultivo, combinadas con biomateriales de fibrina y agarosa. Para ello, en primer lugar se

generó un sustituto del corion o lámina propia de la mucosa oral y, en segundo lugar, se generó un epitelio en su superficie.

Para la generación del sustituto del corion de la mucosa oral mediante técnicas de Ingeniería Tisular, se utilizaron 250.000 fibroblastos orales humanos mantenidos en cultivo. Una vez obtenidas las células, se realizó una mezcla de plasma humano con una solución caliente de agarosa tipo VII en PBS hasta una concentración final del agarosa de 0,1%, añadiéndose ácido tranexámico, y cloruro de calcio con el objetivo de inducir el proceso de gelificación, siguiendo protocolos previamente publicados (Garzon *et al.*, 2009; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007; Scionti *et al.*, 2014). La mezcla obtenida fue alicuotada en insertos porosos tipo Transwell (Corning Inc., Corning, NY) e incubados a 37°C.

Una vez, gelificado el estroma de fibrina y agarosa, se utilizaron 500.000 queratinocitos de mucosa oral humana mantenidos en cultivo, los cuales se subcultivaron sobre la superficie estromal artificial, manteniéndose en cultivo durante siete días, inmersas en medio de cultivo de queratinocitos. Con el objetivo, de inducir la estratificación y maduración de las células epiteliales en el sustituto de mucosa oral humana, se utilizó la técnica de aire-liquido durante la segunda y tercera semanas de cultivo in vitro (Carriel *et al.*, 2013; Carriel *et al.*, 2012; Garzon *et al.*, 2009; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007).

### **3.3.2. Mucosa oral artificial humana heterotípica (hMO)**

La elaboración de mucosa oral artificial heterotípica (hMO) mediante técnicas de Ingeniería Tisular se llevó a cabo utilizando células madre de la gelatina de Wharton subcultivados sobre los estromas artificiales de fibroblastos orales y biomateriales de fibrina-agarosa.

En primer lugar, se generaron sustitutos artificiales del corion o lámina propia de la mucosa oral utilizando el mismo protocolo que se describió para la generación de sustitutos del corion de los constructos ortotípicos MO.



En segundo lugar, se subcultivaron 500.000 células madre de la gelatina de Wharton sobre la superficie del estroma artificial, manteniéndose durante 7 días sumergidas en medio de cultivo de queratinocitos para inducir el proceso de diferenciación hacia células epiteliales de la mucosa oral sobre el sustituto estromal. Al igual que se hizo en los sustitutos MO, los constructos hMO fueron sometidos a técnica de cultivo aire-líquido durante la segunda y tercera semana de desarrollo in vitro para potenciar el proceso de diferenciación epitelial de las células madre de la gelatina de Wharthon.

### **3.4. Evaluación in vivo de los sustitutos de mucosa oral artificial humana ortotípicos y heterotípicos**

Con el fin de evaluar el comportamiento in vivo de los sustitutos de mucosa oral generados en esta Tesis Doctoral (MO y hMO), ambos tipos de sustitutos de la mucosa oral fueron implantados en 9 ratones atímicos desnudos nu/nu inmunodeprimidos de 6 semanas de edad (Harlan, Indianápolis, IN). Todos los animales fueron adecuadamente anestesiados usando una mezcla de acepromacina (Calmo-Neosan<sup>®</sup> 0.001 mg por g de peso del animal) y ketamina (Imalgene 1000<sup>®</sup> 0,15 mg por g de peso del animal), tras inyección subcutánea de atropina.

Los tejidos artificiales MO y hMO obtenidos mediante técnicas de Ingeniería Tisular fueron implantados en la región dorsal de los animales con el objetivo de determinar el comportamiento in vivo de dichos tejidos. Los ratones fueron sacrificados 30 días después de la implantación de los tejidos de MO y hMO, extrayéndose estos tejidos para análisis histológico. Todos los procedimientos fueron realizados bajo las más estrictas normas de ética y seguridad biológica.

### **3.5. Análisis histológico mediante microscopía óptica**

Para determinar la morfología y estructura de cada uno de los tejidos evaluados en la presente Tesis Doctoral, las muestras de estudio correspondientes a los controles TCL, TCD y TCF, así como las muestras de mucosa oral artificial MO y hMO mantenidas in vitro durante 1, 2 y 3 semanas, así como las muestras implantadas in vivo durante 30 días, fueron fijadas en formalina neutra al 10% (formaldehído 4%), incluidas en parafina y cortadas a 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Dichas muestras fueron desparafinizadas y teñidas con hematoxilina y eosina para su posterior análisis histológico mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i.

### **3.6. Análisis histológico mediante microscopía electrónica de transmisión**

Para el análisis de los tejidos control y los tejidos artificiales generados por Ingeniería Tisular (MO y hMO) mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% y se incluyeron en resina epóxica, cortándose en secciones de 50nm de espesor. Para su análisis, estas secciones fueron teñidas con acetato acuoso de uranilo, observándose con un microscopio electrónico de transmisión EM902 Carl Zeiss Meditec, Inc. (Oberkochen, Germany).

### **3.7. Análisis histoquímico de componentes fibrilares y no fibrilares de la Matriz Extracelular**

Para el análisis de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular mediante histoquímica en las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral (controles y mucosa oral artificial MO y hMO), se obtuvieron secciones de los diferentes tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, procediéndose a su desparafinización en xilol durante 15 minutos (dos veces) y su posterior

rehidratación usando diluciones crecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada.

Tras ello, se realizaron tinciones de picrosirius para evaluar la presencia de colágeno, de Verhoeff para determinar la presencia de fibras reticulares, de Gomori para la detección de fibras elásticas, de ácido peryódico de Schiff (PAS) para identificar glicoproteínas y de azul alcian para determinar la presencia de proteoglicanos (Alfonso-Rodriguez *et al.*, 2014; Carriel *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013).

### **3.7.1. Tinción mediante el método histoquímico de Picrosirius**

La técnica de picrosirius es una técnica muy utilizada para identificar colágeno, uno de los componentes fibrilares más importantes de la matriz extracelular. Para tal objeto, las secciones de las muestras de estudio (controles, MO y hMO) se tiñeron durante 30 minutos en una solución Sirius red F3B, contrastándose con hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron sometidas a deshidratación utilizando alcoholes de concentración ascendente (70°, 96°, 100°) y xilol y se montaron con cubreobjetos utilizando medio de montaje histológico.

### **3.7.2. Tinción mediante el método histoquímico de Gomori**

La detección de las fibras reticulares se realizó mediante la tinción histoquímica de Gomori. Este método de impregnación metálica utiliza sales metálicas y precipitación de un metal (plata principalmente) que se reduce sobre las fibras reticulares. En este caso, las muestras de estudio fueron sumergidas en permanganato de potasio al 1% durante 1 minuto, y en metabisulfito de sodio al 2% durante 1 minuto. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a sensibilización con alumbre de hierro al 2% durante 2 minutos e incubadas en oscuridad durante 15 minutos en plata amoniacal y en formaldehído al 20%

durante 3 minutos. Finalmente, la diferenciación se realizó con cloruro de oro al 2% durante 5 minutos y en tiosulfato durante 1 minuto, contrastándose con hematoxilina. Finalmente, las muestras fueron sometidas a deshidratación utilizando alcoholes de concentración ascendente (70°, 96°, 100°) y xilol y se montaron con cubreobjetos utilizando medio de montaje histológico.

### **3.7.3. Tinción mediante el método histoquímico de Verhoeff**

Para identificar la presencia de fibras elásticas, se utilizó la tinción histoquímica de Verhoeff. Para ello, las muestras se incubaron en solución de trabajo Verhoeff durante 30 minutos en oscuridad. Esta solución consistió en hematoxilina alcohólica al 10%, alcohol etílico 70°, cloruro férrico al 10% y solución de yodo de Verhoeff. Posteriormente, se realizaron tres lavados en agua destilada durante 5 minutos cada uno. Las muestras fueron inmediatamente diferenciadas en coluro férrico durante 5 minutos en oscuridad. Después, las muestras fueron sumergidas en tiosulfato de sodio durante 1 minuto y lavadas abundantemente en agua destilada. Finalmente, se realizó contraste con hematoxilina durante 20 segundos. Finalmente, las muestras fueron sometidas a deshidratación utilizando alcoholes de concentración ascendente (70°, 96°, 100°) y xilol y se montaron con cubreobjetos utilizando medio de montaje histológico.

### **3.7.4. Tinción mediante el método histoquímico de tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)**

El método de tinción mediante ácido peryódico de Schiff (PAS) permite la identificación de glicoproteínas y mucosustancias neutras. En la presente Tesis Doctoral, las muestras a analizar mediante este método fueron sometidas a oxidación, sumergiéndolas en una solución de ácido peryódico al 0,5% durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en reactivo de Schiff durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron contrastadas

rápidamente durante 20 segundos usando hematoxilina para su posterior deshidratación, aclarado y montaje con cubreobjetos.

### **3.7.5. Tinción mediante el método histoquímico de azul alcian**

El análisis del contenido de proteoglicanos se realizó mediante la técnica histoquímica de azul alcian. Para realizar este protocolo de tinción, las muestras fueron incubadas en solución de azul alcian de pH 2,5 durante 30 minutos. Una vez teñidas, las muestras fueron contrastadas con reactivo *nuclear fast red* durante 5 minutos para su posterior deshidratación y aclaramiento utilizando alcoholes ascendentes hasta llegar a xilol, (70°, 96°, 100°). Por último, las muestras fueron deshidratadas, aclaradas y montadas con cubreobjetos.

### **3.7. Análisis inmunohistoquímico de componentes no fibrilares de la Matriz Extracelular**

Para el análisis de ciertos componentes no fibrilares de la matriz extracelular con alta sensibilidad (los proteoglicanos agregan, versican y decorin), se utilizaron métodos inmunohistoquímicos basados en anticuerpos específicos. Para ello, se obtuvieron secciones de los diferentes tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, procediéndose a su desparafinización en xilol durante 15 minutos (dos veces) y su posterior rehidratación usando diluciones crecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada.

Una vez rehidratadas las muestras, se procedió a su incubación en condroitinasa ABC (Sigma Aldrich) durante una hora en una cámara húmeda a 37°C para recuperación antigénica. Posteriormente, se realizó el bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos con suero de caballo (Vector, Burlingame, CA, EEUU). Posteriormente, las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-decorin (dilución 1:500) (R&D systems, Minneapolis, MN, EEUU), anti-versican (1:100) (ABcam, Cambridge, UK) y anti-agregan (1:250) (ABcam, Cambridge, UK)

durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras lavar tres veces en PBS, se aplicó un anticuerpo secundario (Vector Laboratories), incubándose durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, lavándose tres veces en PBS. Finalmente, para inducir la reacción colorimétrica, se utilizó un kit comercial de 3,-diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories) durante 2 minutos. Finalmente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina durante 20 segundos, se deshidrataron en alcoholes crecientes, se aclararon en xilol y se montaron con cubreobjetos utilizando medio de montaje resinoso.

### **3.8. Análisis cuantitativo**

Una vez identificados los diferentes componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular utilizando métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos, se procedió al análisis cuantitativo de la intensidad de señal obtenida para cada técnica. Para ello, se utilizó el programa Image J diseñado por el *National Institutes of Health* (NIH) de EEUU.

Para cada una de las técnicas y para cada tipo de muestra (controles y muestras de mucosa oral artificial), se obtuvieron tres imágenes histológicas, cuantificándose la intensidad de señal en diez puntos tomados aleatoriamente en el estroma de cada una de las muestras. Tras ello, se obtuvieron valores medios y desviaciones estándar para cada muestra y cada técnica, y se normalizaron todos los valores respecto al valor obtenido por el control correspondiente al corion de la mucosa oral humana (TCD) en cada método histoquímico o inmunohistoquímico. De este modo, se consideró que la intensidad correspondiente a TCD era 100% para todos los métodos, expresándose la señal del resto de las muestras en referencia a este 100%.

### **3.9. Análisis estadístico**

Para la identificación de diferencias estadísticas en la intensidad obtenida para cada método histoquímico o inmunohistoquímico entre las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral (controles TCL, TCD y TCF y muestras MO y hMO mantenidas in vitro durante 1, 2, y 3 semanas e in vivo durante 30 días), se aplicó la prueba estadística t de Student. Esta prueba se aplicó tras demostrar que las muestras cumplían los criterios para la utilización de métodos paramétricos, y tras aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En todos los casos, se aplicaron tests de doble cola, considerándose significativos los valores de p menores de 0,05.

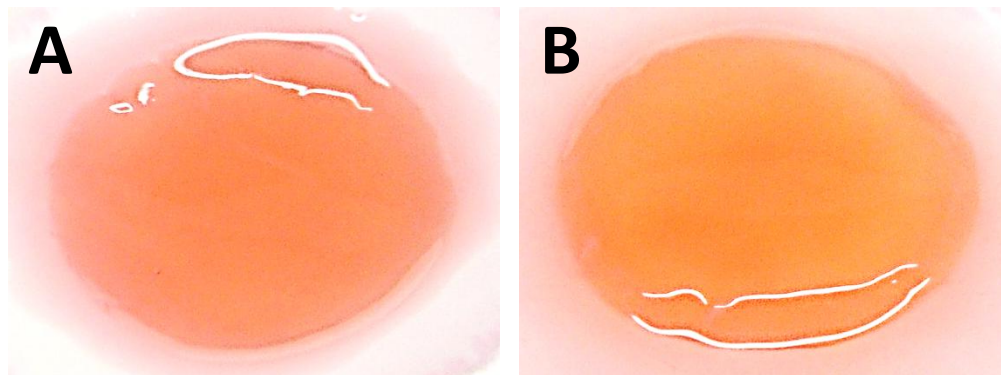
## 4. RESULTADOS



#### **4.1. Generación de Sustitutos de Mucosa Oral Artificial Humana Ortotípica y Heterotípica Mediante Ingeniería Tisular**

La aplicación de los métodos que se describen en el apartado anterior de esta Tesis Doctoral nos permitió generar eficientemente sustitutos de mucosa oral humana mediante Ingeniería Tisular. Como se puede apreciar en la Figura 7, las muestras de mucosa oral artificial humana ortotípica compartían numerosas similitudes con las muestras heterotípicas a nivel macroscópico, presentando ambas buena consistencia, manipulabilidad, resistencia y elasticidad.

A nivel macroscópico, no se apreciaron diferencias entre ambos tipos de sustitutos biológicos (MO y hMO).



**Figura 7. Aspecto macroscópico de los sustitutos de mucosa oral artificial humana generados en esta Tesis Doctoral. A: muestras de mucosa oral artificial humana ortotípica. B: muestras de mucosa oral artificial humana heterotípica.**

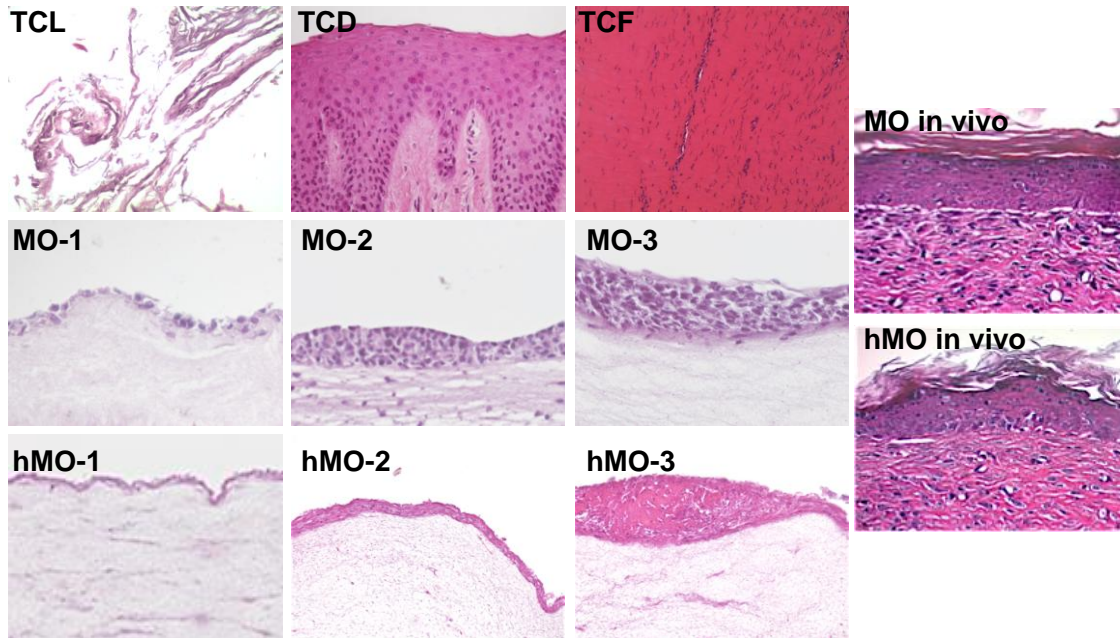
#### **4.2. Análisis Histológico del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica Mediante Tinción con Hematoxilina y Eosina**

En primer lugar, el análisis histológico de los tejidos TCL, TCD y TCF utilizados como control utilizando hematoxilina-eosina reveló la presencia de una red fibrilar de tipo laxo, en el caso del TCL, de tipo denso, en los TCD y de tipo muy denso y

fibroso en los tejidos TCF. Asimismo, se observó una población celular de tipo fibroblástico inmersa en esta red fibrilar, la cual fue más abundante en los tejidos con mayor abundancia en componente fibrilar (Figura 8).

En segundo lugar, el análisis histológico de los estromas de los tejidos artificiales desarrollados mediante Ingeniería Tisular mostró una red fibrilar muy homogénea, con un número variable de fibroblastos inmersos en el biomaterial de fibrina-agarosa. En general, los tejidos mantenidos en cultivo presentaron un estroma muy laxo y con un escaso componente celular. Como se muestra en la Figura 8, todos los modelos de mucosa oral artificial humana presentaron un estrato epitelial con un número de capas que tendía a incrementarse con el tiempo, alcanzando más de 15 capas en las muestras mantenidas in vitro durante 3 semanas. En general, se observaron grandes similitudes entre los modelos ortotípico (MO) y heterotípico (hMO) de mucosa oral artificial, aunque las células del modelo hMO tendían a presentar mayores niveles de compactación, formándose un epitelio muy denso en comparación con el modelo MO. Ninguno de los modelos presentó crestas epiteliales, papilas coriales, vasos sanguíneos o nervios mientras se mantuvieron en cultivo.

Una vez que los tejidos artificiales de MO y hMO fueron implantados in vivo (Figura 8), se observó un gran desarrollo y maduración de dichos tejidos. En concreto, por un lado se apreció la formación de estratos bien diferenciados a nivel epitelial, con formación de estratos córneos a nivel apical, aunque no se observaron crestas epiteliales a nivel basal. Por otro lado, el estroma artificial presentó un gran número de vasos sanguíneos y una abundante población celular inmersa en una densa red fibrilar que compartía numerosas similitudes con el corion de la mucosa oral humana nativa (TCD), siendo más densa que el TCL y menos densa que el TCF.



**Figura 8. Análisis histológico mediante tinción con hematoxilina y eosina de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotópica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotópica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotópica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

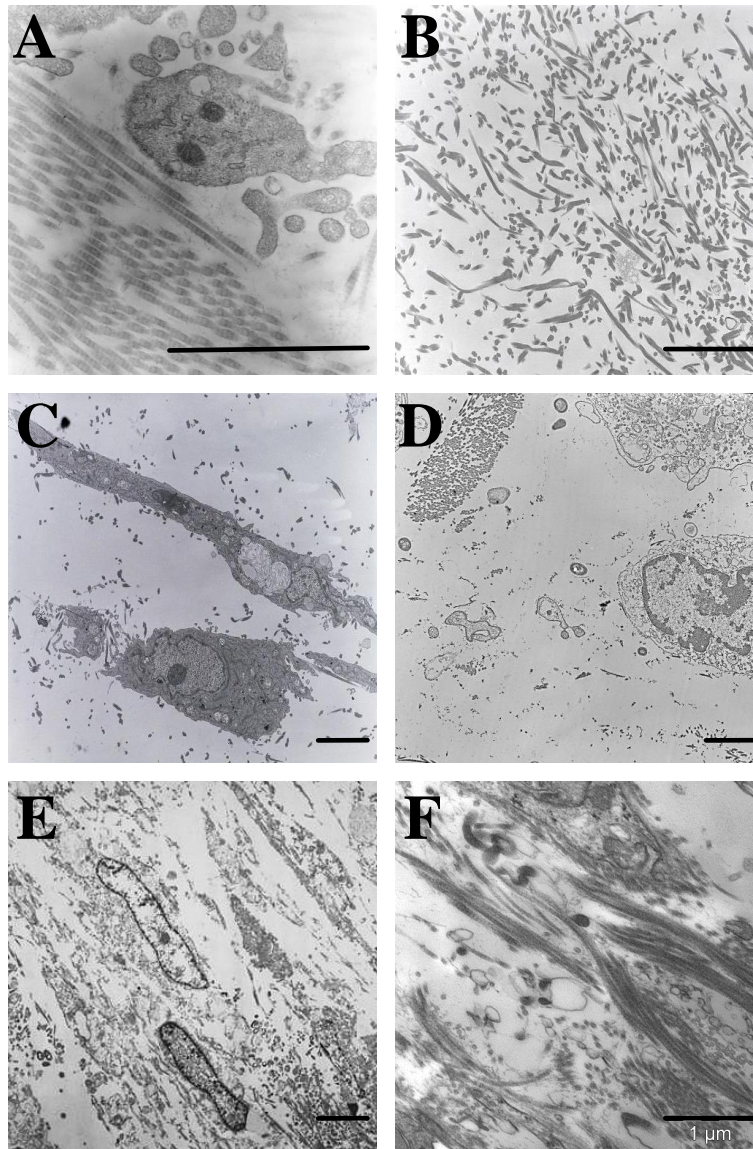
#### **4.3. Análisis Histológico del Estroma de la Mucosa Oral Artotópica y Heterotópica Mediante Microscopía Electrónica de Transmisión**

El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral (Figura 9) mostró la presencia de fibras de colágeno ordenadas y típicamente orientadas en las muestras control TCD. En el

caso del biomaterial de fibrina-agarosa, se observó una red de fibras electrodensas mal orientadas correspondientes fundamentalmente a las fibras de fibrina.

Cuando se analizaron las muestras de mucosa oral humana generadas mediante Ingeniería Tisular y mantenidas en cultivo durante 3 semanas, se observó la presencia de numerosos fibroblastos con abundantes organelas de síntesis (ribosomas, retículo endoplasmático, etc.) rodeadas de las fibras de fibrina-agarosa sin orientación definida, no encontrándose diferencias entre las muestras MO y las hMO.

Finalmente, el análisis de las muestras de mucosa oral artificial implantadas in vivo reveló la presencia de una amplia población celular inmersa en una densa matriz extracelular formada mayoritariamente por fibras de colágeno bien orientadas similares a las que se encontraron en las muestras control. No se encontraron restos de la malla de fibrina-agarosa en ninguna de las muestras implantadas in vivo en animales de laboratorio.

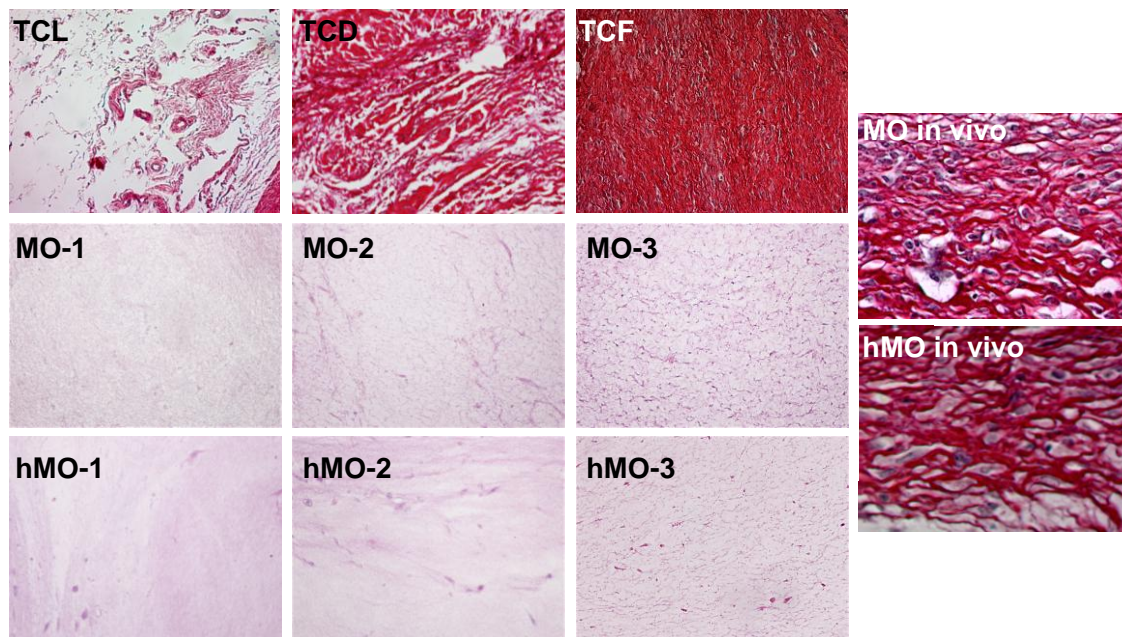


**Figura 9. Análisis de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).** A: estroma de la mucosa oral humana nativa utilizada como control (TCD). B: biomaterial de fibrina-agarosa utilizado para la generación de mucosa oral artificial. C: estroma artificial correspondiente a las muestras ortotópicas mantenidas en cultivo durante 3 semanas (OM-3). D: estroma de las muestras ortotópicas implantadas en animales durante 30 días (OM in vivo). E: estroma artificial correspondiente a las muestras heterotópicas mantenidas en cultivo durante 3 semanas (hOM-3). F: estroma de las muestras heterotópicas implantadas en animales durante 30 días (hOM in vivo).

#### 4.4. Análisis de Componentes Fibrilares de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

##### 4.4.1. Análisis de Fibras de Colágeno de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

El análisis cualitativo de la presencia de fibras de colágeno mediante la técnica histoquímica de Picrosirius mostró importantes diferencias entre las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral. Como se puede apreciar en la (Figura 10), la intensidad de la tinción histoquímica fue superior en las muestras control y en los tejidos implantados in vivo que en las muestras mantenidas in vitro.



**Figura 10. Análisis histoquímico mediante tinción Picrosirius de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3

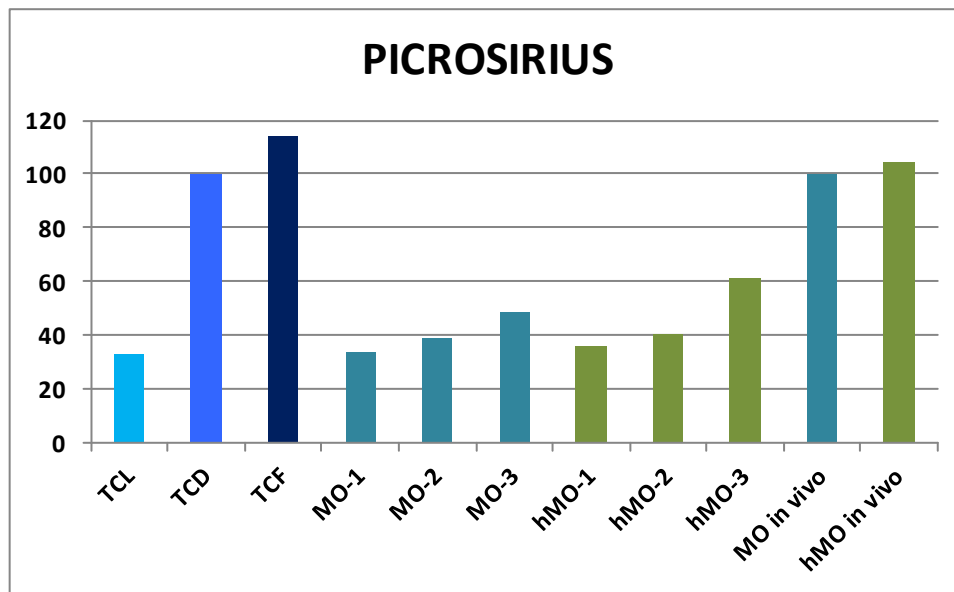
semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

Por otro lado, el análisis cuantitativo reveló la existencia de diferencias significativas entre las distintas muestras analizadas. Como se aprecia en las Tablas 1 y 2 y en la Figura 11, las muestras implantadas in vivo (tanto la MO como la hMO) presentaron niveles de intensidad de colágeno similares al control TCD, mientras que las TCF presentaron niveles significativamente más altos que el resto de las muestras analizadas. En general, las muestras mantenidas in vitro presentaron escasos niveles de tinción para este componente de la matriz extracelular.

	MEDIA	DE
TCL	32.7	36.1
TCD	100.0	2.4
TCF	114.1	18.7
MO-1	33.4	25.5
MO-2	39.3	15.8
MO-3	48.4	20.2
hMO-1	35.9	21.3
hMO-2	40.1	21.5
hMO-3	61.3	29.7
MO in vivo	99.7	11.9
hMO in vivo	104.4	12.6

**Tabla 1. Cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para fibras de colágeno en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de tinción para fibras de colágeno en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro

durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 11. Cuantificación de fibras de colágeno en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores



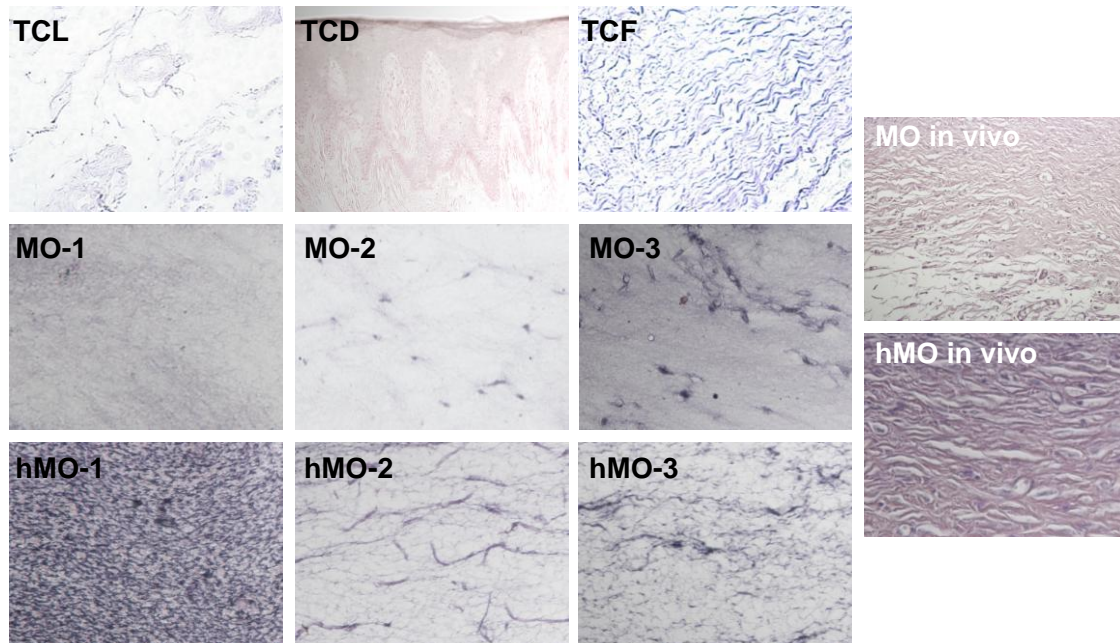
corresponden a la intensidad de tinción para fibras de colágeno en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

PICROSIRIUS	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.
TCF	0.0008	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007	0.0132
TCL	0.0000	0.0000	-	N.S.	N.S.	0.0268	N.S.	N.S.	0.0009	0.0000	0.0000
MO-1	0.0000	0.0000	N.S.	-	N.S.	0.0081	N.S.	N.S.	0.0002	0.0000	0.0000
MO-2	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.	-	0.0331	N.S.	N.S.	0.0008	0.0000	0.0000
MO-3	0.0000	0.0000	0.0268	0.0081	0.0331	-	0.0127	N.S.	0.0324	0.0000	0.0000
hMO-1	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.	N.S.	0.0127	-	N.S.	0.0003	0.0000	0.0000
hMO-2	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	0.0016	0.0000	0.0000
hMO-3	0.0000	0.0000	0.0009	0.0002	0.0008	0.0324	0.0003	0.0016	-	0.0000	0.0000
MO in vivo	N.S.	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	N.S.
hMO in vivo	N.S.	0.0132	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	-

**Tabla 2. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para fibras de colágeno en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.4.2. Análisis de Fibras Reticulares de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

La aplicación de la técnica histoquímica de Gomori a las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral demostró la escasez de fibras reticulares en todas las muestras, incluyendo los controles y la mucosa oral generada en laboratorio mediante Ingeniería Tisular (Figura 12). Además, el análisis cuantitativo confirmó que este tipo de componente fibrilar de la matriz extracelular no presentaba diferencias entre los distintos tipos de muestras analizadas (Tablas 3 y 4 y Figura 13).

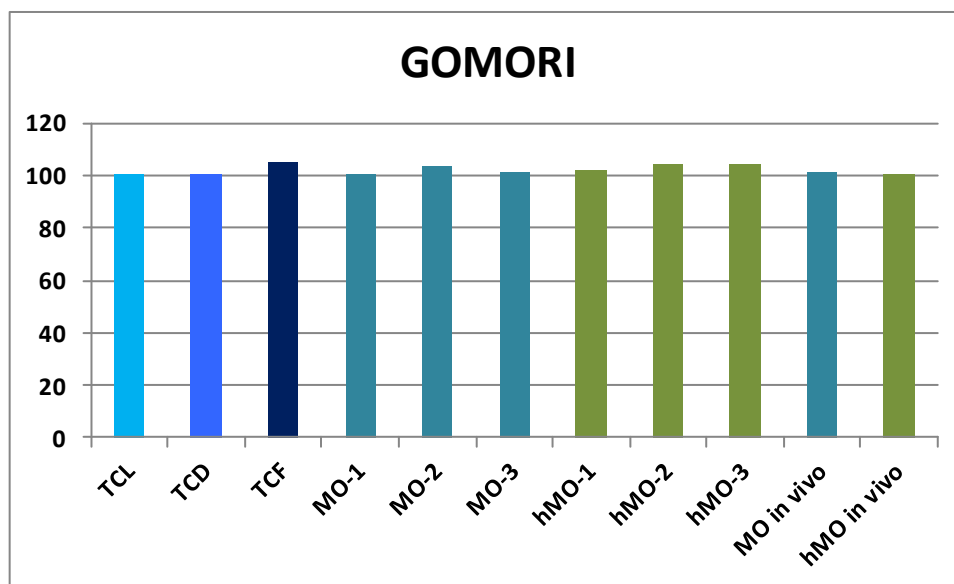


**Figura 12. Análisis histoquímico mediante tinción de Gomori de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3

semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

	MEDIA	DE
TCL	100.0	13.1
TCD	100.0	13.1
TCF	105.0	13.4
MO-1	100.0	17.0
MO-2	103.0	16.1
MO-3	101.0	15.1
hMO-1	102.0	15.2
hMO-2	104.0	12.5
hMO-3	104.0	12.8
MO in vivo	101.0	13.0
hMO in vivo	100.0	5.6

**Tabla 3. Cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para fibras reticulares en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de tinción para fibras reticulares en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 13. Cuantificación de fibras reticulares en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores corresponden a la intensidad de tinción para fibras reticulares en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

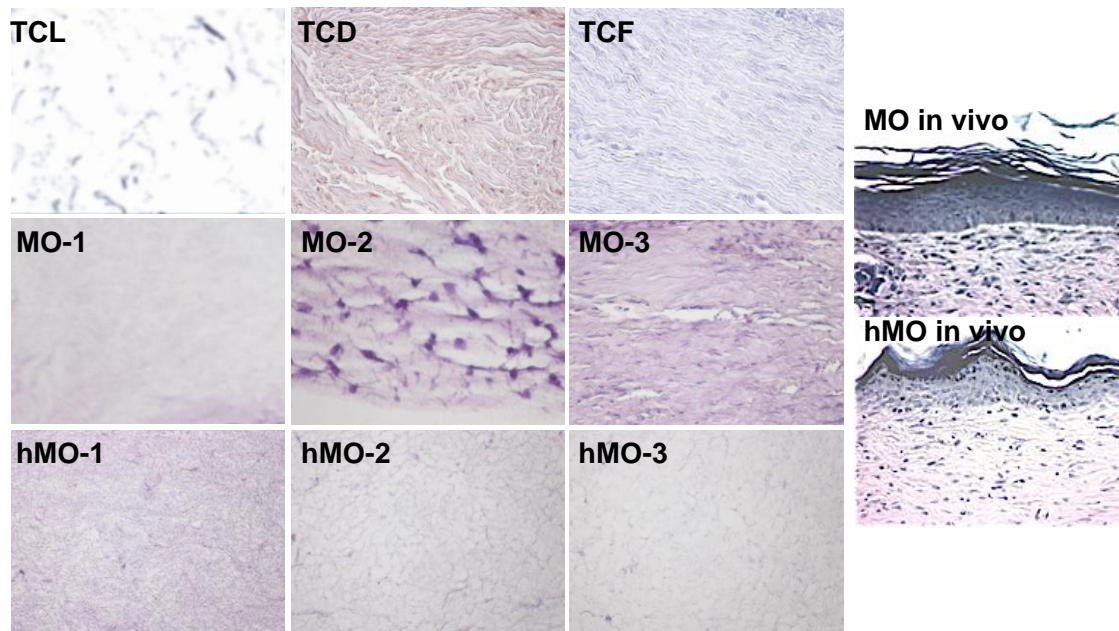
GOMORI	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
TCF	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
TCL	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MO-1	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MO-2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MO-3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
hMO-1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
hMO-2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.
hMO-3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.
MO in vivo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.
hMO in vivo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-

**Tabla 4. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para fibras reticulares en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.4.3. Análisis de Fibras Elásticas de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

Al igual que ocurría en el caso de las fibras reticulares, el análisis cualitativo y cuantitativo de fibras elásticas en los diferentes tejidos control (TCL, TCD y TCF) y generados por Ingeniería Tisular (MO y hMO) demostró muy escasa presencia de

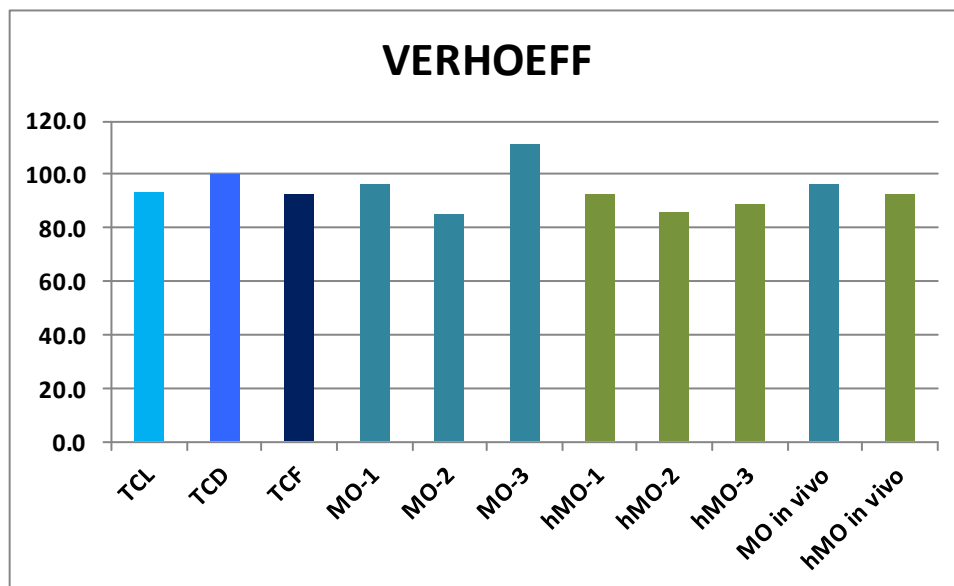
fibras elásticas en todas estas muestras, no existiendo diferencias significativas entre dichos tejidos (Figuras 14 y 15 y Tablas 5 y 6).



**Figura 14. Análisis histoquímico mediante tinción de Verhoeff de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotópica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotópica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotópica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>
<b>TCL</b>	93.3	22.0
<b>TCD</b>	100	13.1
<b>TCF</b>	92.6	5.8
<b>MO-1</b>	96.3	3.7
<b>MO-2</b>	85.2	5.9
<b>MO-3</b>	111.1	9.5
<b>hMO-1</b>	92.5	6.5
<b>hMO-2</b>	86.0	6.8
<b>hMO-3</b>	88.9	5.0
<b>MO in vivo</b>	96.3	44.0
<b>hMO in vivo</b>	92.6	43.2

**Tabla 5. Cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para fibras elásticas en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de tinción para fibras elásticas en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 15. Cuantificación de fibras elásticas en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores corresponden a la intensidad de tinción para fibras elásticas en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).



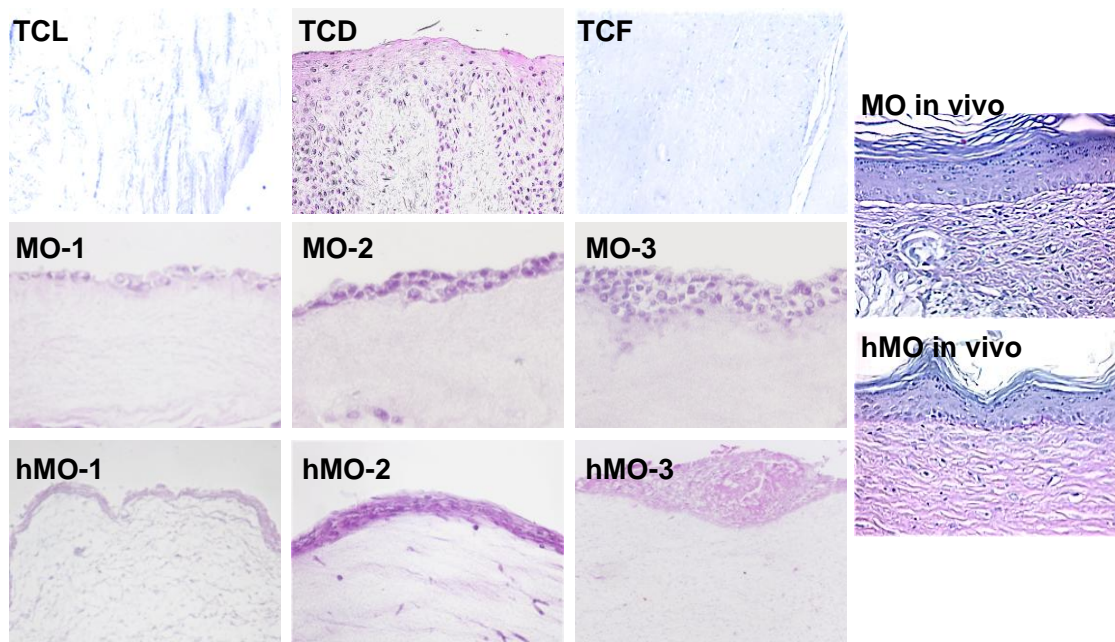
VERHOEFF	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
TCF	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
TCL	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MO-1	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MO-2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MO-3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
hMO-1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
hMO-2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.
hMO-3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.
MO in vivo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.
hMO in vivo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-

**Tabla 6. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para fibras elásticas en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.5. Análisis de Componentes no Fibrilares de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica

##### 4.5.1. Análisis de Glicoproteínas de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotópica y Heterotópica

La determinación de glicoproteínas de matriz extracelular mediante la técnica del PAS reveló la existencia de diferencias entre los tejidos analizados. En primer lugar, el análisis cualitativo mostró escasa presencia de estos componentes en el estroma de los diferentes tipos de tejido, existiendo mayor presencia de glicoproteínas en las muestras implantadas in vivo (Figura 16).



**Figura 16. Análisis histoquímico mediante tinción PAS de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotópica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2:

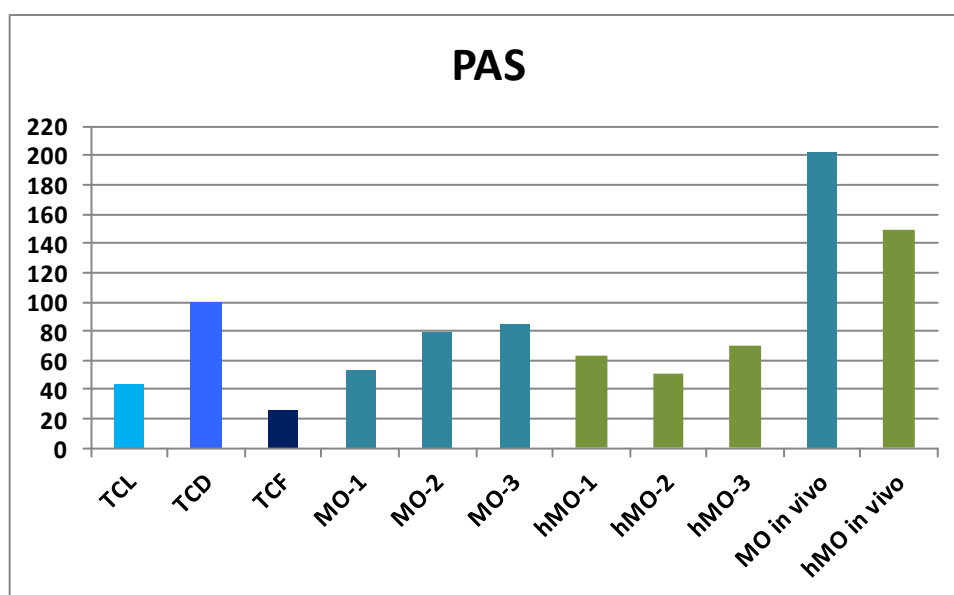
mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotópica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotópica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotópica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

El análisis cuantitativo de glicoproteínas identificadas mediante tinción PAS confirmó la mayor presencia de estos componentes en las muestras implantadas in vivo en animales de experimentación, las cuales presentaron niveles significativamente mayores de glicoproteínas que el resto de las muestras, con la excepción de los controles TCD (Tablas 7 y 8 y Figura 17). En general, las muestras de mucosa oral mantenidas in vitro tendieron a mostrar menor cantidad de glicoproteínas que el control TCD, mientras que los controles TCF presentaron niveles significativamente menores de estos componentes que el resto de las muestras analizadas.

	MEDIA	DE
TCL	44.6	3.0
TCD	100.0	3.2
TCF	26.4	2.2
MO-1	53.7	14.0
MO-2	79.1	14.6
MO-3	85.0	14.5
hMO-1	62.6	15.3
hMO-2	51.5	15.2
hMO-3	70.4	15.8
MO in vivo	202.2	15.2
hMO in vivo	148.5	16.5

**Tabla 7. Cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para glicoproteínas en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de tinción para glicoproteínas en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose

la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 17. Cuantificación de glicoproteínas en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2

semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores corresponden a la intensidad de tinción para glicoproteínas en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

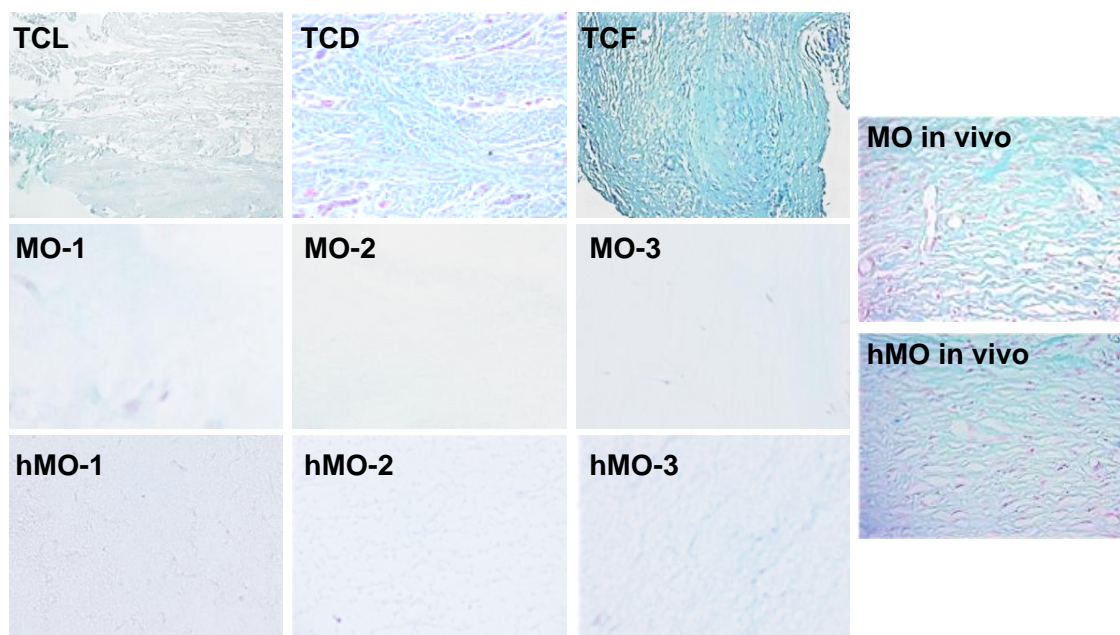
PAS	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	0.0010	0.0126	0.0157	N.S.	N.S.	0.0418	0.0124	N.S.	N.S.	N.S.
TCF	0.0010	-	N.S.	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0053	0.0001
TCL	0.0126	N.S.	-	N.S.	0.0219	0.0099	N.S.	N.S.	N.S.	0.0098	0.0004
MO-1	0.0157	0.0000	N.S.	-	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.	0.0003	0.0131	0.0007
MO-2	N.S.	0.0000	0.0219	0.0000	-	N.S.	0.0048	0.0000	0.0232	0.0309	0.0054
MO-3	N.S.	0.0000	0.0099	0.0000	N.S.	-	0.0005	0.0000	0.0010	0.0379	0.0089
hMO-1	0.0418	0.0000	N.S.	N.S.	0.0048	0.0005	-	0.0490	N.S.	0.0177	0.0014
hMO-2	0.0124	0.0000	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000	0.0490	-	0.0001	0.0121	0.0006
hMO-3	N.S.	0.0000	N.S.	0.0003	0.0232	0.0010	N.S.	0.0001	-	0.0230	0.0027
MO in vivo	N.S.	0.0053	0.0098	0.0131	0.0309	0.0379	0.0177	0.0121	0.0230	-	N.S.
hMO in vivo	N.S.	0.0001	0.0004	0.0007	0.0054	0.0089	0.0014	0.0006	0.0027	N.S.	-

**Tabla 8. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para glicoproteínas en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo:

mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.5.2. Análisis de Proteoglicanos de la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

Para identificar proteoglicanos de la matriz extracelular, las diferentes muestras se tiñeron utilizando la técnica histoquímica del azul alcian. A este respecto, nuestros resultados muestran escasa presencia de estos componentes no fibrilares en la matriz extracelular de los tejidos mantenidos in vitro, siendo más abundantes en los tejidos implantados in vivo, así como en los controles. Asimismo, el análisis cualitativo revela gran abundancia de proteoglicanos en los controles TCF, seguidos de los controles TCD, siendo éstos menos abundantes en los controles TCL (Figura 18).



**Figura 18. Análisis histoquímico mediante tinción de azul alcian de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1

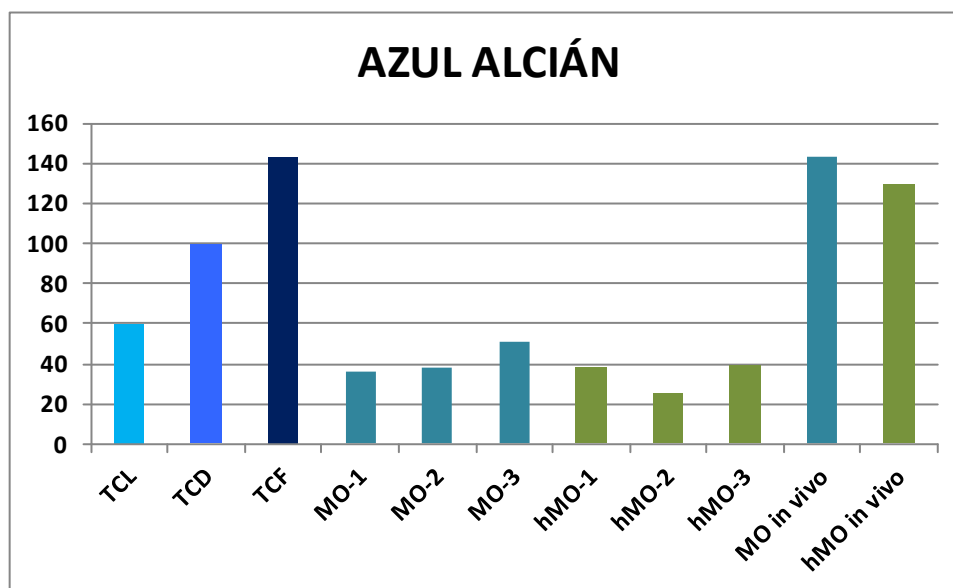
semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

La cuantificación de proteoglicanos en la matriz extracelular de las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral demostró que la mayor concentración de estos componentes correspondió a los tejidos fibrosos TCF, los cuales fueron significativamente mayores a todas las muestras mantenidas in vitro y a los controles TCL y TCD, aunque no a las muestras implantadas in vivo. Asimismo, la cuantificación confirmó la mayor presencia de estos componentes en los tejidos artificiales implantados in vivo en comparación con todas las demás muestras, excepto las TCF (Tablas 9 y 10 y Figura 19).

	MEDIA	DE
TCL	59.9	7.4
TCD	100.0	0.7
TCF	143.7	13.1
MO-1	36.5	3.2
MO-2	37.6	1.1
MO-3	51.4	1.0
hMO-1	38.3	5.9
hMO-2	24.8	1.7
hMO-3	39.2	3.2
MO in vivo	143.7	17.1
hMO in vivo	129.3	10.0

**Tabla 9. Cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para proteoglicanos en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de tinción para proteoglicanos en cada muestra,

normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 19. Cuantificación de proteoglicanos en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores corresponden a la intensidad de tinción para proteoglicanos en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

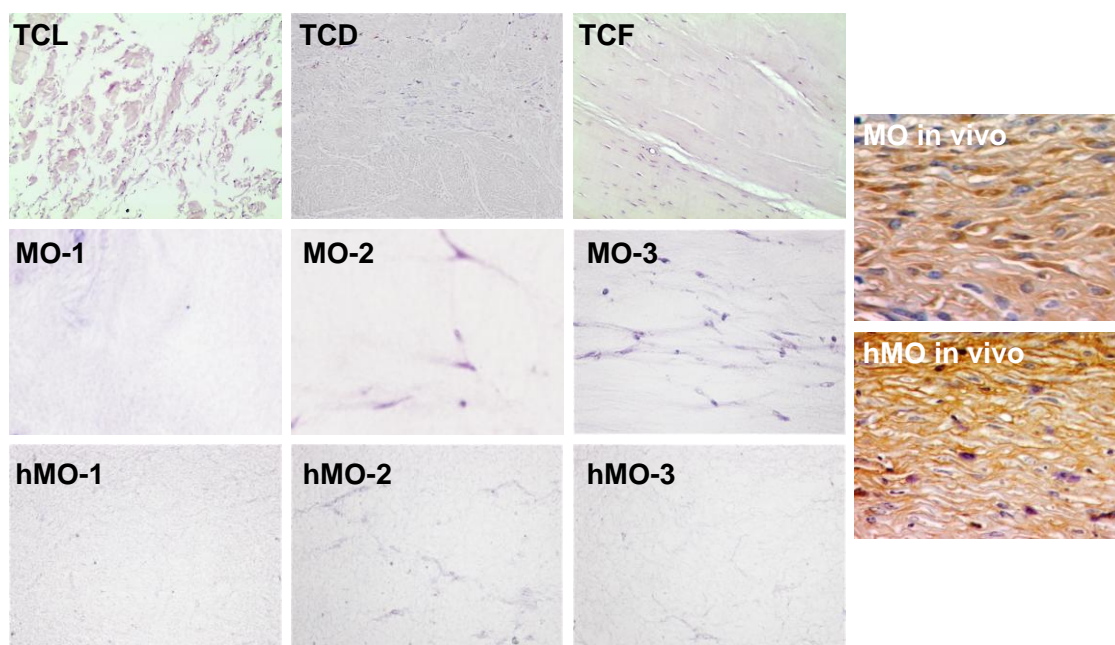
AZUL ALCIÁN	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0058	0.0027
TCF	0.0012	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.
TCL	0.0000	0.0000	-	0.0014	0.0021	N.S.	0.0050	0.0001	0.0034	0.0000	0.0000
MO-1	0.0000	0.0000	0.0014	-	N.S.	0.0001	N.S.	0.0004	N.S.	0.0000	0.0000
MO-2	0.0000	0.0000	0.0021	N.S.	-	0.0000	N.S.	0.0000	N.S.	0.0000	0.0000
MO-3	0.0000	0.0000	N.S.	0.0001	0.0000	-	0.0123	0.0000	0.0004	0.0000	0.0000
hMO-1	0.0000	0.0000	0.0050	N.S.	N.S.	0.0123	-	0.0105	N.S.	0.0000	0.0000
hMO-2	0.0000	0.0000	0.0001	0.0004	0.0000	0.0000	0.0105	-	0.0001	0.0000	0.0000
hMO-3	0.0000	0.0000	0.0034	N.S.	N.S.	0.0004	N.S.	0.0001	-	0.0000	0.0000
MO in vivo	0.0058	N.S.	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	N.S.
hMO in vivo	0.0027	N.S.	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	-

**Tabla 10. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la intensidad de tinción histoquímica para proteoglicanos en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo:

mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.5.3. Análisis Inmunohistoquímico del Contenido de Agrecán en la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

El análisis inmunohistoquímico cualitativo de las muestras control y de mucosa oral artificial utilizando anticuerpos anti-agrecán reveló la presencia de este proteoglicano en la matriz extracelular de los tejidos artificiales implantados in vivo, y su total ausencia en los controles y en las muestras mantenidas in vitro (Figura 20).



**Figura 20. Análisis inmunohistoquímico para agrecán de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3:

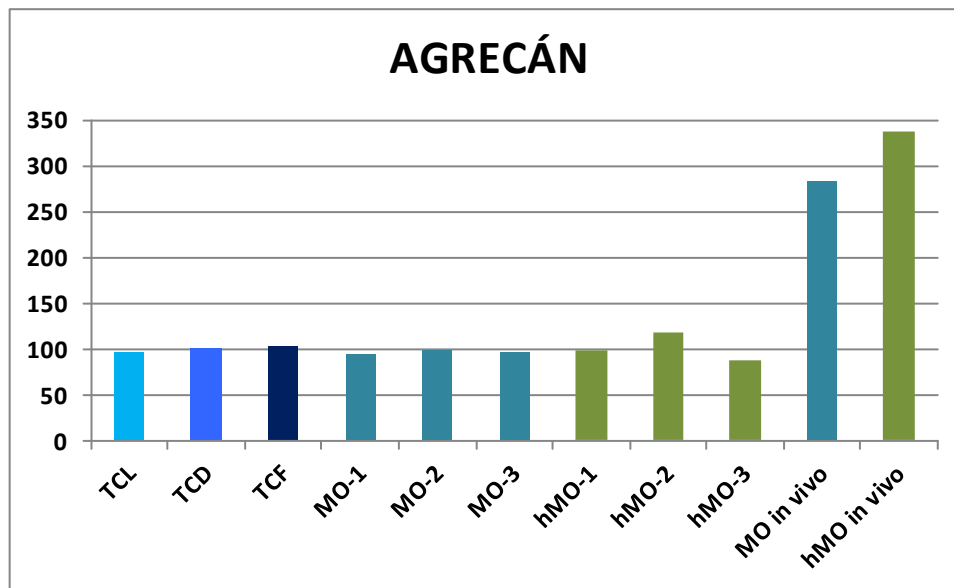
mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

El análisis cuantitativo de la presencia de agregán en los diferentes tejidos mostró niveles muy similares de este componente no fibrilar en la matriz extracelular de todos los tejidos artificiales mantenidos en cultivo, así como de los controles TCL, TCD y TCF, siendo estos niveles significativamente inferiores a los encontrados en los tejidos implantados en animales de laboratorio (Tablas 11 y 12 y Figura 21).

	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>
<b>TCL</b>	<b>96.9</b>	25.8
<b>TCD</b>	<b>100.0</b>	33.4
<b>TCF</b>	<b>103.2</b>	28.2
<b>MO-1</b>	<b>94.7</b>	13.7
<b>MO-2</b>	<b>99.2</b>	5.1
<b>MO-3</b>	<b>95.3</b>	36.7
<b>hMO-1</b>	<b>98.1</b>	21.0
<b>hMO-2</b>	<b>117.6</b>	22.2
<b>hMO-3</b>	<b>88.5</b>	15.5
<b>MO in vivo</b>	<b>283.3</b>	10.8
<b>hMO in vivo</b>	<b>337.4</b>	9.3

**Tabla 11. Cuantificación de la intensidad de señal inmunohistoquímica para agregán en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de señal para agregán en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1:

mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 21. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica para agrecán en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

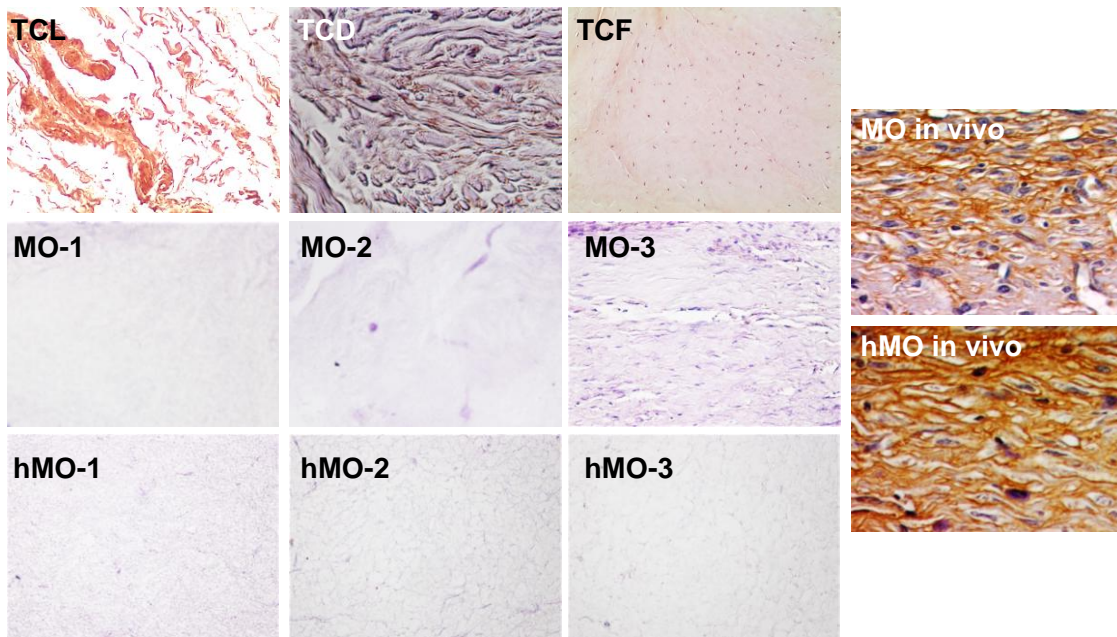
Los valores corresponden a la intensidad de señal inmunohistoquímica para agregán en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

AGRECÁN	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
TCF	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
TCL	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
MO-1	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
MO-2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
MO-3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
hMO-1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
hMO-2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	0.0000	0.0000
hMO-3	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	0.0000	0.0000
MO in vivo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	0.0000
hMO in vivo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-

**Tabla 12. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la señal inmunohistoquímica para agregán en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.5.4. Análisis Inmunohistoquímico del Contenido de Versicán en la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

Al igual que ocurría para el agregán, el análisis inmunohistoquímico cualitativo de las muestras de mucosa oral humana artificial mantenidas in vitro mostró muy escasos niveles de expresión de versicán en la matriz extracelular. Sin embargo, esta expresión fue muy positiva en las muestras implantadas in vivo en animales de laboratorio. Asimismo, las muestras control TCL mostraron niveles apreciables de agregán, seguidos de las muestras TCD, con muy escasa expresión en TCF (Figura 22).



**Figura 22. Análisis inmunohistoquímico para versicán de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo:

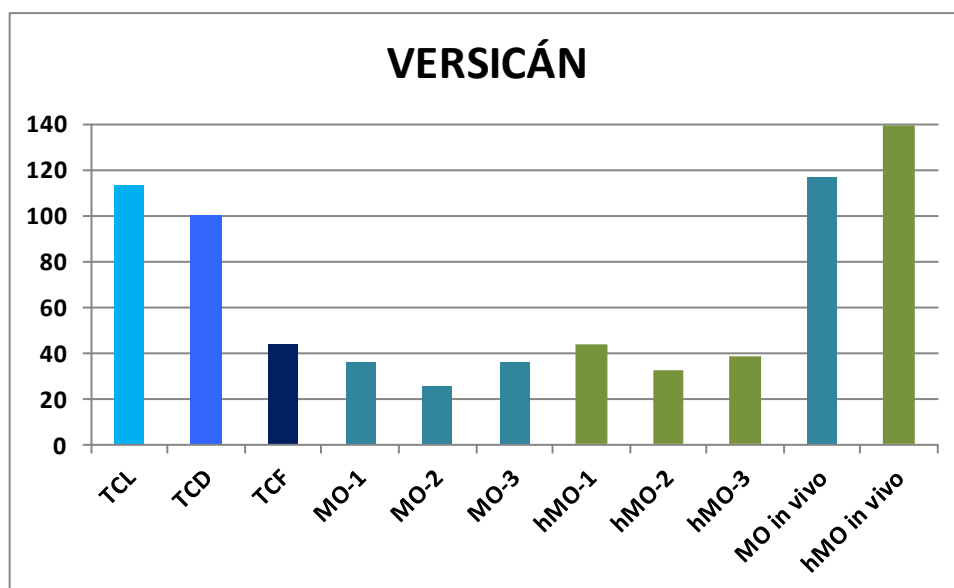
mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

Por otro lado, los análisis cuantitativos de expresión de versicán confirmaron la mayor expresión de este componente en las muestras sometidas a condiciones fisiológicas in vivo, las cuales presentaron niveles significativamente superiores a las muestras mantenidas in vitro y a las muestras TCF, aunque no a las TCL ni a las TCD. A su vez, los controles TCD de estroma de mucosa oral humana nativa fueron similares a los controles TCL y a las muestras in vivo, pero significativamente superiores a todas las demás muestras (Tablas 13 y 14 y Figura 23).

	MEDIA	DE
TCL	113.4	2.6
TCD	100.0	2.6
TCF	44.1	2.4
MO-1	36.2	40.3
MO-2	25.7	39.9
MO-3	35.5	47.7
hMO-1	44.1	50.5
hMO-2	32.4	48.1
hMO-3	38.5	49.9
MO in vivo	116.4	44.5
hMO in vivo	139.0	41.2

**Tabla 13. Cuantificación de la intensidad de señal inmunohistoquímica para versicán en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de señal para versicán en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in

vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 23. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica para versicán en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana



ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores corresponden a la intensidad de señal inmunohistoquímica para versicán en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

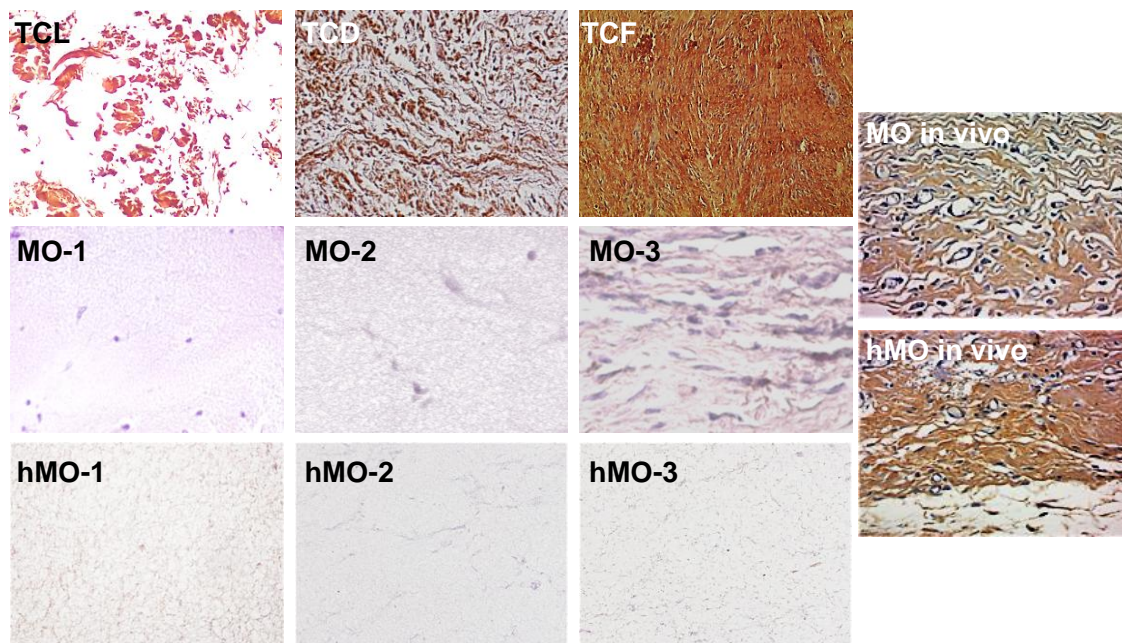
VERSICÁN	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	0.0085	N.S.	0.0040	0.0016	0.0037	0.0095	0.0028	0.0049	N.S.	N.S.
TCF	0.0085	-	0.0002	0.0187	0.0000	N.S.	N.S.	0.0096	N.S.	0.0005	0.0000
TCL	N.S.	0.0002	-	0.0001	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.
MO-1	0.0040	0.0187	0.0001	-	0.0064	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.0002	0.0000
MO-2	0.0016	0.0000	0.0000	0.0064	-	N.S.	0.0385	N.S.	0.0233	0.0001	0.0000
MO-3	0.0037	N.S.	0.0000	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	0.0002	0.0000
hMO-1	0.0095	N.S.	0.0001	N.S.	0.0385	N.S.	-	N.S.	N.S.	0.0004	0.0000
hMO-2	0.0028	0.0096	0.0000	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	0.0001	0.0000
hMO-3	0.0049	N.S.	0.0000	N.S.	0.0233	N.S.	N.S.	N.S.	-	0.0002	0.0000
MO in vivo	N.S.	0.0005	N.S.	0.0002	0.0001	0.0002	0.0004	0.0001	0.0002	-	N.S.
hMO in vivo	N.S.	0.0000	N.S.	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	-

**Tabla 14. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la señal inmunohistoquímica para versicán en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana

ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

#### 4.5.5. Análisis Inmunohistoquímico del Contenido de Decorín en la Matriz Extracelular del Estroma de la Mucosa Oral Artificial Ortotípica y Heterotípica

El análisis inmunohistoquímico cualitativo de decorín mostró la presencia de este proteoglicano en la matriz extracelular de los tejidos control TCF y TCD, especialmente en el primero, así como en las muestras de mucosa oral artificial humana implantadas in vivo en animales de laboratorio, siendo indetectable su presencia en las muestras mantenidas in vitro (Figura 24).



**Figura 24. Análisis inmunohistoquímico para decorín de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3:

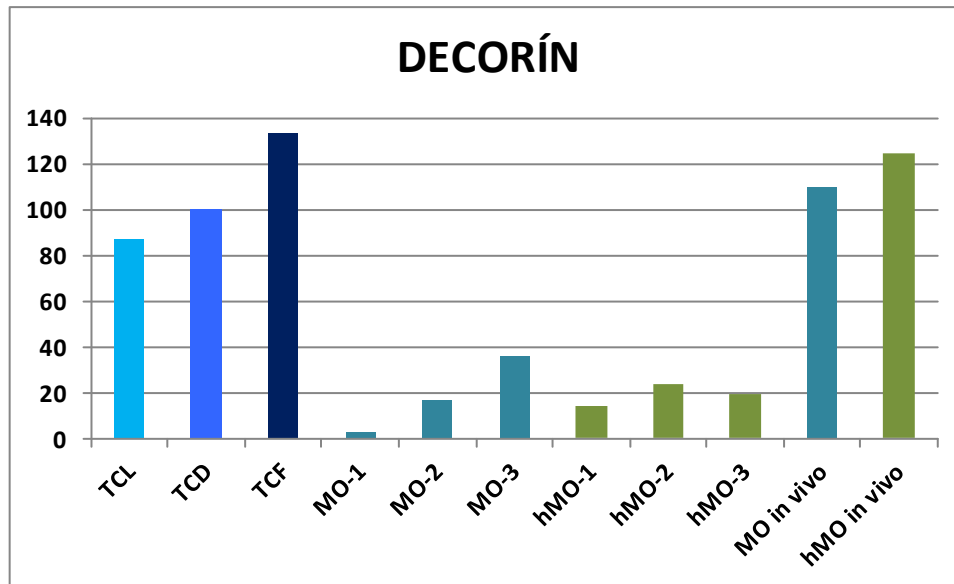
mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

Cuando se analizó cuantitativamente la expresión inmunohistoquímica de decorín, encontramos muy escasos niveles de este proteoglicano en la matriz extracelular de los tejidos mantenidos in vitro, siendo significativamente superiores los niveles de expresión inmunohistoquímica encontrados en las muestras in vivo y en los controles TCL, TCD y TCF. Además, el análisis estadístico también demostró que la expresión de decorín fue significativamente mayor en TCF que en TCL, y que las muestras implantadas in vivo presentaron mayor expresión de decorín que las muestras in vitro (Tablas 15 y 16 y Figura 25).

	MEDIA	DE
TCL	86.7	29.8
TCD	100.0	28.1
TCF	133.1	29.4
MO-1	2.6	32.5
MO-2	16.5	42.9
MO-3	36.2	50.1
hMO-1	13.8	51.0
hMO-2	23.3	48.7
hMO-3	19.5	48.8
MO in vivo	109.6	35.6
hMO in vivo	124.6	22.6

**Tabla 15. Cuantificación de la intensidad de señal inmunohistoquímica para decorín en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En cada caso, se muestra la intensidad de señal para decorín en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%), presentándose la media y la desviación estándar (DE). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2:

mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.



**Figura 25. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica para decorín en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana

ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. Los valores corresponden a la intensidad de señal inmunohistoquímica para decorín en cada muestra, normalizada respecto a las muestras control TCD (tomadas como 100%).

DECORÍN	TCD	TCF	TCL	MO-1	MO-2	MO-3	hMO-1	hMO-2	hMO-3	MO in vivo	hMO in vivo
TCD	-	N.S.	N.S.	0.0005	0.0014	0.0075	0.0012	0.0026	0.0019	N.S.	N.S.
TCF	N.S.	-	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	N.S.
TCL	N.S.	0.0003	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	0.0039
MO-1	0.0005	0.0000	0.0000	-	0.0048	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
MO-2	0.0014	0.0000	0.0000	0.0048	-	0.0006	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000
MO-3	0.0075	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	-	0.0000	0.0007	0.0001	0.0000	0.0000
hMO-1	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	0.0000	-	0.0001	0.0212	0.0000	0.0000
hMO-2	0.0026	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	0.0007	0.0001	-	N.S.	0.0000	0.0000
hMO-3	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	0.0001	0.0212	N.S.	-	0.0000	0.0000
MO in vivo	N.S.	N.S.	N.S.	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	N.S.
hMO in vivo	N.S.	N.S.	0.0039	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.S.	-

**Tabla 16. Análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante cuantificación de la señal inmunohistoquímica para decorín en el estroma de las diferentes muestras analizadas en esta Tesis Doctoral.** En todos los casos, se muestra el valor estadístico de significación p para la comparación bilateral de dos muestras entre sí utilizando la prueba t de Student. N.S.: valor p no significativo ( $p > 0.05$ ). TCL: muestras control de tejido conectivo laxo. TCD: muestras control de tejido conectivo denso. TCF: muestras control de tejido conectivo fibroso. MO-1: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 1 semana. MO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. MO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. hMO-1: mucosa oral artificial humana heterotípica mantenida in vitro durante 1 semana. hMO-2: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 2 semanas. hMO-3: mucosa oral artificial humana ortotípica mantenida in vitro durante 3 semanas. MO in vivo: mucosa oral artificial humana

ortotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días. hMO in vivo: mucosa oral artificial humana heterotípica implantada en animales de laboratorio durante 30 días.

## **5. DISCUSIÓN**

La generación de sustitutos artificiales de mucosa oral construidos mediante Ingeniería Tisular representa un importante progreso en el campo de la biomedicina. En la presente Tesis Doctoral, se han generado mediante Ingeniería Tisular sustitutos de mucosa oral utilizando biomateriales de origen natural. Además, se ha utilizado una fuente de células mesenquimales de la gelatina de Wharton extraídas del cordón umbilical como fuente alternativa de células epiteliales para inducir las hacia epitelio.

Los biomateriales son uno de los tres componentes fundamentales para la generación de tejidos artificiales, como hemos descrito en el capítulo introductorio de esta Tesis Doctoral. En este sentido, el biomaterial natural de fibrina-agarosa que se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral ha sido previamente empleado para la generación de diferentes tejidos artificiales en combinación con distintos tipos de células madre, incluyendo la mucosa oral humana (Cardona Jde *et al.*, 2011; Carriel *et al.*, 2014; Carriel *et al.*, 2012; Garzon *et al.*, 2009; Garzon *et al.*, 2009; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007). Este biomaterial de fibrina-agarosa cumple con los requisitos fundamentales para poder desarrollar un sustituto artificial de buena calidad como, por ejemplo, buena biocompatibilidad, adecuadas propiedades ópticas (transparencia, absorción, dispersión, etc.) (Cardona Jde *et al.*, 2011; Ionescu *et al.*, 2010) y, principalmente, adecuadas propiedades biomecánicas (elasticidad, resistencia, etc.) fácil manipulación y suturabilidad (Ionescu *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2013; Scionti *et al.*, 2014).

Uno de los objetivos de la Ingeniería Tisular de la mucosa oral es la búsqueda de fuentes alternativas de células que permitan la utilización diferida de la mucosa artificial generada en distintos procesos patológicos. En tal sentido, se han utilizado células mesenquimales, especialmente las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (Garzon *et al.*, 2013). Como sabemos, la matriz extracelular posee funciones fisiológicas celulares de vital importancia, entre las que destacan el control de la fisiología celular, la modulación de la supervivencia celular, la regulación de la migración de las células, el control de la actividad mitótica y la comunicación intercelular. Estas razones justifican la necesidad de investigar la naturaleza y el patrón arquitectural del estroma de los tejidos



artificiales, especialmente, de las superficies de recubrimiento como la piel y la mucosa oral. Demostrada la eficacia de la diferenciación epitelial de las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton y su estratificación en los modelos de mucosa oral artificial, es necesario indagar los patrones arquitecturales de los biomateriales utilizados en los tejidos artificiales con el objeto de garantizar el carácter biomimético de los constructos y una correcta transición epitelio-mesénquima (Moustakas and Heldin, 2014).

En la presente Tesis Doctoral, se ha generado mucosa oral ortotípica y heterotípica con células de la mucosa oral y células madre de la gelatina de Wharton con el objeto de identificar y cuantificar los patrones histológicos e histoquímicos de la matriz extracelular de dichos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para establecer la idoneidad de la mucosa artificial heterotípica. A este respecto, la aplicación de los métodos y técnicas optimizados en esta investigación han permitido generar eficientemente modelos ortotípicos y heterotípicos de la mucosa oral humana mediante Ingeniería Tisular, con propiedades macroscópicas y biomecánicas (manipulabilidad, suturabilidad, etc.) satisfactorias. Estos resultados permiten confirmar que, a este nivel, los tejidos generados son susceptibles de transferirse para su estudio a salas GMP.

Aunque la mucosa oral generada por Ingeniería Tisular a partir de biomateriales de fibrina y agarosa ha sido objeto de estudio en trabajos previos que demostraron la idoneidad del epitelio oral (Alaminos *et al.*, 2007; Garzon *et al.*, 2013; Garzon *et al.*, 2009; Garzon *et al.*, 2009; Maranes Galvez *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2013; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007), hasta el momento no existe ningún trabajo relacionado con la caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica de la matriz extracelular de los modelos ortotípicos y heterotípicos de la mucosa oral artificial humana de fibrina-agarosa, y sólo existe un trabajo que evaluó algunos componentes de esta matriz extracelular en sustitutos estromales carentes de epitelio (San Martin *et al.*, 2013). Por ese motivo, y puesto que los controles de calidad a realizar sobre los tejidos artificiales han de incluir una adecuada caracterización no sólo del epitelio, sino del tejido en su conjunto, en la presente Tesis Doctoral planteamos la necesidad de evaluar y caracterizar el

estroma de los modelos de mucosa oral artificial generados mediante Ingeniería Tisular para garantizar la idoneidad de estos modelos para posible utilización clínica.

En este contexto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que los modelos ortotípico y heterotípico de mucosa oral artificial eran altamente biomiméticos, especialmente en las muestras implantadas in vivo y, por tanto, podrían ser útiles para la reparación de lesiones de la mucosa oral. En concreto, el análisis histológico realizado a los tejidos artificiales mantenidos in vitro mediante tinción de hematoxilina-eosina reveló la existencia de un sustituto estromal formado por una malla fibrilar de tipo laxo en la que las células se disponían tridimensionalmente siguiendo una distribución al azar. La regularidad de la matriz extracelular artificial y la estructura y ultraestructura de las células dispersas por la misma sugieren que los biomateriales de fibrina-agarosa son altamente biocompatibles y funcionales in vitro, como ya se demostró en trabajos previos (Carriel *et al.*, 2013; Carriel *et al.*, 2014; Carriel *et al.*, 2012; Garzon *et al.*, 2014; Garzon *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2013; San Martin *et al.*, 2013). Además, el hecho de que el epitelio generado sobre la superficie estromal tendió a diferenciarse, madurar y estratificarse de forma adecuada en dependencia del tiempo de evolución en cultivo, confirman la idoneidad de estos biomateriales para la generación in vitro de sustitutos del corion de la mucosa oral humana. Sin embargo, nuestros resultados confirman hallazgos previos en los que se sugiere que los niveles de diferenciación y maduración de estos sustitutos del corion de la mucosa oral son escasos en los tejidos mantenidos en cultivo, no alcanzando los niveles correspondientes a las muestras de tejido conectivo control (Garzon *et al.*, 2009; Garzon *et al.*, 2009).

Cuando estos tejidos artificiales, tanto los ortotípicos como los heterotípicos, se implantaron en modelos animales, se observó un gran desarrollo y diferenciación de ambos tipos de tejidos, alcanzándose niveles adecuados de diferenciación, con la formación de estratos epiteliales y la remodelación del componente extracelular del sustituto estromal. Estos resultados confirman la idea previamente aceptada de que los tejidos artificiales requieren un medio ambiente adecuado como es la

situación *in vivo* para terminar de madurar y diferenciarse histológicamente, llegando a asemejarse a los tejidos control a nivel estructural y ultraestructural (Carriel *et al.*, 2012; Garzon *et al.*, 2013).

Como se indicó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el componente fibrilar de la matriz extracelular es uno de los constituyentes fundamentales de esta estructura, siendo el responsable fundamental de sus propiedades biomecánicas. A este respecto, el análisis de fibras de colágeno de la matriz extracelular llevado a cabo en esta Tesis Doctoral demostró grandes diferencias entre los diferentes tejidos analizados. En primer lugar, las muestras de mucosa oral artificial mantenidas *in vitro* presentaron escasa cantidad de fibras de colágeno en su estructura, siendo comparables al tejido conectivo laxo TCL utilizado como control. Aunque no se encontraron grandes diferencias entre los tejidos orto y heterotípicos, existió una tendencia a encontrar mayor cantidad de colágeno en los tejidos mantenidos *in vitro* durante mayores tiempos de cultivo, lo cual revela la función activa de los fibroblastos en el estroma artificial. Estos resultados coinciden con hallazgos previos en los que se demostró que el biomaterial de fibrina-agarosa es capaz de estimular la actividad biosintética de los fibroblastos inmersos en estas matrices, siendo mayor la fibrilogénesis en los tejidos mantenidos en cultivo durante mayores periodos de tiempo (San Martin *et al.*, 2013). Finalmente, el implante *in vivo* de estos tejidos artificiales se asoció a un incremento significativo en la síntesis de colágeno, alcanzándose niveles muy similares a los encontrados en el estroma de la mucosa oral humana nativa TCD utilizada como control, pero sin llegar a los niveles del tejido patológicamente fibroso correspondiente al TCF (Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2014; Michou *et al.*, 2012). Junto a ello, se apreció una distribución ordenada y orientada de las fibras de colágeno una vez implantado el tejido *in vivo*. Estos resultados confirman la idea de que el medio ambiente *in vivo* es fundamental para la correcta diferenciación y fisiología del estroma artificial y descartan la idea de que estos tejidos pudiesen generar niveles patológicos de fibrosis una vez implantados *in vivo*. Además, confirman la idea de que los tejidos heterotípicos generados a partir de células madre mesenquimales fueron análogos a los tejidos ortotípicos

generados a partir de queratinocitos de la mucosa oral en lo que se refiere a la síntesis de fibras de colágeno de la matriz extracelular. Trabajos previos demostraron la necesidad de una adecuada red tridimensional de fibras de colágeno bien organizadas en el estroma para la diferenciación y migración celular, no sólo de las células estromales, sino también, de las células epiteliales (Halper and Kjaer, 2014).

Por otro lado, el análisis de fibras reticulares y de fibras elásticas, dos componentes básicos de la matriz extracelular de algunos tipos de tejido conectivo, mostró muy escasa presencia de ambos tipos de fibras en los tejidos artificiales generados en laboratorio. El hecho de que los controles utilizados también mostraron muy escasa cantidad de estas fibras, como demostraron algunos trabajos previos (Carriel *et al.*, 2012), confirma la similitud estructural y funcional de los tejidos artificiales respecto a la mucosa oral nativa utilizada como control y la analogía de los modelos heterotípicos con los modelos ortotípicos de mucosa oral, y la ausencia de alteraciones asociadas al uso de fuentes alternativas de células.

Una vez evaluado el componente fibrilar, procedimos al análisis y cuantificación de la presencia de componentes no fibrilares de la matriz extracelular del estroma de los tejidos artificiales generados en esta Tesis Doctoral. En general, los componentes no fibrilares juegan un importante papel en el mantenimiento de la estructura espacial y los niveles de hidratación de los tejidos, siendo los responsables de gran parte de las funciones fisiológicas de la matriz extracelular (Glim *et al.*, 2014; Halper and Kjaer, 2014).

El primer componente no fibrilar analizado fueron las glicoproteínas identificadas mediante la técnica del PAS. En general, se observó que la matriz extracelular presenta cantidades bajas de estos componentes tanto en los controles como en los tejidos cultivados *in vitro*, aunque se apreciaron diferencias entre las distintas muestras. En concreto, el hecho de que los modelos de mucosa oral ortotípicos presentaran mayores cantidades de glicoproteínas que los modelos heterotípicos en las semanas 2 y 3 de desarrollo *in vitro* sugiere que la inducción de los

fibroblastos por parte de las células epiteliales cultivadas sobre la superficie estromal podría ser más eficiente en este momento en el caso de los sustitutos ortotípicos, al menos para la síntesis de glicoproteínas. Al igual que se observó para el colágeno, la exposición de la mucosa oral artificial a las condiciones in vivo fue capaz de inducir un aumento significativo en la síntesis de glicoproteínas de la matriz extracelular, sin que las diferencias entre el modelo ortotípico y heterotípico fuesen estadísticamente significativas. Estos resultados confirman de nuevo la importancia del ambiente biológico in vivo, el cual sería capaz de activar la señalización paracrina responsable de la interacción epitelio-mesénquima para, finalmente, inducir la síntesis de componentes de la matriz extracelular por parte de las células del estroma artificial generado en laboratorio (Garzon *et al.*, 2013). Junto a ello, el hecho de que los niveles alcanzados por estos componentes en las muestras implantadas en animales de laboratorio fuesen más similares al control de tejido conectivo denso de la mucosa oral humana que a los tejidos fibrosos correspondientes a tejido patológico reflejan de nuevo la utilidad potencial del modelo generado.

El segundo componente no fibrilar analizado fueron los proteoglicanos identificados por la tinción de azul alción. Los proteoglicanos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y las funciones fisiológicas de la matriz extracelular, siendo capaces de regular la actividad de proteasas y la respuesta celular a los factores de crecimiento, participando en la interacción célula-célula y célula matriz y en la maduración de fibras de colágeno (Aviezer *et al.*, 1994). Asimismo, la técnica de azul alción utilizada en esta Tesis Doctoral es capaz de identificar proteoglicanos ácidos sulfatados, los cuales juegan un papel vital en todo tipo de tejido conectivo. A este respecto, es importante señalar la gran correlación existente entre los patrones obtenidos para las fibras de colágeno y los patrones de proteoglicanos identificados mediante azul alción. Esta correlación indicaría que la síntesis progresiva de fibras de colágeno se acompaña de una síntesis concomitante de proteoglicanos, los cuales se asociarían tridimensionalmente al colágeno para inducir la maduración y organización espacial de estas fibras en la matriz extracelular (Iozzo, 1998). De este modo, al

igual que ocurría con las fibras de colágeno, y con algunas similitudes con lo encontrado para las glicoproteínas, nuestros resultados revelan la tendencia progresiva a encontrar mayores niveles de proteoglicanos en las muestras mantenidas durante tiempos crecientes en cultivo, siendo muy superior la concentración alcanzada una vez implantadas in vivo. Curiosamente, los niveles de proteoglicanos ácidos sulfatados fueron superiores en las muestras implantadas en animales de experimentación que en las muestras de mucosa oral control, llegando a ser similares a las de los tejidos conectivos fibrosos. Estos resultados sugerirían que, en lo que se refiere a este tipo de proteoglicanos, los tejidos artificiales implantados in vivo podrían ser similares al tejido conectivo fibroso, a pesar de que los niveles de colágeno encontrados en estos tejidos son similares a los tejidos conectivos densos de la mucosa oral nativa.

Tras determinar histoquímicamente la presencia de componentes fibrilares y de los componentes no fibrilares glicoproteínas y proteoglicanos ácidos sulfatados, se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos específicos para tres componentes específicos de la matriz extracelular: agregán, versicán y decorín. En este punto, pudimos demostrar que agregán, una macromolécula implicada en remodelación de la matriz extracelular, presentó escasos niveles tanto en los tejidos conectivos control como en las muestras de mucosa oral artificial mantenidas in vitro. Sin embargo, su presencia aumentó significativamente una vez los tejidos fueron implantados in vivo, alcanzando niveles muy superiores a los de los controles. Trabajos previos demuestran que agregán es un compuesto altamente hidrofílico presente en tejidos muy ricos en agua como puede ser el cartílago (Bernhard and Panitch, 2012), y su presencia en los tejidos injertados in vivo es difícil de explicar. Una posibilidad es que el hecho de que la mucosa oral artificial (tejido normalmente rico en agua) fue injertada en la zona dorsal de los animales de experimentación, por lo que es posible que las células del estroma de la mucosa oral artificial sintetizara este componente como respuesta compensatoria a la falta de humedad existente en esta zona en comparación con la situación fisiológica de la mucosa oral humana. Junto a ello, es interesante notar cómo los tejidos orales heterotípicos implantados in vivo presentaron mayores niveles de agregán que los

tejidos ortotípicos in vivo. Este hallazgo podría estar relacionado con la naturaleza mucosa y rica en agua de la gelatina de Wharton, tejido de origen de las células madre mesenquimales utilizadas para generar el epitelio de la mucosa oral heterotípica.

Por otro lado, versicán es un componente no fibrilar de la matriz extracelular directamente implicado en el control de la proliferación celular, remodelación de la matriz extracelular, adhesión y migración celular (Yang and Yee, 2014). El patrón de expresión de versicán fue muy similar al encontrado para el agregán, excepto para las muestras de tejido conectivo control que tendieron a mostrar mayor cantidad de versicán cuanto más laxo era el tejido. En nuestro caso, se volvió a observar la tendencia a encontrar mayor cantidad de versicán en las muestras implantadas in vivo que en las muestras mantenidas en cultivo in vitro. Sin embargo, nuestros resultados revelan niveles finales de versicán en las muestras ortotípicas y heterotípicas injertadas in vivo similares a los de la mucosa oral control, confirmando la idoneidad de ambos modelos como sustitutos de la mucosa oral en lo que se refiere al estroma, una vez sometidos al medio ambiente in vivo. Por el contrario, tejidos patológicos como el tejido conectivo fibroso utilizado en este estudio presentaron muy bajos niveles de agregán en su matriz extracelular.

Finalmente, en esta Tesis Doctoral quisimos evaluar la presencia de decorín en la matriz extracelular de los tejidos control y tejidos artificiales generados mediante Ingeniería Tisular. Decorín es un proteoglicano de pequeño tamaño que tiene gran afinidad por unirse a las fibrillas de colágeno y contribuye de forma decisiva al empaquetamiento, la maduración y la diferenciación de las fibras de colágeno en la matriz extracelular del tejido conectivo (Islam *et al.*, 2013). La gran correlación entre los niveles de decorín y la presencia de fibras de colágeno en la matriz extracelular de todos los tejidos analizados revela la presencia de fibras maduras en los tejidos analizados. De este modo, la mayor presencia de decorín, junto con colágeno, en los controles de tejido conectivo fibroso estarían en consonancia con la fibrosis existente en estos tejidos y las propiedades biomecánicas incrementadas en los mismos. Además, la tendencia a encontrar mayores

cantidades de decorín en las muestras mantenidas en cultivo durante mayores tiempos de evolución indicaría que la interacción epitelio-mesénquima que en estos tejidos se establece, sería capaz de inducir la síntesis no sólo del componente fibrilar de la matriz extracelular, sino, además, de decorín, como elemento clave en la maduración de éste, y esta inducción se incrementaría con el tiempo de desarrollo de las muestras artificiales. Por otro lado, el medio ambiente in vivo incrementaría la maduración y funcionalidad de esta interacción epitelio-mesénquima, induciéndose la síntesis de todos estos componentes hasta alcanzar niveles fisiológicos, tanto en el modelo ortotípico como en el heterotípico.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos sido capaces de elaborar modelos de mucosa oral humana artificial basados en biomateriales de fibrina-agarosa utilizando una fuente alternativa de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. El análisis de estos modelos tanto in vitro como in vivo demuestra la idoneidad de estos modelos y su analogía con los modelos establecidos a partir de queratinocitos aislados a partir del epitelio de la mucosa oral humana nativa y sugiere que el medio ambiente in vivo es fundamental para el adecuado desarrollo de la matriz extracelular de ambos tipos de modelos.



## **6. CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se infieren las siguientes **conclusiones**:

1- La metodología desarrollada y optimizada en la presente Tesis Doctoral permite elaborar modelos ortotípicos y heterotípicos de mucosa oral artificial utilizando células madre queratinocíticas, células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, fibroblastos y biomateriales de fibrina-agarosa sin que se generen artefactos significativos in vitro e in vivo.

2- El estudio histológico e histoquímico del componente fibrilar de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial pone de relieve que, cualitativa y cuantitativamente, existe un patrón similar en la presencia de fibras de colágeno tanto en el modelo ortotípico como en el heterotípico, in vitro e in vivo, con mayor presencia de colágeno en las muestras implantadas in vivo. El patrón fibrilar de colágeno en las muestras evaluadas in vivo resulta similar al patrón fibrilar de colágeno de la mucosa oral nativa. El estudio no reveló presencia significativa de fibras reticulares y elásticas en ninguno de los modelos de mucosa oral artificial generados.

3- El estudio histológico e histoquímico de las glicoproteínas y los proteoglicanos de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial pone de relieve que, cualitativa y cuantitativamente, existe mayor presencia de ambos componentes en las muestras ortotípicas que en las heterotípicas mantenidas in vitro tras la primera semana de desarrollo. Asimismo, nuestros resultados revelan mayor presencia de glicoproteínas y proteoglicanos en las muestras implantadas in vivo. Mientras la presencia de glicoproteínas de ambos modelos es similar a la existente en el tejido conectivo denso del estroma de la mucosa oral nativa, la presencia de proteoglicanos es superior a la de la mucosa oral nativa y se corresponde con el existente en el tejido conectivo fibroso.

4- El estudio inmunohistoquímico de los componentes no fibrilares agregan y versican de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial pone de relieve que,

cualitativa y cuantitativamente, existe un patrón similar en la presencia de ambos componentes tanto en el modelo ortotípico como en el heterotípico en muestras mantenidas in vitro. Asimismo, nuestros resultados revelan mayor presencia de agregán y versicán en las muestras implantadas in vivo. Mientras la presencia de versicán es similar en ambos modelos cuando se implantan in vivo, la de agregán es mayor en el modelo heterotípico. La presencia de versicán en las muestras in vivo es similar a la existente en el estroma de la mucosa oral nativa, mientras que la de agregán fue muy superior a la existente en dicha mucosa.

5- El estudio inmunohistoquímico del componente no fibrilar decorín de la matriz extracelular de la mucosa oral artificial pone de relieve que, cualitativa y cuantitativamente, existe mayor presencia de dicho componente en el modelo ortotípico que en el heterotípico mantenidos in vitro durante 3 semanas. Asimismo, nuestros resultados revelan mayor presencia de decorín en las muestras implantadas in vivo, siendo esta presencia similar a la existente en el estroma de la mucosa oral nativa.

6- El estudio comparado de los resultados obtenidos pone de relieve que la mucosa oral heterotípica generada con células madre de la gelatina de Wharton presenta, tras su implantación in vivo, un patrón similar a la mucosa nativa en la presencia de fibras de colágeno, glicoproteínas, versicán y decorín, que constituyen elementos básicos del patrón arquitectural del estroma de la mucosa oral humana. Todo ello confirma la idoneidad de la mucosa oral heterotípica para su posible utilización en protocolos de Ingeniería Tisular.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Alaminos M, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, Gonzalez-Andrades M, Fernandez-Montoya A, et al. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Sep-Oct;1(5):350-9.

Alcaraz LB, Exposito JY, Chuvin N, Pommier RM, Cluzel C, Martel S, et al. Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF-beta. *J Cell Biol*. 2014 May 12;205(3):409-28.

Alfonso-Rodriguez CA, Garzon I, Garrido-Gomez J, Oliveira AC, Martin-Piedra MA, Scionti G, et al. Identification of Histological Patterns in Clinically Affected and Unaffected Palm Regions in Dupuytren's Disease. *PLoS One*. 2014;9(11):e112457.

Atala A. Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol*. 2000 Feb;14(1):49-57.

Aviezer D, Levy E, Safran M, Svahn C, Buddecke E, Schmidt A, et al. Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor. *J Biol Chem*. 1994 Jan 7;269(1):114-21.

Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC. *Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management*: Elsevier Science; 2002.

Bernhard JC, Panitch A. Synthesis and characterization of an aggrecan mimic. *Acta Biomater*. 2012 Apr;8(4):1543-50.

Bhardwaj N, Sow WT, Devi D, Ng KW, Mandal BB, Cho NJ. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering. *Integr Biol (Camb)*. 2014 Nov 5.

Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK. *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*: Springer; 2005.

Bronner F, Farach-Carson MC. *Bone Formation*: Springer London; 2004.

Cardona Jde L, Ionescu AM, Gomez-Sotomayor R, Gonzalez-Andrades M, Campos A, Alaminos M, et al. Transparency in a fibrin and fibrin-agarose corneal stroma substitute generated by tissue engineering. *Cornea*. 2011 Dec;30(12):1428-35.

Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes P, Garzon I, Garcia-Garcia S, Saez-Moreno JA, et al. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng*. 2013 Apr;10(2):026022.

Carriel V, Garzon I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Jul 31.

Carriel V, Garzon I, Jimenez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, et al. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(1):1-12.

Carriel VS, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago S, Garzon IJ, Alaminos M, Campos A. A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *J Histochem Cytochem*. 2011 Mar;59(3):270-7.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995 Apr 14;268(5208):233-9.

de Ferraris MEG, Campos A. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental / Histology, embryology and oral tissue engineering*: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2009.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2012-8.

Falke G, Caffaratti J, Atala A. Tissue engineering of the bladder. *World J Urol.* 2000 Feb;18(1):36-43.

Fernandez Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing NA. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? *Differentiation.* 2013 Jan;85(1-2):1-10.

Fukada S, Ma Y, Uezumi A. Adult stem cell and mesenchymal progenitor theories of aging. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:10.

Gartner LP. *Texto atlas de histología: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.*; 2008.

Garzon I, Martin-Piedra MA, Alfonso-Rodriguez C, Gonzalez-Andrades M, Carriel V, Martinez-Gomez C, et al. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jul;55(7):4073-83.

Garzon I, Miyake J, Gonzalez-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sanchez-Quevedo Mdel C, et al. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Aug;2(8):625-32.

Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, Gonzalez-Jaranay M, Gonzalez-Andrades M, Montalvo A, et al. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res.* 2009 Oct;44(5):588-97.

Garzon I, Serrato D, Roda O, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Gonzales-Jaranay M, Moreu G, et al. In vitro cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *Int J Artif Organs.* 2009 Oct;32(10):711-9.

Glim JE, Everts V, Niessen FB, Ulrich MM, Beelen RH. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin. *Arch Oral Biol.* 2014 Oct;59(10):1048-55.

Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul.* 1991 Nov;2(11):951-64.

Gudmann NS, Wang J, Hoielt S, Chen P, Siebuhr AS, He Y, et al. Cartilage Turnover Reflected by Metabolic Processing of Type II Collagen: A Novel Marker of Anabolic Function in Chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):18789-803.

Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:31-47.

Ho PJ, Yen ML, Yet SF, Yen BL. Current applications of human pluripotent stem cells: possibilities and challenges. *Cell Transplant.* 2012;21(5):801-14.

Hoch E, Tovar GE, Borchers K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Nov;46(5):767-78.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992 Apr 3;69(1):11-25.

Ionescu AM, Alaminos M, Cardona JD, Duran JDGL, Gonzalez-Andrades M, Ghinea R, et al. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *J Mech Behav Biomed.* 2011 Nov;4(8):1963-73.

Ionescu AM, de la Cruz Cardona J, Gonzalez-Andrades M, Alaminos M, Campos A, Hita E, et al. UV absorbance of a bioengineered corneal stroma substitute in the 240-400 nm range. *Cornea.* 2010 Aug;29(8):895-8.



Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-52.

Islam M, Gor J, Perkins SJ, Ishikawa Y, Bachinger HP, Hohenester E. The concave face of decorin mediates reversible dimerization and collagen binding. *J Biol Chem.* 2013 Dec 6;288(49):35526-33.

Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1993 Feb;120(3):577-85.

Kinikoglu B, Auxenfans C, Pierrillas P, Justin V, Breton P, Burillon C, et al. Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent. *Biomaterials.* 2009 Nov;30(32):6418-25.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.

Kreis T, Vale R. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*: Oxford University Press; 1999.

Larjava H, Koivisto L, Hakkinen L, Heino J. Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *J Dent Res.* 2011 Dec;90(12):1367-76.

Lehninger AL, Cox MM. *Principios de bioquímica*: Omega; 2006.

Li JH, Liu DY, Zhang FM, Wang F, Zhang WK, Zhang ZT. Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl).* 2011 Dec;124(23):4022-8.

Maranes Galvez C, Liceras Liceras E, Alaminos M, Fernandez Valades R, Ruiz Montes AM, Garzon I, et al. [Generation of a substitute for human oral mucosa and verification of its viability by tissue-engineering]. *Cir Pediatr.* 2011 Jan;24(1):13-8.

Maynes R. *Structure and function of Collagen types*: Elsevier Science; 2012.

Michou L, Lermusiaux JL, Teyssedou JP, Bardin T, Beaudreuil J, Petit-Teixeira E. Genetics of Dupuytren's disease. *Joint Bone Spine*. 2012 Jan;79(1):7-12.

Moharamzadeh K, Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. *J Dent*. 2008 May;36(5):331-6.

Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Smith KG, Thornhill MH. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Apr;19(4):1793-801.

Mosher DF, Fogerty FJ, Chernousov MA, Barry EL. Assembly of fibronectin into extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;614:167-80.

Moustakas A, Heldin P. TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1840(8):2621-34.

Nastro Siniscalchi E, Cutroneo G, Catalfamo L, Santoro G, Allegra A, Oteri G, et al. Immunohistochemical evaluation of sarcoglycans and integrins in gingival epithelium of multiple myeloma patients with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Oncol Rep*. 2010 Jul;24(1):129-34.

Nielsen MJ, Veidal SS, Karsdal MA, Orsnes-Leeming DJ, Vainer B, Gardner SD, et al. Plasma Pro-C3 (N-terminal type III collagen propeptide) predicts fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2014 Oct 11.

Nunez MA, de Matos FR, Freitas Rde A, Galvao HC. Immunohistochemical study of integrin alpha(5)beta(1), fibronectin, and Bcl-2 in normal oral mucosa, inflammatory fibroepithelial hyperplasia, oral epithelial dysplasia, and oral squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013 Jul;21(4):354-61.

Oliveira AC, Garzon I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One*. 2013;8(6):e66538.

Quan H, Kim SK, Heo SJ, Koak JY, Lee JH. Optimization of growth inducing factors for colony forming and attachment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells regarding bioengineering application. *J Adv Prosthodont*. 2014 Oct;6(5):379-86.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):550-1.

Richardson CC. *Annual Review of Biochemistry: Annual Reviews*; 1995.

Rodriguez MA, Lopez-Lopez MT, Duran JD, Alaminos M, Campos A, Rodriguez IA. Cryopreservation of an artificial human oral mucosa stroma. A viability and rheological study. *Cryobiology*. 2013 Dec;67(3):355-62.

Ross MH, Pawlina W. *Histología: Médica Panamericana*; 2007.

Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31;28(3):585-96.

San Martin S, Alaminos M, Zorn TM, Sanchez-Quevedo MC, Garzon I, Rodriguez IA, et al. The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Jan;7(1):10-9.

Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol*. 2007 Jun;22(6):631-40.

Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Duran JD, Alaminos M, et al. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Aug;102(8):2573-82.

Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Duran JDG, Alaminos M, et al. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014 Aug;102(8):2573-82.

Stein GS, Pardee AB. *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer*: Wiley; 2004.

Stevens A, Lowe JS. *Histología Humana*. Student Consult: Elsevier; 2006.

Tang C, Xu Y, Jin C, Min BH, Li Z, Pei X, et al. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffold for cartilage tissue engineering. *Artif Organs*. 2013 Dec;37(12):E179-90.

Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006 Jul-Sep;10(3):569-76.

Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng*. 2006 May;12(5):1137-42.

Vojnits K, Yang L, Zhan M, Cox C, Li Y. Very small embryonic-like cells in the mirror of regenerative medicine. *J Stem Cells*. 2014;9(1):1-16.

Whelan D, Caplice NM, Clover AJ. Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. *J Control Release*. 2014 Oct 2;196C:1-8.

Yadev NP, Murdoch C, Saville SP, Thornhill MH. Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis. *Microb Pathog*. 2011 Jun;50(6):278-85.

Yang W, Yee AJ. Versican 3'-untranslated region (3'UTR) promotes dermal wound repair and fibroblast migration by regulating miRNA activity. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jul;1843(7):1373-85.

