



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL Y
DEL SISTEMA NERVIOSO:
EVALUACIÓN DE NUEVOS SOPORTES
Y FUENTES DE CÉLULAS**

TESIS DOCTORAL
Anahí Sanluis Verdes

2018

Ingeniería Tisular de la piel y del sistema nervioso: evaluación de nuevos soportes y fuentes de células

Autor/a: Anahí Sanluis Verdes

Tesis doctoral UDC / Año 2018

Director/a: Nieves Doménech García y M^a Esther Rendal Vázquez

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Xerencia de Xestión Integrada
de A Coruña

Dña. **Nieves Doménech García**, Investigadora i3 y Coordinadora del Biobanco de A Coruña y Dña. **M^a Esther Rendal Vázquez**, Responsable Técnico de la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos, del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña-Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña.

CERTIFICAN:

Que Dña. **Anahí Sanluis Verdes**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“Ingeniería tisular de la piel y del sistema nervioso: evaluación de nuevos soportes y fuentes de células”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor.

Dña. Nieves Doménech García

Dña. M^a Esther Rendal Vázquez

En A Coruña, 10 de Enero de 2018

A MIS PADRES Y HERMANOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a las personas que científica y/o personalmente han participado en esta tesis doctoral:

A mis directoras de tesis, la Dra. M^ª Esther Rendal Vázquez y la Dra. Nieves Doménech García, por la confianza que habéis depositado en mí y haber aceptado dirigir mi tesis doctoral. Sobre todo a ti Esther por haber compartido conmigo el laboratorio, dejarme un huequito en tu despacho y darme soluciones y consejos.

Al Dr. Andión, posteriormente al Dr. Jacinto Sánchez y al Dr. Paco Blanco por dejarme usar las instalaciones y equipos técnicos de la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos y del INIBIC respectivamente.

A Marga por todos los conocimientos de cultivos celulares que me has enseñado en mis inicios en el laboratorio.

A Marta por toda la ayuda que me has prestado, por transmitirme tu pasión a la hora de enseñarme todas las técnicas histológicas y sobre todo por haberte convertido en mi mejor amiga. Fuiste mi gran apoyo dentro y fuera del laboratorio. Siempre me acordaré de como las piernas amputadas y Nión nos unieron.

A las técnicas Mariajo y María. Mariajo, siempre me sacaste una sonrisa y me diste un abrazo en el momento adecuado cuando la desesperación me podía. Eres una gran persona y con el corazón más grande que he conocido. Gracias por creer en mi cuando yo no lo hacía y por hacer que Marta y yo nos conociésemos aunque después el destino hizo que estuviésemos en el mismo grupo de investigación y nos uniese aún más. María, otro gran apoyo, por atender mis llamadas a las ocho de la mañana cuando no trabajabas para explicarme cómo funcionaba el microscopio, por ofrecerte a trabajar en tus horas libres para ayudarme a sacar el trabajo y sobre todo por las tardes de los viernes llenas risas cuando sólo quedábamos tú, yo, Dolo y José Antonio. Que haría sin ti!!!

A Natalia del Biobanco, me quedo con tu temple y por reñirme por andar por ahí con los guantes porque como me decías aunque estuviesen limpios eso la gente no lo sabía.

A mis compañeras del café, Marta, Natalia, Lucía, Antía e Isa por los buenos momentos compartidos. Natalia siempre sonriendo y con tu aire juvenil trayéndonos galletas y clips de los congresos; Lucía eres como una hermana mayor, tus consejos valen mucho, por tu gran inteligencia, aplomo y sobre todo bondad; Antía que decir de ti, siempre pensando bien de los demás a pesar de todo, ojalá que este mundo nunca te cambie e Isa gracias por hacernos esas tartas que tanto nos gustaban, las echo de menos.

También quería expresar mi agradecimiento:

A todos los donantes de piel, sangre, placentas y cordones umbilicales que voluntariamente y de forma desinteresada aceptaron participar en este estudio.

Al Dr. Barreiro del Servicio de la Unidad de Quemados por su paciencia, colaboración y comprensión en la a veces difícil labor de recogida y obtención de biopsias de piel.

A la Dra. Yebra y al Dr. Pombo del Servicio de Anatomía Patológica, por su ayuda en la interpretación de los resultados de los estudios histológicos.

Al Centro Oncológico de Galicia sin cuya colaboración no habría sido posible irradiar las células 3T3.

A la Unidad de Cirugía Experimental por el trabajo realizado en el modelo animal.

A los profesores Manuel Castro y María Jesús Manso por vuestro apoyo y siempre estar ahí por si necesitaba algo. Os debo media tesis.

Y por último, lo más importante, a mi familia. Me quedo sin palabras cuando se trata de vosotros, sois lo mejor que tengo. Sobre todo a mis hermanitos pequeños, Namibia y Braix por querer siempre lo mejor para mí. Gracias.

| | |
|---|-------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | I |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | VII |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... | XI |
| RESUMEN..... | XVII |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| A. LA PIEL HUMANA..... | 3 |
| 1. Generalidades..... | 3 |
| 2. Estructura de la piel..... | 3 |
| 2.1. Epidermis..... | 4 |
| 2.1.1. Tipos de células de la epidermis..... | 5 |
| 2.1.2. Organización de la epidermis..... | 8 |
| 2.2. Dermis..... | 10 |
| 2.2.1. Tipos de células de la dermis..... | 11 |
| 2.2.2. Organización de la dermis..... | 12 |
| 2.3. Unión dermo-epidérmica..... | 13 |
| 2.4. Matriz extracelular..... | 14 |
| 2.5. Anejos de la piel..... | 15 |
| 2.6. Inervación de la piel..... | 15 |
| 3. Funciones de la piel..... | 16 |
| 4. Fases del proceso de curación de las heridas..... | 18 |
| 5. Clasificación y tratamientos de los diferentes tipos de heridas..... | 21 |
| B. LA MEMBRANA AMNIÓTICA..... | 23 |
| 1. Generalidades..... | 23 |
| 2. Estructura de la Membrana Amniótica..... | 23 |
| 3. Propiedades de la Membrana Amniótica..... | 25 |
| 4. La Membrana Amniótica como soporte..... | 28 |
| 4.1. Métodos de descelularización de la Membrana Amniótica..... | 28 |
| 5. La Membrana Amniótica como fuente de células para Ingeniería Tisular..... | 30 |
| 5.1. Caracterización inmunofenotípica de las células aisladas de la Membrana Amniótica..... | 31 |
| 5.2. Potencial de diferenciación de las células aisladas de la Membrana Amniótica..... | 31 |
| 6. La Membrana Amniótica como fuente de factores..... | 33 |
| C. EL CORDÓN UMBILICAL..... | 34 |
| 1. Generalidades..... | 34 |
| 2. Estructura del Cordón Umbilical..... | 34 |
| 3. El Cordón Umbilical como fuente de células para Ingeniería Tisular..... | 35 |
| 3.1. Caracterización inmunofenotípica de las células aisladas del Cordón Umbilical..... | 36 |
| 3.2. Potencial de diferenciación de las células aisladas del Cordón Umbilical..... | 36 |
| D. INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL..... | 37 |
| 1. Cultivo de láminas de epitelio..... | 38 |
| 2. Soporte dérmico..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Equivalente de piel basado en fibrina..... | 42 |
| 3.1. Activación de la fibrina..... | 43 |
| 3.2. Fuentes de fibrina..... | 44 |
| 4. Equivalente de piel basado en la Membrana Amniótica..... | 47 |
| | |
| E. INGENIERÍA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO DE LA PIEL..... | 48 |
| 1. Generalidades..... | 48 |
| 2. Uso de la Membrana Amniótica como soporte..... | 49 |
| 3. Fuentes de células usadas..... | 50 |
| | |
| II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS..... | 53 |
| | |
| III. OBJETIVOS..... | 57 |
| | |
| IV. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 61 |
| A. OBTENCIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS..... | 63 |
| 1. Obtención y procesamiento de las biopsias de piel..... | 63 |
| 1.1. Obtención de las biopsias de piel..... | 63 |
| 1.2. Aislamiento y cultivo primario de los fibroblastos..... | 63 |
| 1.3. Aislamiento y cultivo primario de los queratinocitos..... | 64 |
| 1.3.1. Cultivo de fibroblastos murinos 3T3..... | 64 |
| 1.3.2. Aislamiento y cultivo de queratinocitos..... | 65 |
| 2. Obtención y procesamiento de las Membranas Amnióticas..... | 66 |
| 2.1. Obtención de las Membranas Amnióticas..... | 66 |
| 2.2. Aislamiento y cultivo de células derivadas de la Membrana Amniótica..... | 66 |
| 3. Obtención y procesamiento de los Cordones Umbilicales..... | 67 |
| 3.1. Obtención de Cordones Umbilicales..... | 67 |
| 3.2. Aislamiento y cultivo de las CMMGW..... | 68 |
| 4. Congelación y descongelación de las células..... | 69 |
| B. CARACTERIZACION DE LAS CÉLULAS Y DE LOS EQUIVALENTES DE INGENIERIA TISULAR..... | 69 |
| 1. Citospines de células..... | 69 |
| 2. Formación de los bloques y cortes de tejidos..... | 69 |
| 3. Técnicas de caracterización de tejidos y células..... | 70 |
| 3.1. Tinciones histoquímicas..... | 70 |
| 3.1.1. Tinciones de cortes de tejidos o equivalentes tisulares..... | 70 |
| 3.1.2. Tinciones de células en cultivo..... | 72 |
| 3.2. Técnicas inmunológicas..... | 73 |
| 3.2.1. Técnicas de inmunohistoquímica en células..... | 73 |
| 3.2.2. Técnicas de inmunohistoquímica en tejidos..... | 73 |
| 3.2.3. Técnicas de inmunofluorescencia en células..... | 74 |
| 3.2.4. Técnicas de inmunofluorescencia simple en tejidos..... | 75 |
| 3.2.5. Técnicas de inmunofluorescencia doble en tejidos..... | 75 |

| | |
|---|----|
| 3.3. Estudio de microscopía electrónica de barrido..... | 77 |
| 4. Multipotencialidad de las CMEA, CEA y CMMGW..... | 77 |
| C. PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA SU UTILIZACIÓN COMO SOPORTE..... | 78 |
| 1. Criopreservación de la Membrana Amniótica..... | 78 |
| 2. Descongelación de la Membrana Amniótica..... | 79 |
| 3. Descelularización de la Membrana Amniótica..... | 80 |
| 3.1. Elección del tratamiento..... | 80 |
| 3.2. Análisis del ADN residual en las Membranas Amnióticas descelularizadas..... | 81 |
| D. INGENIERIA TISULAR DE LA PIEL..... | 81 |
| 1. Desarrollo del equivalente de piel basado en la utilización de plasma humano como soporte..... | 81 |
| 1.1. Construcción de un equivalente de piel sobre soporte de fibrina (modelo <i>in vitro</i>)..... | 81 |
| 1.1.1. Obtención de plasma..... | 81 |
| 1.1.2. Preparación de la dermis..... | 82 |
| 1.1.3. Cultivo secundario de queratinocitos sobre la dermis..... | 82 |
| 1.2. Trasplante experimental del equivalente de piel utilizando plasma como soporte (modelo <i>in vivo</i>)..... | 83 |
| 1.2.1. Diseño experimental..... | 83 |
| 1.2.2. Preparación del equivalente de piel para su trasplante..... | 83 |
| 1.2.3. Trasplante del equivalente de piel..... | 84 |
| 1.2.4. Seguimiento macroscópico de los injertos..... | 85 |
| 1.2.5. Caracterización microscópica de los injertos..... | 86 |
| 2. Desarrollo del equivalente de piel basado en la utilización de la Membrana Amniótica como soporte..... | 86 |
| 2.1. Selección del lado de la Membrana Amniótica sobre el que cultivar los fibroblastos y los queratinocitos..... | 86 |
| 2.2. Construcción de un equivalente de piel utilizando la MA como soporte (modelo <i>in vitro</i>)..... | 87 |
| E. INGENIERÍA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO..... | 88 |
| 1. Inducción de la diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW a células con características de células nerviosas..... | 88 |
| 2. Estudio de la proliferación de los diferentes tipos celulares en presencia de medio condicionado por la Membrana Amniótica..... | 88 |
| 2.1. Obtención del medio condicionado por la Membrana Amniótica..... | 88 |
| 2.2. Estudio proliferación celular..... | 89 |
| 3. Desarrollo del equivalente de tejido nervioso <i>in vitro</i> basado en la utilización de la Membrana Amniótica como soporte (modelo <i>in vitro</i>)..... | 89 |
| F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 90 |
| G. CONSIDERACIONES ÉTICAS..... | 90 |

| | |
|--|------------|
| V. RESULTADOS..... | 91 |
| A. INGENIERIA TISULAR DE LA PIEL..... | 93 |
| 1. Obtención y cultivo de fibroblastos y queratinocitos..... | 93 |
| 1.1. Determinación del mejor medio de cultivo para el cultivo de los queratinocitos..... | 93 |
| 1.2. Cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos..... | 94 |
| 2. Construcción de un equivalente de piel usando fibrina obtenida a partir de plasma humano como soporte (modelo <i>in vitro</i>)..... | 95 |
| 2.1. Análisis histológico del equivalente de piel <i>in vitro</i> | 97 |
| 2.2. Trasplante experimental del equivalente de piel (modelo <i>in vivo</i>)..... | 99 |
| 2.2.1. Análisis macroscópico del trasplante experimental..... | 99 |
| 2.2.2. Análisis histológico de los injertos trasplantados..... | 101 |
| 2.2.2.1. Piel control..... | 101 |
| 2.2.2.2. Injertos de los equivalentes de piel humana en los dos experimentos de ratones..... | 106 |
| 2.2.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido..... | 115 |
| 3. Construcción de un equivalente de piel <i>in vitro</i> usando la Membrana Amniótica como soporte (modelo <i>in vitro</i>)..... | 117 |
| 3.1. Obtención y preparación del soporte de Membrana Amniótica..... | 117 |
| 3.1.1. Obtención y criopreservación de las Membranas Amnióticas..... | 117 |
| 3.1.2. Caracterización histológica de las Membranas Amnióticas antes de su criopreservación..... | 117 |
| 3.1.3. Caracterización histológica y cuantificación del ADN de la Membrana Amniótica después de su descelularización mediante diferentes tratamientos..... | 118 |
| 3.1.3.1. Análisis histomorfológico de los componentes de la matriz extracelular..... | 121 |
| 3.1.3.2. Análisis inmunohistoquímico de los componentes de la membrana basal..... | 122 |
| 3.2. Preparación del equivalente de piel <i>in vitro</i> y caracterización Histológica..... | 124 |
| 3.2.1. Selección del lado de la Membrana Amniótica sobre el que cultivar los fibroblastos y los queratinocitos..... | 124 |
| 3.2.2. Desarrollo de un equivalente de piel <i>in vitro</i> con la Membrana Amniótica como soporte..... | 127 |
| B. INGENIERÍA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO..... | 130 |
| 1. Obtención y caracterización de gelatina de Wharton de los Cordones Umbilicales..... | 130 |
| 2. Localización, aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW..... | 132 |
| 2.1. Localización de las células en sus correspondientes tejidos..... | 132 |
| 2.1.1. Localización de las CMEA y las CEA en la Membrana Amniótica..... | 132 |
| 2.1.2. Localización de las CMMGW en la gelatina de Wharton..... | 132 |
| 2.2. Aislamiento y caracterización morfológica..... | 133 |
| 2.2.1. CMEA y CEA..... | 133 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.2.CMMGW..... | 133 |
| 2.3. Caracterización inmunocitoquímica, pureza y rendimiento tras la obtención de las CMEA, CEA y CMMGW..... | 134 |
| 2.4. Potencial de diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW al linaje mesodérmico..... | 136 |
| 3. Diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW hacia células similares a células nerviosas..... | 139 |
| 4. Proliferación de las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas..... | 145 |
| 5. Desarrollo de un equivalente de tejido nervioso <i>in vitro</i> con la Membrana Amniótica como soporte (modelo <i>in vitro</i>)..... | 145 |
| 6. Análisis histológico del equivalente de tejido nervioso <i>in vitro</i> | 145 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 147 |
| A. INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL..... | 149 |
| 1. Obtención del medio de cultivo adecuado para la expansión de los cultivos primarios de las células y de los equivalentes de piel..... | 150 |
| 2. Soporte para la proliferación de las células en los equivalentes de piel..... | 152 |
| 2.1. Equivalente de piel basado en la utilización de plasma humano como soporte..... | 153 |
| 2.2. Equivalente de piel basado en la utilización de la Membrana Amniótica como soporte..... | 162 |
| B. INGENIERIA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO..... | 168 |
| 1. Características y capacidad de diferenciación de los cultivos de las CMEA, de las CEA y de las CMMGW..... | 169 |
| 2. La Membrana Amniótica como soporte para el cultivo de las células similares a células nerviosas..... | 173 |
| 3. Medio condicionado por la MA..... | 175 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 179 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 183 |

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura I1 | Estructura de la piel y sus apéndices | 4 |
| Figura I2 | Estratos y componentes celulares que conforman la epidermis | 8 |
| Figura I3 | Morfología de los queratinocitos que forman los estratos de la epidermis | 10 |
| Figura I4 | Capas que forman la dermis | 13 |
| Figura I5 | Receptores sensoriales de la piel | 16 |
| Figura I6 | Funciones de la piel: protección, termorregulación, sensación y metabólica | 18 |
| Figura I7 | Fases del proceso de curación de las heridas | 21 |
| Figura I8 | Tipos de heridas según el nivel de las capas de la piel que afectan | 23 |
| Figura I9 | Estructura de las dos membranas fetales | 25 |
| Figura I10 | Estructura del CU y las células que se obtienen de él | 35 |
| Figura I11 | Formación del coágulo de fibrina | 44 |

MATERIAL Y MÉTODOS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura M1 | Proceso de aislamiento de los fibroblastos y queratinocitos a partir de las biopsias de piel | 65 |
| Figura M2 | Proceso de aislamiento de las CMEA y CEA a partir de las MA obtenidas de placentas | 67 |
| Figura M3 | Proceso de aislamiento y cultivo de las CMMGW mediante el método del explante a partir de los CU | 68 |
| Figura M4 | Proceso de criopreservación de la MA | 79 |
| Figura M5 | Esquema de la realización del equivalente de piel <i>in vitro</i> | 82 |
| Figura M6 | Separación manual del equivalente de piel del frasco de cultivo y preparación para su transporte | 84 |
| Figura M7 | Trasplante experimental del equivalente de piel en el modelo animal | 85 |
| Figura M8 | Preparación de la MA sobre los dispositivos <i>Cell Crown™</i> y cultivo de las células sobre ella | 87 |

RESULTADOS

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura R1 | Comparación de la proliferación con los distintos medios de cultivo para queratinocitos con respecto al MQ (n=5) | 94 |
| Figura R2 | Cultivo primario de fibroblastos y queratinocitos | 95 |
| Figura R3 | Equivalente de piel <i>in vitro</i> | 96 |
| Figura R4 | Caracterización histológica de una zona representativa del equivalente de piel <i>in vitro</i> | 98 |
| Figura R5 | Aspecto macroscópico del equivalente de piel tras 21 días del trasplante en un ratón representativo | 100 |
| Figura R6: | Aspecto macroscópico del equivalente de piel tras 4 meses del trasplante en un ratón representativo | 101 |
| Figura R7 | Análisis histológico de la piel humana control | 102 |
| Figura R8 | Análisis histológico de la piel del ratón control | 104 |
| Figura R9 | Análisis histológico de la piel control de ratón autoinjertado | 105 |
| Figura R10 | Región injerto (izquierda)-ratón (derecha) tras 21 días del trasplante en un ratón representativo | 107 |
| Figura R11 | Análisis histológico del injerto 21 días después del trasplante en un ratón representativo | 109 |
| Figura R12 | Región injerto (izquierda)-ratón (derecha) tras 4 meses del trasplante en un ratón representativo | 111 |
| Figura R13 | Análisis histológico del injerto 4 meses después del trasplante en un ratón representativo | 113 |
| Figura R14 | Grosor de la epidermis de las pieles control y de los equivalentes de piel <i>in vitro</i> y trasplantados en una zona representativa | 114 |
| Figura R15 | Análisis de MEB de la piel de ratón control, de la piel de ratón control autoinjertada y del injerto de equivalente de piel trasplantado a los 4 meses en un ratón representativo | 116 |
| Figura R16 | Parche de MA descongelado | 117 |
| Figura R17 | Caracterización histológica de la MA en fresco de la parte señalada en una zona representativa | 118 |
| Figura R18 | Caracterización histológica de las MA incubadas con los diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos con la tinción de H-E en una zona representativa (n= 5) | 119 |

Índice de figuras

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura R19 | Concentración de ADN obtenido después de incubar a las MA con los diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos (n=5) | 121 |
| Figura R20 | Comparación de la estructura de la MA no tratada con la MA tratada con 1 % de T/E a 37°C durante 30 min y con dispasa a 37°C durante 1 h en una zona representativa | 122 |
| Figura R21 | Comparación de la descellularización y de la lámina basal en las MA no tratadas con las MA tratadas con 1% de T/E a 37°C durante 30 min o con dispasa a 37°C durante 1 h en una zona representativa | 123 |
| Figura R22 | Cultivo de los fibroblastos sobre el lado estromal y sobre el lado epitelial descellularizado como el epitelial sin descellularizar de la MA después de una semana de cultivo en una zona representativa | 125 |
| Figura R23 | Cultivo de los queratinocitos sobre el lado estromal y sobre el lado epitelial descellularizado o el epitelial sin descellularizar de la MA después de una semana de cultivo en una zona representativa | 126 |
| Figura R24 | Morfología celular del equivalente de piel <i>in vitro</i> después de una semana de cultivo en una zona representativa | 127 |
| Figura R25 | Análisis histológico de un equivalente de piel <i>in vitro</i> representativo cultivado durante una semana | 129 |
| Figura R26 | CU | 130 |
| Figura R27 | Gelatina de Wharton de CU | 131 |
| Figura R28 | Immunolocalización de las CMEA y de las CEA en la MA en fresco | 132 |
| Figura R29 | Immunolocalización de las CMMGW en la gelatina de Wharton del CU | 132 |
| Figura R30 | Cultivos <i>in vitro</i> de las CMEA y CEA obtenidas a partir de MA y de las CMMGW obtenidas a partir del CU a los 10 días | 134 |
| Figura R31 | Caracterización inmunocitoquímica y pureza de las CMEA, CEA y CMMGW | 135 |
| Figura R32 | Diferenciación adipogénica de las CMEA, CEA y CMMGW después de 21 días en medio adipogénico | 136 |
| Figura R33 | Diferenciación osteogénica de las CMEA, CEA y CMMGW después de 21 días en medio osteogénico | 137 |

Índice de figuras

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura R34 | Morfología de una micromasa representativa formada a partir de cada tipo celular | 138 |
| Figura R35 | Diferenciación condrogénica de las CMEA, CEA y CMMGW después de 21 días en medio de inducción condrogénico en una micromasa representativa | 138 |
| Figura R36 | Diferenciación <i>in vitro</i> de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas | 139 |
| Figura R37 | Análisis de la diferenciación <i>in vitro</i> de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador NF en una zona representativa | 140 |
| Figura R38 | Análisis de la diferenciación <i>in vitro</i> de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador GFAP en una zona representativa | 141 |
| Figura R39 | Análisis de la diferenciación <i>in vitro</i> de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador NGFR en una zona representativa | 142 |
| Figura R40 | Análisis de la diferenciación <i>in vitro</i> de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador S100 en una zona representativa | 143 |
| Figura R41 | Análisis de la diferenciación <i>in vitro</i> de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador vimentina en una zona representativa | 144 |
| Figura R42 | Análisis de la proliferación celular con MTT (n= 5) | 145 |
| Figura R43 | Análisis histológico de las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas sobre la MA descelularizada en una zona representativa | 146 |

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIAL Y MÉTODOS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla M1 | Listado de Ac y condiciones utilizados en este estudio | 76 |
| Tabla M2 | Métodos de descelularización de la MA | 80 |
| Tabla M3 | Número de experimentos que se han realizado sembrando los fibroblastos o queratinocitos sobre el lado estromal, o sobre el lado epitelial sin descelularizar y descelularizado | 86 |

RESULTADOS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabla R1 | Condiciones de los experimentos A y B del modelo <i>in vivo</i> | 99 |
|-----------------|---|----|

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Indice de abreviaturas

| | |
|-------------------------|---|
| µg | Microgramo |
| µl | Microlitro |
| µm | Micrómetro |
| µM | Micromolar |
| °C | Grados centígrados |
| % | Tanto por ciento |
| 2D | 2 dimensiones |
| 3D | 3 dimensiones |
| 3T3 | Línea alimentadora. Células de ratón albino suizo, European Collection of Animal Cell Cultura 85022108 |
| Abs | Absorbancia |
| ABCG2/BCRP | <i>ATP-binding cassette superfamily G member 2/ Breast cancer resistance protein</i> . Miembro de la superfamilia de cassettes de unión al ATP/ proteína de resistencia al cáncer de mama |
| Ac | Anticuerpo |
| AcMo | Anticuerpo monoclonal |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADP | Adenosín difosfato |
| AMPc | Adenosín monosfato cíclico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BDNF | <i>Brain derived neurotrophic factor</i> . Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| bFGF | <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> . Factor de crecimiento fibroblástico básico |
| Ca⁺² | Calcio |
| CaCl₂ | Cloruro cálcico |
| CD | Células dendríticas |
| CEA | Células epiteliales amnióticas |
| CK | <i>Cytokeratine</i> . Citoqueratina |
| cm | Centímetro |
| cm² | Centímetro cuadrado |
| CME | Célula madre embrionaria |
| CMEA | Células mesenquimales estromales amnióticas |
| CMM | Células madre mesenquimales |
| CMMGW | Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton |
| CO² | Dióxido de carbono |
| CU | Cordón umbilical |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada |
| DAPI | <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> . 4', 6'-diamidino-2-fenilindol |
| Dif | Diferenciadas |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |

Índice de abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNAsa I | <i>Deoxyribonuclease I</i> . Desoxirribonucleasa I |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> . Ácido etilendiaminotetracético |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> . Factor de Crecimiento Epidérmico |
| FGF | <i>Fibroblastic Growth Factor</i> . Factor de crecimiento fibroblástico |
| FITC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> . Isotiocianato de fluoresceína |
| g | Gramo |
| GAG | Glicosaminoglicano |
| GFAP | <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> . Proteína ácida glial fibrilar. |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> . Factor estimulante de granulocitos y macrófagos. |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| h | Hora |
| H-E | Hematoxilina- Eosina |
| HGF | <i>Hepatic growth factor</i> . Factor de crecimiento hepático |
| HLA | <i>Human Leukocyte Antigen</i> . Antígeno leucocitario humano |
| HNF | <i>Hepatocyte Nuclear Factor</i> . Factor nuclear de hepatocitos |
| HUVEC | <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> . Células del endotelio de la vena umbilical |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IGF | <i>Insulin growth factor</i> . Factor de crecimiento insulínico |
| IL | Interleukin. Interleuquina |
| iPSC | <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> . Células madre pluripotentes inducidas |
| K | <i>Keratin</i> . Queratina |
| KGF | <i>Keratinocyte Growth Factor</i> . Factor de crecimiento de queratinocitos |
| M | Molar |
| MA | Membrana amniótica |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| MEC | Matriz extracelular |
| MF | Medio de fibroblastos |
| mg | Miligramo |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> . Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| MI | Medio de inactivación |
| MIF | <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> . Factor inhibidor de la migración de macrófagos |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |

Índice de abreviaturas

| | |
|-----------------------|---|
| MMP | <i>Matrix metalloprotease</i> . Metaloproteasa de matriz |
| MQ | Medio de queratinocitos |
| MTT | <i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> . Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| n | Tamaño muestral |
| nº | Número |
| NaCl | Cloruro sódico |
| NF | <i>Neurofilament</i> . Neurofilamento |
| ng | Nanogramo |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> . Factor de crecimiento nervioso |
| NGFR | <i>Nerve Growth Factor Receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento nervioso |
| N₂L | Nitrógeno líquido |
| nm | Nanómetros |
| NT-3 | <i>Neurotrophin-3</i> . Neurotrofina-3 |
| OCT | <i>Optimal Cutting Temperatura</i> |
| Oct4 | <i>Octamer binding transcription factor-4</i> . Factor de transcripción de unión a octámero |
| OD | <i>Optical density</i> . Densidad óptica |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> . Tampón fosfato salino |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDGF | <i>Platelet Derived Growth Factor</i> . Factor de crecimiento derivado de las plaquetas |
| P/E | Penicilina/Estreptomina |
| PE | <i>Phycoerythrin</i> . Ficoeritrina |
| PG | Proteoglicano |
| RNAasa | <i>Ribonuclease</i> . Ribonucleasa |
| SBF | Suero Bovino Fetal |
| SDS | <i>Sodium dodecyl-sulphate</i> . Dodecil sulfato sódico. |
| seg | Segundo |
| SKP | <i>Skin derived precursors</i> . Precursores derivados de la piel |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| SSEA | <i>Stage specific embryonic antigens</i> . Antígenos embrionarios específicos de estadio |
| SOX-2 | <i>SRY box 2. Sex determining region Y-box 2</i> |
| Tª | Temperatura |
| T/E | Tripsina/EDTA |

Indice de abreviaturas

| | |
|--------------------------------|--|
| TEM | <i>Transmission Electron Microscopy</i> . Microscopia electrónica de transmisión |
| TGF | <i>Transforming Growth Factor</i> . Factor de crecimiento transformante. |
| TIMP | <i>Tissue inhibitors of metalloproteases</i> . Inhibidores tisulares de metaloproteasas |
| TNF-α | <i>Tumor necrosis factor- α</i> . Factor de necrosis tumoral- α |
| TRA | <i>Tumor rejection antigen</i> . Antígeno de rechazo tumoral. |
| U | Unidades |
| UDE | Unión dermo-epidérmica |
| V | Volumen |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> . Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VIH | Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| xg | Fuerza centrífuga relativa |

RESUMEN

RESUMEN

El proceso de curación de las heridas en los humanos adultos conduce a la formación de una cicatriz, que no restituye totalmente la funcionalidad del tejido dañado y se caracteriza además por la pérdida de la sensibilidad y por un resultado estético deficiente. Es por ello que nos propusimos desarrollar dos equivalentes de piel mediante Ingeniería Tisular utilizando fibroblastos y queratinocitos que obtuvimos a partir de biopsias de piel y los hemos cultivado sobre diferentes soportes tales como la matriz de fibrina obtenida a partir de plasma o la Membrana Amniótica (MA) descelularizada obteniendo buenos resultados. Por otro lado estudiamos a la MA y al Cordón Umbilical (CU) como una fuente alternativa de células madre ya que pueden ser fácilmente aisladas y cultivadas *in vitro*, con gran capacidad de proliferación, de diferenciación a los tres linajes germinales y a células similares a células nerviosas siendo posible sintetizar un equivalente de tejido nervioso si se cultivan ésta últimas usando MA como soporte.

RESUMO

O proceso de cicatrización das feridas em humanos adultos, conduce á formación dunha cicatriz, que non restaura totalmente a funcionalidade do tecido danado e caracterízase ademáis pola perda da sensibilidade e por un resultado estético deficiente. É por iso que nos propuxemos desenvolver dous equivalentes de pel mediante Enxeñaría de tecidos utilizando fibroblastos e queratinocitos que obtivemos a partir de biopsias de pel e cultivámoslos en diferentes soportes, tales como a matriz de fibrina obtida a partir de plasma ou a Membrana Amniótica (AM) decelularizado obtendo bos resultados. Estudamos tamén á MA e o Cordón Umbilical (UC) como unha fonte alternativa de células nai, porque poden ser fácilmente illadas e cultivadas *in vitro*, con elevada capacidade de proliferación, diferenciación a todas as tres liñaxes embrionarias e a células semellantes a células nerviosas, sendo posible sintetizar un equivalente de tecido nervioso se éstas se cultivan usando MA como soporte.

ABSTRACT

The healing process of wounds in adult humans leads to the formation of a scar, which does not completely restore the functionality of the damaged tissue and is also characterized by the loss of sensitivity and a poor aesthetic result. That is why we set out to develop two skin equivalents by Tissue Engineering using fibroblasts and keratinocytes that we obtained from skin biopsies and we have grown them on different supports such as the fibrin matrix obtained from plasma or the Amniotic Membrane (AM) decellularized obtaining good results. On the other hand, we studied the MA and the Umbilical Cord (UC) as an alternative source of stem cells since they can be easily isolated and cultured in vitro, with great capacity for proliferation, differentiation to the three embryonic lineages and cell-like cells nervous, being possible to synthesize an equivalent of nervous tissue if the latter are grown using MA as support.

I. INTRODUCCIÓN

Introducción

La medicina regenerativa se puede dividir, de forma general, en dos grandes áreas: la Terapia Celular (solamente utiliza células sin necesidad de un soporte) y en la Ingeniería Tisular (células cultivadas sobre un soporte) (Ikada, 2006). El término de Ingeniería Tisular se introdujo en 1987 (Tenenhaus y Rennekampff, 2016) y se define como un campo multidisciplinario con el principal objetivo de mejorar la salud y calidad de vida desarrollando sustitutos biológicos con el fin de restaurar, o mejor regenerar, mantener y mejorar la función de los tejidos y órganos mediante la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida (Huang et al., 2012; Theoret, 2009).

A. LA PIEL HUMANA

1. Generalidades

La piel es el órgano esencial más extenso del cuerpo (Priya et al., 2008). Representa el 15% del peso corporal, con una extensión de aproximadamente 1,7-2,0 m² en el adulto (Summerfield et al., 2015; Peniche y Argüelles, 2009), un peso que puede alcanzar alrededor de 4-5 kg (Lee et al., 2013) y un grosor medio de 100 µm, que varía considerablemente dependiendo del área del cuerpo de que se trate (desde 1,5 mm en palmas de la mano y plantas de los pies hasta 50 µm en los párpados) (Kanitakis, 2002).

2. Estructura de la piel

La estructura de la piel se compone principalmente por dos capas, la epidermis y la dermis, separadas por la unión dermo-epidérmica (UDE) (Figura I1):

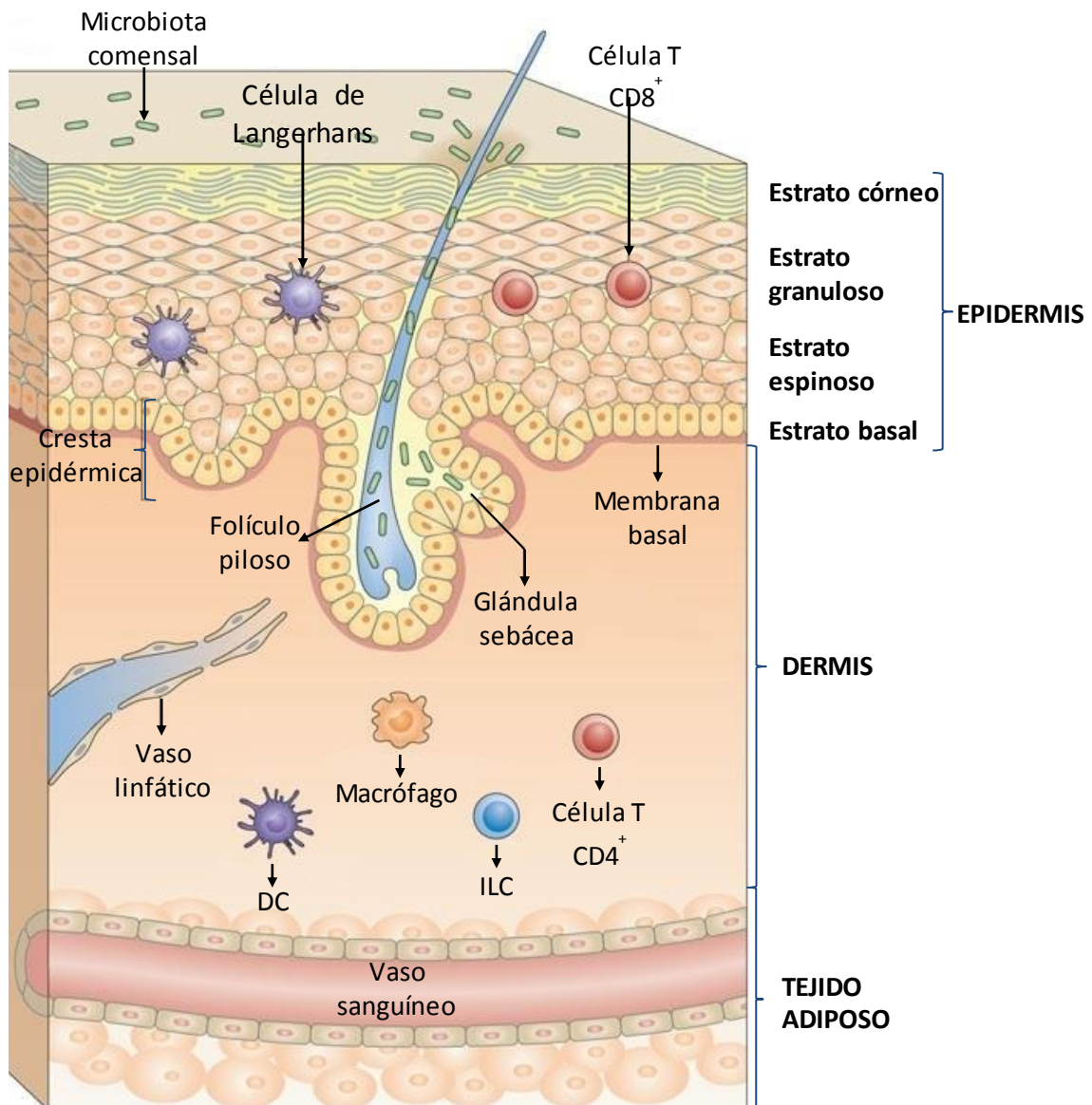


Figura 11: Estructura de la piel y sus apéndices. Se representa la epidermis con sus estratos (estratos basal; espinoso; granuloso y córneo) y la dermis, además de un folículo piloso y de una glándula sebácea. Modificado de Pasparakis et al., 2014.

2.1. Epidermis

Es la estructura más superficial con un grosor entre 60-100 μm (Summerfield et al., 2015). Embriológicamente, la epidermis y sus apéndices son de origen ectodérmico (Kanitakis, 2002). Se trata de un epitelio plano estratificado queratinizado que se caracteriza porque las células más superficiales, llenas de queratina (K), mueren continuamente y se descaman, al tiempo que, para mantener el equilibrio de la estructura, las células más profundas (células madre basales), proliferan y se diferencian continuamente (Velásquez et al., 2008). Debido a la ausencia de vasos sanguíneos en la epidermis, el tejido recibe nutrientes y oxígeno por difusión desde los vasos sanguíneos dérmicos (Summerfield et al., 2015) y factores de crecimiento desde las células estromales de la dermis (Papini et al., 2003).

2.1.1. Tipos de células de la epidermis

La epidermis contiene los siguientes tipos celulares (Figura I2):

- **Queratinocitos.** Son las células epidérmicas más abundantes (Boyce y Warden, 2002), constituyendo el 90-95% de todas las células (Summerfield et al., 2015) y juegan un papel esencial en la formación del pelo, uñas y sebo (Lee et al., 2013). Todos los queratinocitos contienen filamentos intermedios de K (proteína sulfatada marcador de los queratinocitos y células epiteliales) que le proporciona a las células cierta rigidez, dureza y semi-impermeabilidad y forman desmosomas entre células adyacentes. Como consecuencia de su función de defensa contra infecciones bacterianas pueden secretar un amplio rango de citoquinas pro-inflamatorias (Di Meglio et al., 2011), siendo de particular importancia los péptidos antimicrobianos catiónicos, tales como las catelicidinas (Summerfield et al., 2015).

La epidermis al estar en constante renovación presenta queratinocitos en diferentes grados de diferenciación. Se han identificado tres tipos en la epidermis humana y en el bulbo de los folículos pilosos en base a su crecimiento, comportamiento cinético y distribución local (Kim et al., 2004; Papini et al., 2003):

- **Células madre.** Son aproximadamente el 10% de las células del estrato basal y están firmemente adheridas a la membrana basal. Estas células se autorenewan manteniendo la epidermis y dando lugar a la progenie diferenciada, estando involucradas en la regeneración celular y curación de las heridas. Sus ciclos celulares son lentos y con un elevado potencial proliferativo, siendo P63 un marcador de estas células (Velásquez et al., 2008; Kim et al., 2004).
- **Células transitorias amplificadoras.** Son aproximadamente el 40% de las células del estrato basal. En cultivo, se replican con más frecuencia que las células madre pero dan lugar a menos pases. Estas células se despegan de la membrana basal y migran hacia la superficie de la epidermis en donde se diferencian.
- **Queratinocitos diferenciados terminalmente.** Mueren y forman las láminas externas de células cornificadas (Papini et al., 2003). Se renewan totalmente cada cuatro semanas es decir, la célula del estrato basal que inicia su proceso de diferenciación después de la mitosis que la originó, tarda aproximadamente 28-30 días en transformarse en célula cornificada totalmente queratinizada (Kanitakis, 2002). Su vida media disminuye con la edad del donante, existiendo diferencias intrínsecas en el potencial de crecimiento de las células madre y en la proporción de generación de diferenciación terminal entre recién nacidos y adultos (Papini et al., 2003).

- **Melanocitos.** Se originan a partir de células neuroectodérmicas que migran desde la cresta neural para situarse en la dermis diferenciándose en melanoblastos. A partir de la decimoprimer semana del desarrollo embriológico, los melanoblastos se transforman en melanocitos y se localizan en la epidermis en contacto con el estrato basal y en los folículos pilosos donde inician la producción de melanina (Lee et al., 2013; Hirobe, 2005). Aproximadamente en el quinto mes de la gestación, la población de melanocitos alcanza una cantidad estable por unidad de superficie, sobre unos 800/mm² de la superficie cutánea, con variaciones regionales (máxima densidad en la piel de los genitales y menor cantidad en las palmas de las manos y plantas de los pies) (Cichorek et al., 2014).

Una proporción de melanoblastos terminan como células madre de melanocitos que se encuentran en la región del bulbo del folículo piloso. Estas células madre pierden su capacidad de autorenovación con la edad, conduciendo a un encanecimiento (Kanitakis, 2002). Recientes resultados muestran que existen células madre de melanocitos en la dermis, multipotentes, similares a las células madre de la cresta neural y capaces de diferenciarse a melanocitos. Estas células madre dermales migran desde su reservorio en la dermis hacia la epidermis (Li et al., 2010). También pueden surgir desde células gliales inmaduras (precursores de células de Schwann) desde los nervios que inervan la piel (Ernfors, 2010).

Los melanocitos sintetizan, producen y transfieren gránulos de melanina (melanosomas) hacia los queratinocitos vecinos mediante secreción citocrina (Carlson, 2005), formándose una unidad epidérmica de melanina compuesta por un melanocito en contacto con aproximadamente 36 queratinocitos (Regnier et al., 1999) o un melanocito por 4-10 queratinocitos basales (Kanitakis, 2002). Las variaciones étnicas en la pigmentación se deben a diferencias en la actividad del melanocito (cantidad de melanina que sintetizan, liberan y transfieren) así como a la distribución de los melanosomas dentro de la epidermis, y no a un diferente número de melanocitos (Topol et al., 1986).

Para identificarlos, en las secciones de piel teñidas de forma rutinaria con hematoxilina-eosina (H-E), los melanocitos aparecen como células basales con un núcleo basófilo y un citoplasma claro. Ultraestructuralmente al observarlos por microscopía electrónica de transmisión (TEM), tienen un citoplasma electrón-lúcido con numerosos melanosomas en distintas etapas de maduración. También se pueden identificar con anticuerpos (Ac) que reconocen antígenos específicos de melanocitos tales como el antígeno Melan-A o la tirosinasa. Los melanocitos también expresan constitutivamente la proteína S100ab y vimentina (Cichorek et al., 2014).

La principal función de los melanocitos es protegernos del estrés genotóxico inducido por la radiación ultravioleta que daña al ADN (Lee et al., 2013). Esta protección es posible gracias a una mayor producción de melanina y a la transferencia de los melanosomas desde los melanocitos al núcleo de los queratinocitos adyacentes a través de sus dendritas (Goding, 2007). Además, la melanina dentro de los melanosomas

probablemente actúa como sumidero para las especies de oxígeno altamente reactivas que de otro modo llevaría al daño del ADN (Ernfors, 2010; Hirobe, 2005).

- **Células dendríticas de Langerhans.** Se originan desde precursores hematopoyéticos CD34+ de la médula ósea (Kanitakis, 2002) que migran y se sitúan entre las células de los estratos basal y espinoso representando un 3-6% de todas las células en la epidermis. Son células dendríticas, de forma poliédrica con varias prolongaciones citoplasmáticas que se ramifican profusamente y sus extremos se unen con las ramificaciones de los queratinocitos adyacentes (Summerfield et al., 2015).

Ultraestructuralmente presentan un núcleo lobulado o dentado y un citoplasma granuloso donde se observan unos corpúsculos membranosos denominados gránulos de Birbeck, que se originan por la invaginación de la membrana celular (Kanitakis, 2002).

Su función es la captación de antígenos depositados en las superficies epiteliales, procesarlos y volverlos a exteriorizar para presentarlos a los linfocitos T e iniciar así, una respuesta inmunológica.

- **Células (o discos) de Merkel.** Presentan características neuroendocrinas y epiteliales. Son células redondeadas y algo aplanadas. Inicialmente se pensó que derivaban del neuroectodermo de la cresta neural. Sin embargo, recientes estudios consideran que se originan a partir de células epiteliales ectodérmicas. Esta aseveración se sustenta en la presencia de desmosomas que permiten una unión más estrecha con los queratinocitos y en la existencia de filamentos de K. En etapas tempranas del desarrollo llegan a la epidermis y se localizan entre el estrato basal y espinoso y en la lámina epitelial del folículo piloso. Su densidad es baja mostrando variaciones regionales, siendo máxima en la piel de las palmas de las manos y plantas de los pies. Son mecanorreceptores que intervienen en la captación de estímulos mecánicos.

Las células de Merkel se reconocen fácilmente al microscopio electrónico gracias a la presencia de gránulos citoplasmáticos neurosecretorios, de 80-120 nm de diámetro con un núcleo central electrón-denso rodeado por un halo claro y una sola membrana. También se pueden identificar por inmunohistoquímica, gracias a la expresión de antígenos específicos como la enolasa, cromogranina, sinaptofisina y varios neuropéptidos (Kanitakis, 2002).

- **Linfocitos.** La epidermis también contiene un pequeño número de células T (<1.3%) (Summerfield et al., 2015). Estas células están presentes principalmente en el estrato basal e intervienen en las etapas iniciales de la respuesta inmunológica del organismo (Kanitakis, 2002).

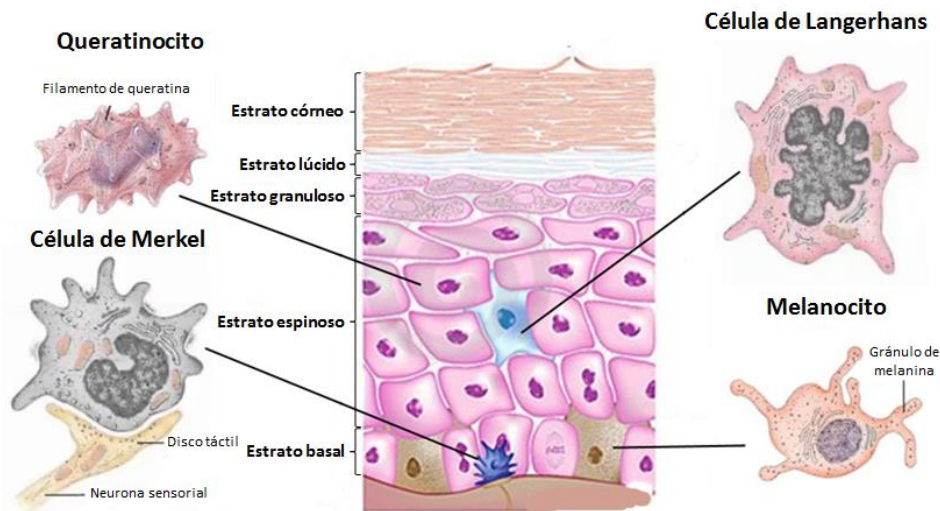


Figura I2: Estratos y componentes celulares que conforman la epidermis. Modificado de <http://b-log-ia20.blogspot.com.es/2015/12/el-sistema-tegmentario.html>.

2.1.2. Organización de la epidermis

La piel se puede clasificar en gruesa o fina según el espesor de la epidermis. La epidermis de la piel gruesa (palmas de las manos y plantas de los pies) está compuesta por cinco estratos (Gartner y Hiatt, 2003) a diferencia de la piel fina que presenta cuatro, careciendo de estrato lúcido, y con los estratos córneo, granuloso y espinoso de tamaño reducido (Figura I3).

- **Estrato basal o germinativo.** Es el estrato más profundo formado por una única capa de queratinocitos cúbicos o cilíndricos con capacidad proliferativa que se encuentran sobre la membrana basal y se unen a ella mediante hemidesmosomas (Ross et al., 2004). Las células de este estrato poseen un núcleo grande redondeado u ovalado, con heterocromatina marginal y nucléolos prominentes y un citoplasma ligeramente basófilo, constituido por polirribosomas y algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Además, existen vacuolas unidas a la membrana que contienen melanosomas pigmentados transferidos desde los melanocitos. También se observan algunos haces de K 5 y K14.

- **Estrato espinoso.** Este estrato se compone de 5-15 capas de queratinocitos que normalmente ya no se dividen, aunque no han perdido completamente su capacidad proliferativa. Dependiendo del grosor de la epidermis, el estrato está integrado por más de 4-6 capas de células (piel gruesa) o solamente por 2-3 capas (piel fina). Los queratinocitos espinosos son poliédricos, de núcleo redondeado u ovalado, separados por una fina hendidura pero unidos por desmosomas, dándoles el aspecto de “espinas” que contribuyen a la integridad y a la función barrera de la epidermis. En el citoplasma

Introducción

de las células “espinosas” también se visualizan, con el microscopio electrónico, unos gránulos membranosos ovalados que miden 0,1-0,4 μm de diámetro, denominados gránulos laminares, cuyas láminas transversales electrón-lúcidas y electrón-densas contienen abundantes lípidos. Estas células también sintetizan la proteína involucrina, que se dispone en la superficie interna del plasmalema.

A menudo se denomina estrato de Malpighi al estrato basal y espinoso en conjunto, y su continua actividad mitótica es responsable de la constante migración de estas células hacia la próxima capa, el estrato granuloso. El citoplasma de los queratinocitos de este estrato posee abundantes filamentos de K1 y K10 que se organizan concéntricamente alrededor del núcleo y en pequeños haces que se proyectan de forma radial en las prolongaciones citoplasmáticas (Kanitakis, 2002).

- **Estrato granuloso.** Lo forman 2-3 capas de células ligeramente aplanadas con núcleos alargados que contienen cromatina condensada. En el citoplasma se localizan abundantes gránulos basófilos, de bordes irregulares, que le proporcionan ese aspecto al estrato. Los gránulos están constituidos por una sustancia precursora de la K llamada queratohialina, que contiene una proteína rica en azufre denominada profilagrina que, en el estrato córneo, se transforma por proteólisis y desfosforilación, en filagrina para integrar en ese estrato una matriz interfilamentosa que condensará a los filamentos de K en haces densos y gruesos. El procesamiento de las K de alto peso molecular ocurre en este estrato, modificando la K1 a K2 y la K10 a K11.

Los gránulos laminares provenientes del estrato espinoso, se sitúan en la periferia de las células y mediante exocitosis vierten su contenido lipídico al espacio intercelular para conferir la impermeabilidad propia de la epidermis; además de esta propiedad, la presencia de los lípidos dificulta el paso de sustancias nutritivas provenientes de los capilares sanguíneos de la dermis que, por difusión deberían llegar a los estratos más superficiales (lúcido y córneo). Este impedimento nutricional acelera la muerte de estas células.

Esta lámina por tanto, se caracteriza por la acumulación de los componentes necesarios para el proceso de muerte celular programada y formación de una barrera impermeable superficial.

- **Estrato lúcido.** Suele aparecer como una delgada región translúcida intercalada entre los estratos granuloso y córneo pero no siempre es evidente (solo se encuentra en la epidermis de la piel gruesa). Está constituido por 2-3 capas de células planas. Los queratinocitos del estrato lúcido carecen de núcleos (o si aún los poseen están en proceso de cariólisis) y de la mayoría de las organelas, solo poseen en su interior una proteína impregnada de colesterol denominada eleidina, producto de transformación de los gránulos de queratohialina y filamentos de K densamente agrupados.

- **Estrato córneo.** Es el estrato más superficial que se subdivide en dos capas: una es profunda y compacta y la otra es superficial y suelta. La piel delgada presenta 3-4 capas de células, en cambio, la piel gruesa pueden contener 40-50 capas. Está constituido por un conjunto de células aplanadas, los corneocitos, sin núcleo ni orgánulos (solamente contienen filamentos de K), suspendidos en una matriz lipídica, constituyendo una estructura impermeable e insoluble responsable de la función protectora de la epidermis. La K le proporciona a las células del estrato cierta rigidez, dureza e impermeabilidad. Estos corneocitos sufren un proceso de descamación, que implica la liberación de enzimas por parte de los lisosomas que degradan las pocas organelas existentes e inclusive actúan, en las capas más superficiales, sobre la K de los desmosomas para facilitar este proceso. De esta forma, las capas superficiales queratinizadas del estrato córneo se descaman a la misma velocidad con que la que son reemplazadas por la actividad mitótica de los estratos basal y espinoso.

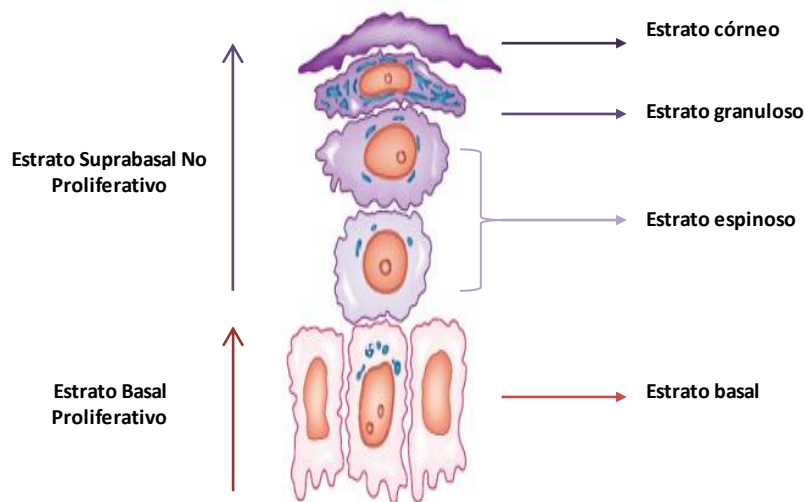


Figura 13: Morfología de los queratinocitos que forman los estratos de la epidermis. Modificado de <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1538§ionid=102302563>.

2.2. Dermis

La dermis de la piel subyace a la epidermis y deriva del mesodermo. Tiene un grosor entre 0,6-3 mm que varía considerablemente con la localización anatómica (siendo mucho más gruesa en las palmas y plantas que en los párpados) y con la profundidad (Summerfield et al., 2015). Presenta apéndices derivados de la epidermis y corren a través de ella los plexos vascular y nervioso. Sufre un continuo recambio, regulado por mecanismos que controlan la síntesis y degradación de sus componentes proteínicos (Kanitakis, 2002).

2.2.1. Tipos de células de la dermis

La dermis contiene los siguientes tipos celulares:

- **Fibroblastos.** Son el tipo celular más abundante, de origen mesenquimal (se identifican por la expresión del antígeno vimentina) con forma de huso. Son los encargados de la producción y organización de la matriz extracelular (MEC) (Lee et al., 2013). Para ello, liberan citoquinas y factores de crecimiento que tienen efectos autocrinos y paracrinos (Brusselaers et al., 2010; Velásquez et al., 2008). La actividad autocrina incluye factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) que induce la síntesis de tejido conectivo y secreción de factores de crecimiento que promueven la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno. Además, juegan un papel significativo en las interacciones epiteliales-mesenquimales mediante su actividad paracrina (Wong et al., 2007), que afecta al crecimiento y diferenciación de los queratinocitos (Lee et al., 2003), especialmente a través de la secreción del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina (IL)-6 y factor de crecimiento fibroblástico (FGF). En respuesta, los queratinocitos sintetizan IL-1 y el péptido relacionado con la hormona paratiroidea que estimula a los fibroblastos a sintetizar KGF (Wong et al., 2007).

Además de los fibroblastos, existen otras poblaciones en menor cantidad, que presentan características específicas:

–**Fibrocitos.** Son fibroblastos pequeños y quiescentes, sin actividad metabólica obvia que residen en tejidos conectivos maduros (Pasparakis et al., 2014).

–**Fibroclastos.** Son fibroblastos con actividad fagocítica que digieren el colágeno (Kanitakis, 2002).

–**Miofibroblastos.** Son células que derivan de fibroblastos durante el proceso de curación de las heridas. Contienen miofilamentos, además de actina muscular y más raramente desmina (Kanitakis, 2002).

- **Células dendríticas (CD).** Existen al menos dos tipos de CD en la dermis humana (Summerfield et al., 2015).

- **CD de tipo I.** Están presentes alrededor de los capilares en la dermis papilar, alrededor de las glándulas sudoríparas y en la hipodermis. Expresan marcadores mesenquimales, así como algunas moléculas superficiales de células presentadoras de antígeno como el antígeno leucocitario humano de clase II (HLA DR/DQ), CD14 y CD36.

- **CD de tipo II.** Se localizan en la dermis media-profunda, alrededor de los folículos pilosos, a nivel del bulbo. Se caracterizan por la expresión del antígeno CD34, antígenos mesenquimales y ocasionalmente antígenos HLA-DR.

- **Macrófagos.** En condiciones normales los macrófagos son escasos en la dermis. Sin embargo, después de una lesión, los monocitos se reclutan rápidamente y se diferencian en macrófagos (Summerfield et al., 2015; Mahdavian Delavary et al., 2011).
- **Linfocitos.** La dermis contiene un gran número de linfocitos, incluso bajo condiciones de reposo, que se ha estimado incluso superior al número de células en la circulación sanguínea (Pasparakis et al., 2014; Sheridan y Lefrançois, 2011; Clark et al., 2006).
- **Mastocitos.** Son células mononucleares procedentes de la médula ósea. Presentan una membrana celular vellosa y contienen gránulos citoplasmáticos característicos, que se tiñen metacromáticamente con azul de toluidina. Se distribuyen principalmente por la dermis perivascular (Kanitakis, 2002).

2.2.2. Organización de la dermis

La dermis se organiza en dos capas, debido en gran parte a las diferencias en la organización del tejido conectivo, patrones nerviosos y vasculares y de la densidad celular (Figura I4).

Capa papilar. Se trata de la región superficial de la dermis. Su nombre se debe a que forma una serie de elevaciones llamadas papilas dermales que se introducen entre las prolongaciones epiteliales de la epidermis (crestas epiteliales) confiriéndole un aspecto irregular a la UDE, incrementando así la superficie de contacto entre la dermis y epidermis permitiendo una mejor adhesión entre ellas.

Se compone por tejido conectivo laxo, integrado por pequeños haces finos y entrecruzados de fibras de colágeno de pequeño diámetro (tipo I y tipo III) que se extienden perpendicularmente a la UDE (Kanitakis, 2002). Por lo general, no se encuentran fibras elásticas maduras en la dermis papilar normal. Las fibras elásticas grandes, densas y con estructura anormal, son el sello distintivo de la piel dañada por el sol. Las características estructurales de la matriz en esta capa permiten que la piel se adapte al impacto.

La capa papilar en comparación con la capa reticular contiene una elevada densidad de células fibroblásticas, con una elevada tasa de actividad metabólica para sintetizar diferentes especies de proteoglicanos (PG).

Esta capa está muy vascularizada por plexos capilares que se proyectan hacia la epidermis a través de las papilas dérmicas y se encuentra inervada por terminaciones nerviosas libres, nocirreceptoras y mecanorreceptoras. A través de las terminaciones sensoriales, la piel establece una relación muy estrecha con el sistema nervioso central (SNC).

- **Capa reticular.** Es la región dominante de la dermis y de la piel. Es la capa más profunda, gruesa y densa. El límite entre la dermis papilar y reticular lo marca un plano horizontal de vasos sanguíneos, el plexo subpapilar. Esta capa se compone principalmente de fibras de colágeno de gran diámetro organizadas en grandes haces. Las fibras elásticas maduras, ramificadas en forma de banda, forman una estructura alrededor de los haces de las fibras de colágeno. Los dos sistemas de fibras están integrados y pueden interactuar para proporcionar a la dermis propiedades mecánicas fuertes y resistentes.

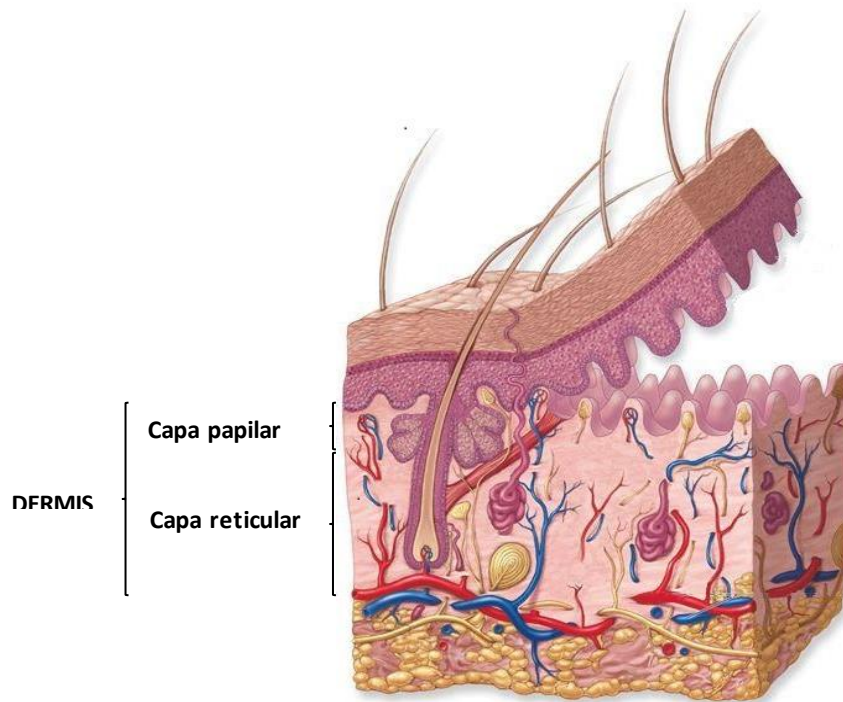


Figura 14: Capas que forman la dermis. Modificado de <https://www.studyblue.com/notes/note/n/histo-integument-shit/deck/7955194>.

2.3. Unión dermo-epidérmica

La UDE es una membrana basal entre la epidermis y la dermis que forma una línea ondulada irregular, producto de la emisión, por parte de la epidermis, de crestas epiteliales hacia la dermis subyacente, la cual proyecta a su vez papilas dermales entre las crestas. Generalmente, es poco ondulada en la piel fina pero en la piel gruesa como en las yemas de los dedos, muestra mayor ondulación e irregularidad, constituyendo las huellas dactilares o dermatoglifos. En general, podemos distinguir varios componentes en la UDE: las membranas celulares de los queratinocitos basales con sus hemidesmosomas, una lámina basal y los componentes fibrosos asociados a la lámina reticular (fibrillas de fijación, microfibrillas dérmicas y fibras de colágeno). Ultraestructuralmente la lámina basal comprende: la lámina lúcida, que es una zona electrón-lúcida, mide 20-40 nm de espesor y contiene laminina y fibronectina; y la

lámina densa, que es una zona electrón-densa, mide 30-60 nm de espesor y contiene colágeno tipo IV (Lim et al., 2009).

Aunque los queratinocitos sintetizan la mayoría de los componentes, los fibroblastos también los sintetizan e influyen a través de su interacción directa (Lee y Cho, 2005) y a través de la secreción de citoquinas en los queratinocitos (König et al., 1992).

La UDE juega un papel fundamental como soporte mecánico para la adhesión de la epidermis a la dermis y regula el intercambio metabólico entre estos dos compartimentos y el continuo recambio de la epidermis (Papini et al., 2003). Además, determina la polaridad de crecimiento, dirige la organización del citoesqueleto en las células basales, proporciona señales de desarrollo, sirve como barrera semipermeable y como soporte para la migración de los queratinocitos durante la curación de las heridas.

2.4. Matriz extracelular

La MEC constituye el soporte en el cual residen las células de la piel (Rhee, 2009). Las interacciones entre las células y la MEC son de gran importancia pudiendo afectar a la adhesión, migración, proliferación y diferenciación de las células y a la regeneración y reparación de los tejidos. En los organismos vivos en desarrollo, la MEC se degrada constantemente y se vuelve a sintetizar y remodelar, cambiando el entorno en el cual residen las células.

La MEC de la piel está compuesta por fibras y sustancia fundamental (Peniche y Argüelles, 2009). En la epidermis es delgada y compuesta predominantemente por carbohidratos, pero en la dermis es más gruesa pudiéndose distinguir:

- **Fibras**

- **Fibras de colágeno.** La mayoría de las fibras están compuestas de colágeno, principalmente de los tipos I y III (98%), responsables de la resistencia mecánica de la piel (Peniche y Argüelles, 2009). Ultraestructuralmente tienen un diámetro de 100 nm y muestran estriación transversal en secciones longitudinales con una periodicidad de 64 nm. Estas fibras se disponen en haces que se vuelven más gruesos en la dermis profunda. Otros colágenos encontrados incluyen los tipos IV (UDE y membrana basal de los apéndices cutáneos, vasos, músculo y nervios) y tipo VII (fibras de anclaje de la UDE) (Kanitakis, 2002).

- **Fibras reticulares.** Consisten bioquímicamente en un conjunto de fibras delgadas de colágeno tipo I y III y fibronectina (Kanitakis, 2002).

- **Fibras elásticas.** Son las responsables de las propiedades retráctiles de la piel. Están compuestas por la proteína elastina y rodeadas por un número variado de microfibrillas de fibrilina dándole ese contorno irregular (Kanitakis, 2002). En la dermis papilar son delgadas pero llegan a ser más gruesas en la dermis reticular, donde tienden a disponerse horizontalmente. Son comunes en la piel de pacientes con ciertas

enfermedades hereditarias del tejido conectivo, en el envejecimiento de la piel y en la piel dañada, en donde presentan una estructura anormalmente grande y densa.

- **Sustancia fundamental**

Consiste en varias macromoléculas, tales como PG, glicosaminoglicanos (GAG) y glicoproteínas (fibronectina, laminina, vitronectina, trombospondina y tenascina) que rellenan el espacio entre las fibras y las células, y cuyas funciones son principalmente la adhesión y migración celular y la remodelación del tejido. Es muy abundante en la dermis papilar y alrededor de los apéndices cutáneos (Peniche y Argüelles, 2009).

2.5. Anejos de la piel

La piel está asociada a varios anejos. Son estructuras que participan activamente en su fisiología y se originan a partir de esbozos epidérmicos embrionarios que al interactuar con el tejido mesodérmico se diferencian en estructuras de protección (pelos y uñas) o de secreción (glándulas sebáceas, sudoríparas merocrinas y apocrinas y mamarías) (Summerfield et al., 2015).

2.6. Inervación de la piel

La piel contiene una inervación rica y compleja, con dos ramas:

- La rama aferente (inervación centrípeta) es responsable de la percepción de las variaciones y agresiones que llegan desde el exterior [tacto, presión, vibración, dolor, temperatura (T^a), picazón]. Esta función es mediada por fibras sensitivas mielinizadas o no mielinizadas, terminaciones nerviosas libres y corpúsculos táctiles (discos de Merkel, corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini, corpúsculos de Krause y corpúsculos de Ruffini) (Figura 15).
- La rama eferente (inervación centrífuga) es responsable de la regulación de la vasomotricidad, secreción de sudor y piloerección. Estas funciones las llevan a cabo las fibras no mielinizadas del sistema simpático.

Las terminaciones nerviosas libres son ramificaciones de fibras nerviosas que carecen de envuelta de mielina. Captan sensaciones de dolor, tacto fino, calor y frío. Están distribuidas de manera no uniforme por toda la superficie corporal. En determinados lugares como los dedos de la mano, la cara, los labios son más abundantes que en otras regiones del cuerpo. Se caracterizan porque están situadas en la capa papilar de la dermis y penetran entre los queratinocitos de los estratos basal y espinoso de la epidermis. Aunque la presencia de fibras nerviosas dentro de la epidermis ha sido ampliamente debatida durante mucho tiempo, estudios han demostrado que los axones dérmicos pueden penetrar en la epidermis y llegar a estar

en contacto con las células de Langerhans, posiblemente regulando su capacidad de presentación de los antígenos (Kanitakis, 2002).

Los nervios en la dermis se reconocen fácilmente gracias a su aspecto ondulante; contienen axones rodeados por células de Schwann y por fibroblastos perineurales. Estas células se pueden diferenciar fácilmente por inmunohistoquímica: los axones expresan neurofilamentos (NF) y periferina (el filamento intermedio de las células neuronales); las células de Schwann expresan la proteína S100, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y proteína básica de mielina; y los fibroblastos perineurales expresan vimentina (Blais et al., 2013).

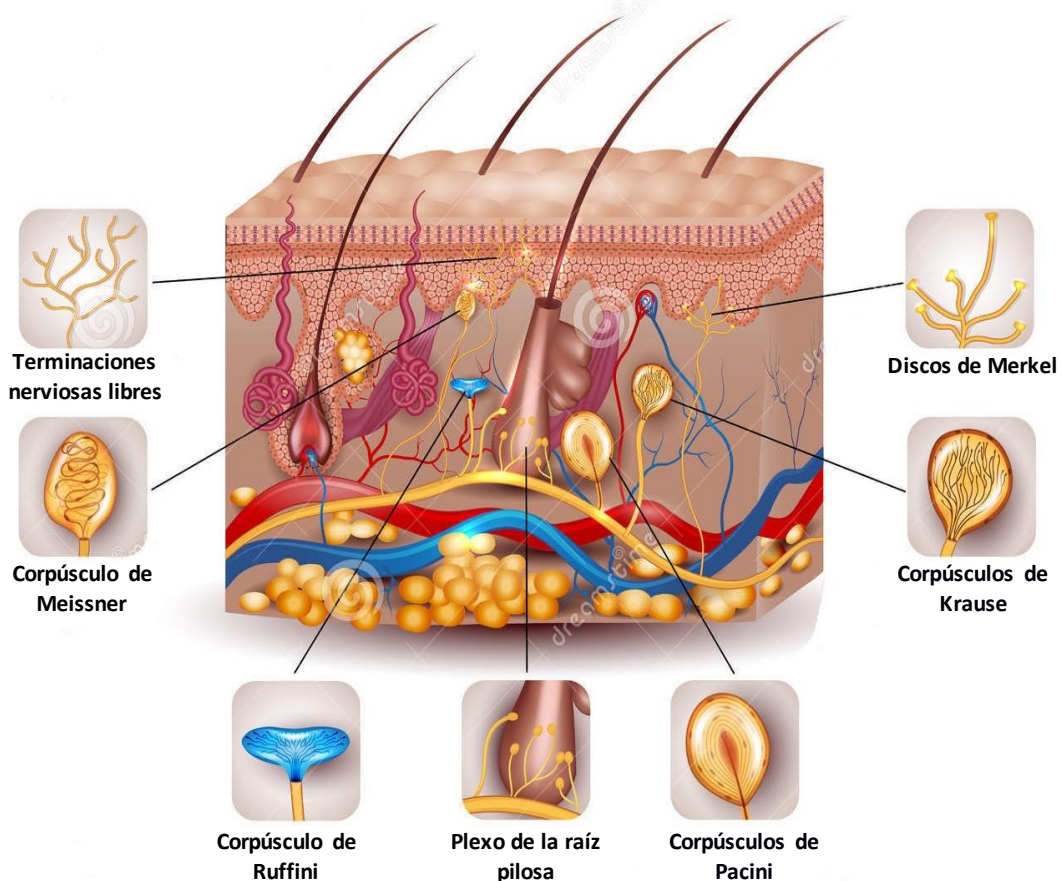


Figura 15: Receptores sensoriales de la piel. Modificado de <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-sensory-receptors-skin-detailed-anatomy-beautiful-bright-colors-image49741056>.

3. Funciones de la piel

Los diversos integrantes de la piel sana realizan una amplia variedad de funciones vitales que intentan mantener la homeostasis del cuerpo humano con el medio ambiente (Peniche y Argüelles, 2009; Velásquez et al., 2008), gracias a la elaborada estructura de la piel asociada a varios tejidos con diferentes orígenes (epitelial, conectivo, vascular, muscular y nervioso) (Kanitakis, 2002). Las 4 principales funciones son (Figura 16):

Introducción

- **Protección.** Su superficie relativamente impermeable previene la deshidratación así como nos protege de las agresiones mecánicas, químicas y térmicas (Caicedo et al., 2005). Actúa como una barrera física frente a la invasión de microorganismos, a través de una placa de ácidos grasos que yace sobre la piel, fungistática y bacteriostática y también por el hecho de que la piel está colonizada por bacterias no invasivas que sirven para competir con patógenos más invasivos mediante la elaboración de antibióticos, competición por sustratos alimenticios y creación de un ambiente con pH adverso (Niyonsaba y Ogawa, 2005). Además, ciertas células integrantes de la epidermis como las células de Langerhans y linfocitos que llegan a ella, tienen la capacidad de captar antígenos y transferirlos a las células efectoras de la respuesta inmunológica. También nos protege de las radiaciones ultravioletas por la melanina, que además le confiere coloración a la epidermis (Caicedo et al., 2005).
- **Sensación.** La piel es el principal órgano sensitivo del cuerpo con diversos receptores que captan sensaciones de tacto, calor, frío, presión y dolor, permitiéndole así, interactuar con el medio ambiente y relacionarlo con el SNC (Caicedo et al., 2005).
- **Termorregulación.** En ser humano es el órgano principal que regula la Tª corporal y mantiene el equilibrio hídrico. El cuerpo está aislado contra la pérdida de calor por la presencia de pelos y tejido subcutáneo adiposo (Zhang y Fu, 2008). Por el contrario, la pérdida de calor se ve favorecida por la evaporación del sudor en la superficie cutánea y por un incremento en el flujo sanguíneo de la rica red vascular de la dermis.
- **Metabolismo.** El tejido adiposo subcutáneo constituye un gran almacén de energía, principalmente en forma de triglicéridos. Además, la piel sintetiza vitamina D por acción de la radiación ultravioleta y completa así la obtenida en la alimentación (Lee et al., 2013).

También existen otras funciones no menos importantes:

- **Reparación.** Cura las heridas y repara el daño celular causado por radiaciones ultravioleta.
- **Vascularización.** A través de los vasos sanguíneos y linfáticos de la dermis, se absorben sustancias que atraviesan la epidermis, como algunos medicamentos (lociones, cremas o pomadas) contribuyendo así a la nutrición, regulación de la Tª y drenaje linfático.
- **Comunicación.** Conduce los estímulos nerviosos y secreta citoquinas.
- **Atención.** A través de la pigmentación, distribución del pelo, sudoración.
- **Lubricación.** Por la secreción de las glándulas sebáceas.

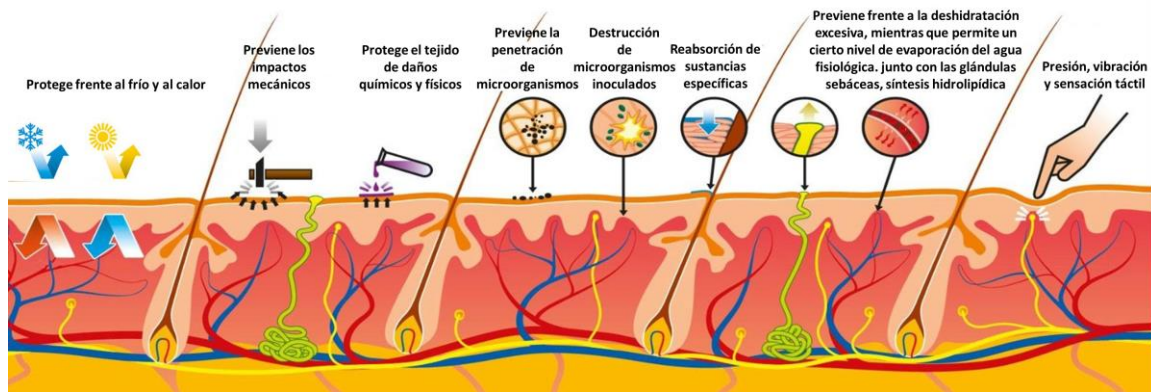


Figura 16: Funciones de la piel: protección, termorregulación, sensación y metabólica. Modificado de <https://www.bbtraun.es/es/pacientes/cicatrizacion-de-heridas/que-saber-sobre-la-piel.html>.

4. Fases del proceso de curación de las heridas

Debido a que la piel sirve como barrera de protección contra el ambiente exterior, cualquier ruptura en ella se debe reparar rápida y eficientemente. La curación de las heridas de piel es un proceso de mecanismos moleculares y humorales altamente regulados y dinámicos.

El cierre de una herida puede realizarse por regeneración o reparación. Mientras la regeneración describe la sustitución específica del tejido, la reparación es una forma inespecífica de curación en la que la herida cura por fibrosis y formación de una cicatriz. Esto último, desafortunadamente, es la principal forma de curación de las heridas de la piel en el adulto. El producto final no es ni estética ni funcionalmente perfecto. Los apéndices epidérmicos que se perdieron en el sitio del daño no se regeneran, y cuando la herida cura se conserva un tejido conectivo cicatricial donde la matriz de colágeno se reconstituye mal, en densos haces paralelos.

Uno de los principales objetivos de la medicina regenerativa es averiguar cómo se puede inducir a la piel a reconstruir las partes dañadas de una manera lo más perfecta posible. Conocer por tanto, el proceso de curación de las heridas es básico si se quiere desarrollar métodos que interfieran en el mismo. Consta de las siguientes fases que se solapan en el tiempo y el espacio (Zhang y Fu, 2008) (Figura 17):

a) Coagulación. La mayoría de las heridas en la piel causan fugas de la sangre desde los vasos sanguíneos dañados. Inmediatamente después de la lesión, la coagulación y la hemostasia sirven para minimizar esta pérdida de sangre (Reinke y Sorg, 2012). La cascada de la coagulación se activa a través de la vía extrínseca (iniciadas por factores de coagulación desde la piel lesionada) e intrínseca (las plaquetas se activan por exposición al colágeno), lo que da lugar a la agregación plaquetaria y la formación del coágulo (Mescher, 2017). Al mismo tiempo los vasos lesionados siguen una vasoconstricción a los 5-10 min, provocada por las plaquetas, para reducir la pérdida de sangre y llenar el

Introducción

huevo de tejido con un coágulo de sangre formado por moléculas de fibrina, fibronectina, vitronectina, trombospondinas, plaquetas, proteínas de la sangre y células sanguíneas atrapadas en él, además de citoquinas y factores de crecimiento formando una matriz provisional como una estructura de soporte para la migración de leucocitos, fibroblastos, queratinocitos y las células endoteliales y como un reservorio de factores de crecimiento (Reinke y Sorg, 2012).

b) Inflamación. Esta fase se puede dividir en una fase temprana con el reclutamiento desde la sangre de neutrófilos y una fase tardía con la aparición y transformación de monocitos en respuesta a cambios moleculares en la superficie de las células endoteliales de los capilares de revestimiento en la zona de la herida y por una gran variedad de señales quimiotácticas, para eliminar las bacterias contaminantes por fagocitosis y secreción de proteasas que producen la muerte local de las bacterias y ayudan a degradar el tejido necrótico (Velnar et al., 2009). Los neutrófilos y monocitos activados, liberan un gran número de factores de crecimiento y citoquinas importantes en la activación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Maxson et al., 2012; Mahdavian Delavary et al., 2011).

Los mastocitos también se activan y liberan gránulos llenos de enzimas, histamina y otras aminas activas. Estos mediadores son los responsables de los signos de inflamación alrededor del sitio de la herida: rubor (enrojecimiento), calor, tumor (inflamación) y dolor (Maxson et al., 2012).

c) Proliferación. Normalmente comienza el tercer día después de la lesión y dura alrededor de 2 semanas. Los fibroblastos se adhieren a la matriz de fibrina y comienzan a producir colágeno (Clark, 2001). A medida que el colágeno madura, se crean más entrecruzamientos intramoleculares e intermoleculares, con la finalidad de aumentar la fuerza del tejido débil. A medida que aumenta la síntesis de colágeno, la proliferación de los fibroblastos decrece. El TGF- β liberado anteriormente por las plaquetas y por los macrófagos es una señal crítica, ya que aumenta la producción global de los componentes de la MEC, incluyendo colágeno, PG y fibronectina. Al mismo tiempo TGF- β disminuye la secreción de proteasas responsable de la degradación de la matriz y estimula la producción del inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP) (Diegelmann y Evans, 2004).

La reepitelización de la superficie ocurre a partir de los queratinocitos basales, suprabasales y de los folículos pilosos si se encuentran intactos. Estos se unen mediante hemidesmosomas a la laminina de la membrana basal por medio de integrinas. Para migrar, los hemidesmosomas tienen que desensamblarse mediante las enzimas colagenasa y elastasa, y en el borde delantero de los queratinocitos se expresan nuevas integrinas y relocalizan los receptores de colágeno, con el fin de agarrar y rastrear la matriz provisional y la dermis subyacente de la herida. Después del inicio de la migración, los queratinocitos del borde de la herida proliferan, proporcionando un

Introducción

grupo extra de células para reemplazar las células perdidas durante la lesión (Maxson et al., 2012). Los principales reguladores de esta proliferación son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), KGF, factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) y factor de crecimiento nervioso (NGF) que actúan como mitógenos. Cuando los queratinocitos de los bordes se acercan, la fusión del epitelio se realiza mediante contactos adherentes intercelulares para finalmente cerrar la herida como una cremallera. Como resultado de esta fase de proliferación es el desarrollo de tejido de granulación, que se caracteriza por la gran cantidad de células.

En esta fase se produce la neovascularización (movilización de progenitores endoteliales derivados de la médula ósea)/angiogénesis (brote de capilares desde vasos sanguíneos existentes) en el lecho de la herida para reconectar a la perfusión nutritiva Tonnesen (Tonnesen et al., 2000).

d) Remodelación. Esta fase comienza el día 21 después de la lesión llegando a durar 1-2 años o incluso más (Maxson et al., 2012). La remodelación mantiene un equilibrio entre la degradación y la síntesis. Los haces de colágeno aumentan su diámetro y se entrecruzan para incrementar la fuerza tensil y elasticidad del tejido a la vez que la fibronectina y la fibrina se degradan (Baum y Arpey, 2005).

Gradualmente, la actividad de los TIMP aumenta, resultando en una caída en la actividad de las enzimas metaloproteasas de matriz (MMP) aumentando la acumulación de la nueva MEC (Mulder y Berg, 2002). Cuando la expresión de MMP cesa, se inicia la síntesis de la membrana basal y se crean nuevos hemidesmosomas. A pesar de que la deposición inicial de los haces de colágeno es altamente desorganizada, la nueva matriz de colágeno se vuelve más orientada y reticulada. El tejido conectivo subyacente se contrae y atrae los márgenes de la herida, los miofibroblastos causan esta contracción por sus múltiples anclajes al colágeno.

Finalmente, a medida que la herida cicatriza, la densidad de fibroblastos y macrófagos se reduce por apoptosis. Con el tiempo, el crecimiento de los capilares se detiene, el flujo sanguíneo en la zona disminuye, y la actividad metabólica decrece, resultando en una herida totalmente curada (Maxson et al., 2012). Las células suprabasales de la epidermis dejan de expresar integrinas y K basales y sufren la diferenciación hacia los estratos superiores de la epidermis.

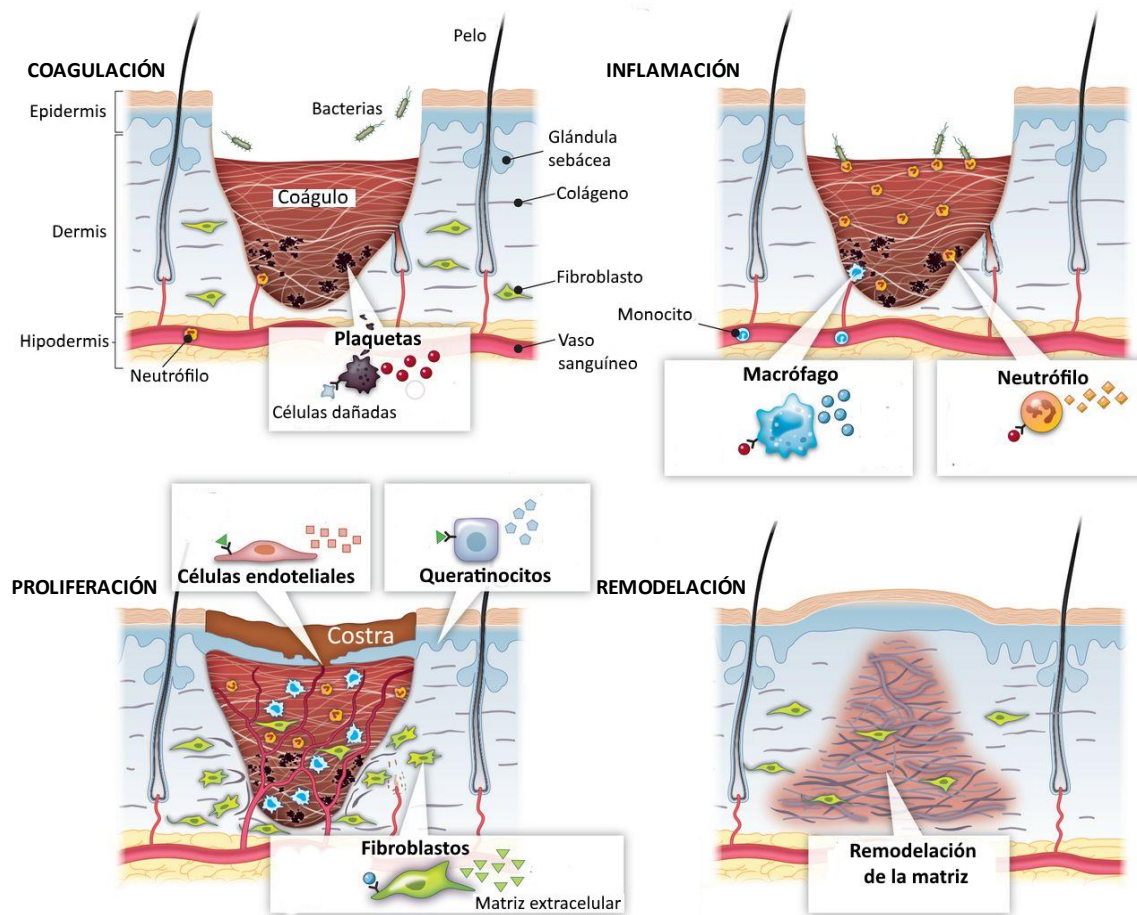


Figura 17: Fases del proceso de curación de las heridas. Modificado de <http://b-log-ia20.blogspot.com.es/2015/12/el-sistema-tegumentario.html>.

5. Clasificación y tratamiento de los diferentes tipos de heridas

Las heridas de la piel suelen clasificarse en agudas, cuando curan en el tiempo esperado, dependiendo de la edad del paciente, localización, tamaño y etiología de la herida; y crónicas, cuando tardan en curar más de lo normal o son incapaces de hacerlo, por lo tanto, tienden a poner en riesgo de infección al herido y pueden conducir a la amputación del o de los miembros afectados.

Entre las heridas crónicas se encuentran las úlceras venosas, las úlceras neuropáticas diabéticas de los miembros inferiores, las úlceras por presión, la epidermólisis bullosa y las heridas por quemaduras. Las heridas por quemaduras son las de mayor incidencia, por lo que ahora en adelante nos referiremos fundamentalmente a las mismas. Estas pueden considerarse críticas cuando son:

- De segundo grado, cubriendo más del 30% del cuerpo.
- De tercer grado, cubriendo la cara, los brazos o las piernas.
- De tercer grado, cubriendo más del 10% del cuerpo (Peniche y Argüelles, 2009).

En cuanto a la clasificación de las heridas según el nivel de las capas de la piel que afectan tenemos (Morgan et al., 2000) (Figura 18):

- **Herida epidérmica.** Afectan solo a la epidermis y normalmente se producen por quemaduras del sol o rozaduras, se caracterizan por eritema y poco dolor. Estas lesiones no requieren de un tratamiento quirúrgico ya que solo se ve afectada la epidermis y la regeneración es rápida desde los queratinocitos no dañados de los folículos pilosos (Papini et al., 2003) y sin cicatriz porque no se deposita nueva MEC. Sin embargo, usualmente se requiere terapia de apoyo, regular la analgesia y fluidos intravenosos en las lesiones extendidas.
- **Herida dermo-epidérmica superficial.** Afectan a la epidermis y a la parte superficial de la dermis. Las terminaciones nerviosas superficiales quedan expuestas haciendo a estas lesiones dolorosas. Aquí se incluyen a las quemaduras de primer grado (Peniche y Argüelles, 2009). Su reparación ocurre dentro de las dos semanas sin secuelas de cicatrización. Los queratinocitos basales proliferan y migran hacia la zona dañada al igual que las células del borde de la herida, folículos pilosos o de las glándulas sebáceas. El tratamiento aplicado principalmente para evitar la progresión de la herida es con el uso de cremas antimicrobianas y coberturas oclusivas, para una rápida reepitelización en un ambiente húmedo (Papini et al., 2003).
- **Herida dermo-epidérmica profunda.** Causan un gran daño a la dermis quedando pocos apéndices y por lo tanto, tardan más tiempo en sanar. Aquí se incluyen a las quemaduras de segundo grado (Peniche y Argüelles, 2009). El proceso de curación es similar a las heridas más superficiales, sin embargo, al quedar pocos apéndices tardan más tiempo en sanar. La cicatrización y fibroplasia es más intensa comparada con la anterior.
- **Herida profunda.** Afecta la piel en todo su espesor, debido a quemaduras de tercer grado (Blais et al., 2013), intervenciones quirúrgicas o por algunas enfermedades (úlceras grandes) y hay una pérdida total de la sensibilidad. Este tipo de herida cura por contracción, con reepitelización solamente en los bordes de la herida (Papini et al., 2003) ya que tanto los folículos pilosos, como las glándulas sudoríparas y sebáceas se pierden en el sitio de la lesión (Barthel y Aberdam, 2005). Requieren una barrera de protección para prevenir las infecciones y desecaciones. Es necesario reponer cierta parte del tejido u órgano para evitar la pérdida de su función anatómica y fisiológica. Cuando la herida es mayor de 1 cm de diámetro requiere un injerto de piel que puede ser un autoinjerto desde una zona donante a la zona lesionada. Su reparación deja siempre una cicatriz, dejando deformidades cosméticas y morbilidad (Groeber et al., 2012; Shevchenko et al., 2010).

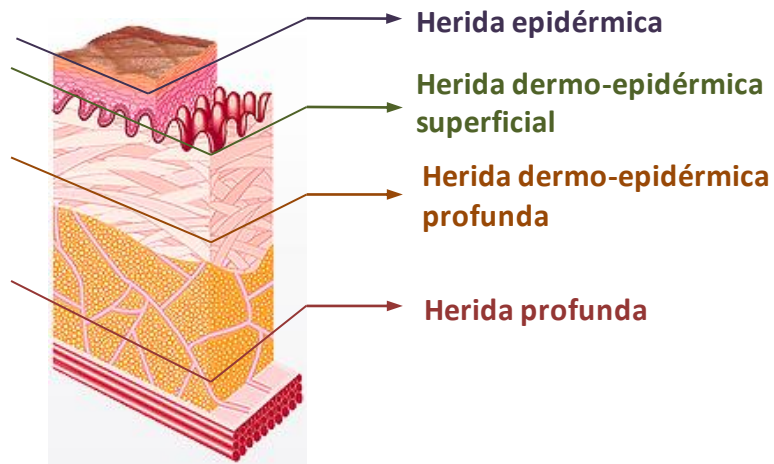


Figura 18: Tipos de heridas según el nivel de las capas de la piel que afectan. Modificado de <http://www.urgomedical.es/understanding-together-2/skin-and-wound-healing/>.

B. LA MEMBRANA AMNIÓTICA

1. Generalidades

En el embarazo, el feto humano se encuentra rodeado por dos membranas fetales: la membrana amniótica (MA) y el corion (Ilancheran et al., 2007). La MA se desarrolla desde el tejido extraembrionario que recubre la placenta y rodea al fluido amniótico y al feto constituyendo la capa más interna de la placenta (Parolini et al., 2008). La MA es una membrana delgada, elástica y semitransparente de 0,02-0,5 mm de grosor (Riau et al., 2010) que no tiene vasos sanguíneos, ni vasos linfáticos ni tampoco nervios (Wu y Hui, 2006; Wilshaw et al., 2008), por lo que los nutrientes llegan al feto por difusión desde el fluido amniótico y/o desde la decidua (Niknejad et al., 2008).

2. Estructura de la Membrana Amniótica

La estructura de la MA consiste en (Figura 19):

- **Epitelio amniótico.** Es una lámina de células cuboidales y columnares derivadas del ectodermo (Wilshaw et al., 2008) en contacto con el fluido amniótico (Parolini et al., 2008).
- **Membrana basal.** El epitelio amniótico se encuentra sobre una membrana basal de MEC en contacto con el estroma (Parolini et al., 2008). Esta membrana basal está compuesta de colágeno tipo I, III, IV, V y VII; y una elevada concentración de laminina y fibronectina que promueven el anclaje, migración y crecimiento celular (Wu y Hui, 2006) además de regular la diferenciación, morfogénesis epitelial y prevenir la apoptosis (Riau et al., 2010). Otro componente importante es la endostatina, con potente acción antiangiogénica (Riau et al., 2010).

Introducción

- **Estroma.** Es un tejido conectivo derivado del mesodermo. Es compacto y forma el principal esqueleto de la MA (Niknejad et al., 2008). Puede variar de grosor entre las distintas placentas e incluso entre distintas zonas de la misma placenta. Consta de:

- **Capa compacta.** Compuesta predominantemente por los colágenos tipo I y III, que mantienen la integridad mecánica de la MA; los colágenos tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre los colágenos tipo I y III; la membrana basal epitelial y fibronectina. Todos estos componentes son secretados por las células mesenquimales situadas en la capa fibroblástica ya que esta capa carece de células (Niknejad et al., 2008).

- **Capa fibroblástica.** Formada por una red reticular laxa que contiene esporádicas células mesenquimales similares a fibroblastos y a veces también se observan macrófagos (Niknejad et al., 2008).

- **Capa esponjosa.** Consiste en una compleja red de fibrillas finas de colágeno rodeada por mucus en contacto con el corion (Wilshaw et al., 2008). Su abundante contenido de PG y glucoproteínas le da esa apariencia esponjosa (Niknejad et al., 2008).

La otra membrana fetal, la más externa, es la membrana coriónica (corion) que consiste en una región mesodérmica y otra trofoblástica (Figura 19). Contiene vasos sanguíneos que permiten la transferencia de nutrientes desde la sangre materna a la sangre fetal (Riau et al., 2010). También deriva del trofoectodermo del blastocisto implantado (Ilancheran et al., 2007). El mesodermo amniótico y coriónico son similares en composición. Una larga e incompleta membrana basal separa el mesodermo coriónico de las células trofoblásticas (Parolini et al., 2008).

Lo más externo de las membranas fetales es la decidua, que está compuesta por endometrio modificado y es el único componente de las membranas de origen materno (Riau et al., 2010).

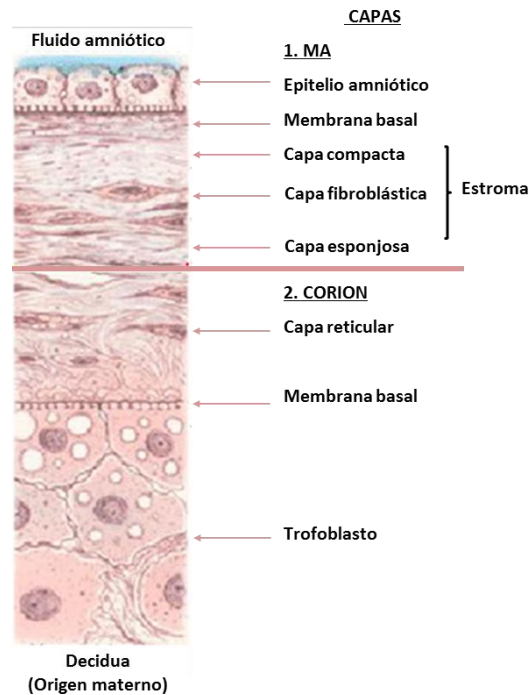


Figura I9: Estructura de las dos membranas fetales. Modificado de Niknejad et al., 2008.

3. Propiedades de la Membrana Amniótica

La MA tiene una serie de propiedades biológicas (Ueno et al., 2006) y mecánicas que la hacen adecuada para su uso en Ingeniería Tisular (Lo y Pope, 2009; Niknejad et al., 2008; Toda et al., 2007), tanto en fresco como tras su criopreservación:

- **Protección.** La MA permite un control adecuado del fluido y permeabilidad a los gases. Previene la pérdida de líquido, electrolitos, proteínas, calor y energía (Rejzek et al., 2001). La permeabilidad es direccional, así la humedad y el oxígeno difunden libremente en el lecho de la herida, acelerando la curación (Yoshita et al., 2004; Kesting et al., 2008).
- **Propiedades antiinflamatorias.** La matriz estromal de la MA suprime la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 α y IL-1 β , sintetizando sus respectivos antagonistas del receptor (Niknejad et al., 2008). En la MA se sintetizan también TIMP-1, -2, -3 y -4 y IL-10 (Toda et al., 2007) para inhibir a las MMP que expresan las células polimorfonucleares y macrófagos (Ueno et al., 2006). Por otro lado, se evita la quimiotaxis que podría atraer a los macrófagos, mediante la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Además, la MA sintetiza el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que suprime la migración de las células presentadoras del antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II e induce la apoptosis de las células T y B (Toda et al., 2007).

- **Propiedades antimicrobianas.** Los niveles bacterianos son más bajos probablemente como resultado de la buena adhesión a la herida evitando la contaminación adicional (Talmi et al., 1991) y a sustancias antibacterianas como las β -defensinas, elafina, inhibidores de la elastasa y de la proteasa (Niknejad et al., 2008; Splichal y Trebichavsky, 2001) y la lactoferrina (suprime la producción de IL-6) (Kanyshkova et al., 2001).

- **Propiedades antiangiogénicas.** Los efectos de la MA en el desarrollo de vasos sanguíneos es un tema controvertido. El efecto antiangiogénico de la MA es el resultado de su estructura avascular y a la expresión por parte de las células amnióticas de TIMP-1,-2,-3,-4, así como trombospondina-1 y endostatina, tanto en las MA en fresco como en las MA criopreservadas (Lo y Pope, 2009; Kesting et al., 2008; Burgos, 1986), por ello se utiliza en oftalmología (Wolbank et al., 2009).

Otras investigaciones han revelado la expresión por parte de las células amnióticas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), lo que sugiere que las MA tienen propiedades proangiogénicas (Bogic et al., 2000) y cuando se aplica en pacientes con úlceras crónicas en piernas cubiertas con MA se observa una proliferación significativa de los vasos (Wolbank et al., 2009).

- **Propiedades analgésicas.** La MA reduce notablemente los niveles de dolor, probablemente esto es debido a que cubren las terminaciones nerviosas expuestas limitando el contacto entre el lecho de la herida y el medio ambiente (Kesting et al., 2008). Además, cuando se utiliza como apósito biológico, disminuye la necesidad de cambiarlo frecuentemente disminuyendo el dolor que esto conlleva (Lo et al., 2010; Ley-Chavez et al., 2003).

- **Baja inmunogenicidad.** La antigenicidad de la MA, al contrario que la del corion, es baja (Lo y Pope, 2009) porque las células que la componen, no expresan antígenos HLA de clase I (HLA -A, -B, -D) ni antígenos HLA de clase II (HLA-DR, -DQ) (Niknejad et al., 2008) en la superficie celular, cuya función es inducir la respuesta inmune. Sin embargo, si que expresan, HLA-G (Ilancheran et al., 2007), involucrado en la tolerancia inmune al actuar como ligando para receptores inhibitorios presentes en las células *Natural Killer* y macrófagos, sugiriendo que el rechazo agudo no ocurriría después del trasplante (Insausti et al., 2010). Además, la inmunogenicidad de la MA criopreservada es menor que la de la MA fresca, ya que dependiendo del método de criopreservación utilizado las células tras la criopreservación no son viables (Lo y Pope, 2009; Niknejad et al., 2008).

Introducción

- **Promueve la reepitelización.** La MA tanto en fresco como criopreservada expresa factores de crecimiento y factores de crecimiento transformante [EGF, KGF, factor de crecimiento hepático (HGF), bFGF, TGF- α , y TGF- β 1,-2,-3] y receptores de KGF y HGF, tanto en el epitelio como estroma, con unos niveles más elevados en la MA en fresco (Koizumi et al., 2007).
- **Propiedades mecánicas.** La MA es delgada y flexible pero tiene alta resistencia a la tracción y es capaz de soportar el estrés mecánico del procedimiento de aplicación del injerto de MA (Gajiwala y Gajiwala, 2004). La elasticidad, rigidez y otras propiedades biomecánicas de la MEC dependen de la variación en de los niveles de colágeno, PG y elastina. La elastina que se detecta principalmente en el epitelio con presencia también en el estroma, es la base molecular de la elasticidad (Riau et al., 2010; Hieber et al., 1997).
- **Reduce la cicatrización.** En una respuesta inflamatoria, los macrófagos producen citoquinas que inician la fibrosis a través del sistema de señalización TGF- β profibrolítico. La MA suprime este sistema, por ejemplo, inhibiendo el receptor de TGF- β tipo II en los miofibroblastos que depositan colágeno produciendo fibrosis (Tseng et al., 1999). De esta manera, se promueve la reconstrucción del tejido en lugar de la formación de tejido cicatricial (Ilanchan et al., 2009).
- **No tumorigenicidad.** No existen evidencias de tumorigenicidad en humanos cuando las células derivadas de la MA son trasplantadas en voluntarios en un intento de corregir diversas enfermedades (Lo y Pope, 2009).
- **Pocos problemas éticos.** La MA se descarta después del parto, es fácil de obtener sin dañar a las madres ni a los bebés y supera los problemas éticos asociados con el uso de las células madre embrionarias (CME). El comité ético, aprueba el uso de la MA siempre que la madre firme el consentimiento informado de cada institución (Li et al., 2006).

4. La Membrana Amniótica como soporte

En la actualidad, existe un debate sobre si la MA intacta o descelularizada es el mejor sustrato para su uso como soporte en la expansión *ex vivo* de las células. Algunas investigaciones muestran los potenciales beneficios con la MA intacta. En contraste, otros grupos han informado que la MA descelularizada puede mejorar la proliferación, diferenciación y la adhesión celular, así como un crecimiento más uniforme de las células en comparación con la MA intacta. La presencia del epitelio amniótico puede también obstaculizar la expansión de explantes cultivados sobre la MA y retrasar la formación de hemidesmosomas. Esto se traduce en un mejor proceso de cicatrización de las heridas, siendo una de las propiedades más importantes de la MA que determina la mayoría de sus indicaciones clínicas. Por lo tanto, la MA descelularizada parece la opción preferida en Ingeniería Tisular.

4.1. Métodos de descelularización de la Membrana Amniótica

Actualmente, se han descrito varios métodos para descelularizar el epitelio de la MA tanto enzimáticos como químicos, desnaturalizantes de proteínas (Riau et al., 2010) o una combinación enzimática-química, pudiendo estar todos ellos seguidos por un tratamiento mecánico para su uso en oftalmología (Riau et al., 2010; Hopkinson et al., 2008). Sin embargo, no existe un consenso sobre cuál es el mejor método para preparar el soporte. Cada método ha demostrado tener diferentes efectos sobre la eliminación de las células epiteliales amnióticas (CEA) y de las células mesenquimales estromales amnióticas (CMEA), estructura de la membrana basal, MEC y propiedades biológicas. Idealmente, el método de descelularización será eficiente cuando no altere la integridad de estas estructuras ni la función biológica.

- **Dispasa.** La dispasa, obtenida desde *Bacillus polymyxa* (Lim et al., 2009), actúa enzimáticamente por acción proteolítica. Tiene como diana las proteínas de la membrana basal, tales como laminina, colágeno tipo IV y VII, y fibronectina (Stenn et al., 1989). El uso de 1,2 U/ml de dispasa entre 5 min y 2 h a T^a ambiente seguido por un suave raspado, resulta en la ruptura de la membrana basal, especialmente la lámina densa (Lim et al., 2009). El estroma se desorganiza y el colágeno tipo VI, fibronectina, y varios factores de crecimiento tales como TGF α , y receptores de TGF β 1 y - β 2, receptor de EGF, VEGF y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) disminuyen después de la incubación (Hopkinson et al., 2008).

- **Ácido Etilenediaminetetraacético (EDTA).** El EDTA es un agente quelante que influye en los contactos célula-célula regulados por iones calcio. Los estudios han descrito el uso de EDTA en un rango de concentraciones de 0,02% a 0,25% durante 10 min hasta 2 h a 37°C, generalmente seguido por el raspado mecánico de los restos de las CEA que permanecen tras el tratamiento. El aumento de las concentraciones y de los tiempos de tratamiento no mejoró la eliminación de las CEA. Con un suave raspado, consiguieron la eliminación de alrededor del 40% de esas células pero se observaron daños en la membrana basal, mientras que con un raspado más agresivo, eliminaron la mayoría de las CEA pero la membrana basal resultó más dañada (Hopkinson et al., 2008), además de quedar expuestas las fibras de colágeno del estroma. Esto hace que la técnica sea ineficiente y difícil de estandarizar llevando a una descelularización inconsistente (Koizumi et al., 2000)
- **Tripsina/EDTA (T/E).** La combinación de T/E se usa generalmente para separar las células sembradas de los frascos de cultivo. Para eliminar las CEA de la MA se utiliza en un rango de concentraciones desde 0,1% a 0,25% a 37°C durante 30 min. La mayoría de las veces, las CEA se separan sin raspado mecánico, pero algunos grupos han informado que es necesario un suave raspado después de la incubación (Riau et al., 2010).
- **Urea.** La urea es una proteína desnaturizante que tiene la habilidad de solubilizar las proteínas (Bennion y Daggett, 2004). La descelularización de la MA puede llevarse a cabo en frío con urea 5M durante 5 min, seguido por un suave raspado. Los beneficios de este método son el corto tiempo de incubación y la fácil disponibilidad de la urea. La MA descelularizada usando este método muestra una superficie lisa de la membrana basal por microscopía electrónica de barrido (MEB), la presencia de lámina basal por TEM, y la presencia de los componentes de la MEC y de factores de crecimiento.
- **Etanol.** El etanol se ha usado para desprender las células epiteliales corneales desde la membrana basal. La descelularización con etanol se realiza incubando la MA con 20% de etanol durante 30 seg, seguido de un raspado mecánico agresivo. Los beneficios de la técnica son el breve tiempo de incubación y la disponibilidad inmediata del etanol. La membrana basal, los componentes de la MEC y una serie de factores de crecimiento se siguieron expresando en la MA descelularizada por este método (Hopkinson et al., 2008).
- **Termolisina.** La termolisina es una MMP neutral de zinc, estable al calor, aislada desde *Bacillus stearothermophilus*. El mecanismo de acción no está muy claro pero parece similar al de la dispasa, aunque es más específica al escindir el complejo de hemidesmosomas a nivel de la integrina $\alpha 6/\beta 4$ (Hopkinson et al., 2008). El tratamiento

de la MA con 125 mg/ml durante 9 min es suficiente para mantener la membrana basal y la MEC. Simplemente con una etapa de lavado es posible eliminar las CEA sin el raspado mecánico o el cepillado con una esponja quirúrgica (Hopkinson et al., 2008). Esto mejora la integridad de la membrana basal ya que los colágenos tipo IV y VII, integrinas $\alpha 6$ y $\beta 4$, y laminina-5 se siguen expresando consistentemente después del tratamiento.

- **Dodecil sulfato de sodio (SDS).** El SDS es un detergente iónico que se une a las membranas celulares y causa la destrucción de la bicapa lipídica. El tratamiento durante 24 h a Tª ambiente seguido de la incubación con desoxirribonucleasa I (DNasa I; 50U/ml) y ribonucleasa (RNAsa; 1U/ml) durante 3 h a 37°C, asegura la eliminación del ADN residual y ARN desde la matriz (Wilshaw et al., 2006). Otros en cambio no usaron este último paso eliminando igualmente las células pero con retención del ADN en la matriz (Taghiabadi et al., 2015b). Con este método también se evita el raspado mecánico (Riau et al., 2010; Wilshaw et al., 2006).

- **Ciclos de congelación-descongelación.** Últimamente se ha probado la técnica de repetidas congelaciones-descongelaciones desde 37-(-80)°C, posterior incubación con T/E a 4°C durante toda la noche y por último raspado mecánico (Mahmoudi-Rad et al., 2013) o repetidas congelaciones-descongelaciones y digestión con DNasa I para eliminar el ADN residual (Huang et al., 2013; Ji et al., 2011). Los resultados confirmaron que este nuevo método no solamente mantiene la integridad de la estructura de la membrana basal y sustancias bioactivas en la MA sino que elimina los componentes celulares completamente (por la formación de cristales de hielo que lisan a las células) sin dejar fragmentos o células residuales. Para mejorar la fuerza mecánica y bioestabilidad, Huang et al., (2013) le añadieron a la MA 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

5. La Membrana Amniótica como fuente de células para Ingeniería Tisular

Se han llevado a cabo varias investigaciones sobre el aislamiento y caracterización de poblaciones celulares con propiedades de células madre/progenitoras a partir de la MA (Parolini et al., 2008). Estas células pueden ser epiteliales o mesenquimales según se aíslen desde el epitelio o desde las láminas mesenquimales, respectivamente (Miki et al., 2010; Murphy et al., 2010; Marongiu et al., 2010; Díaz-Prado et al., 2010a). Las células epiteliales derivan del ectodermo y las células mesenquimales derivan del mesodermo por lo tanto, tienen diferente origen embriológico. En 2007, la “International Placenta Stem Cell Society” ha unificado la nomenclatura de estas células (Lindenmair et al., 2012), denominándolas CEA y CMEA respectivamente. Ambas poblaciones son fáciles de aislar y presentan características que las hacen candidatas para su utilización en Terapia Celular.

5.1. Caracterización inmunofenotípica de las células aisladas de la Membrana Amniótica

La caracterización inmunofenotípica de las CMEA muestra la presencia de los marcadores de células madre mesenquimales (CMM) bien definidos (CD90, CD44, CD73, CD166, CD105 y CD29), descritos para la médula ósea con la ausencia de los marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45) y la falta concomitante de marcadores de monocitos (CD114), macrófagos (CD11) y marcadores de fibroblastos (Abdulrazzak et al., 2010; Insausti et al., 2010; Kobayashi et al., 2008; Mihi et al., 2009). Las CMEA también expresan bajos niveles de HLA-ABC, pero no expresan HLA-DR, indicando que pueden ser útiles en procedimientos de trasplante clínico (Parolini et al., 2009).

Las CEA son positivas para desmina y vimentina (Toda et al., 2007) y también para los mismos marcadores propios de CMM que las CMEA (Díaz-Prado et al., 2010a). Ilancheran et al., (2007) demostraron que las CEA expresan marcadores de superficie que están normalmente presentes en las CME y células germinales, tales como el antígeno embrionario específico del estadio 3 (SSEA3), SSEA4, antígeno de rechazo tumoral (TRA-1-60) y TRA-1-81 y otros antígenos tales como el miembro de la superfamilia de cassettes de unión al ATP/proteína de resistencia al cáncer de mama (ABCG2/BCRP), CD9, CD24, E-cadherina e integrina α y β (Niknejad et al., 2008; Insausti et al., 2010). Estas CEA también expresan factores de transcripción específicos para células pluripotenciales tales como la proteína de unión al octámero (Oct4), Nanog, Sox-2 (*SRY-related HMG-box gene 2*) y Rex-1 (Parolini et al., 2009; Miki et al., 2007, 2005). Las CMEA también son positivas para estos marcadores de pluripotencia (Kim et al., 2014), pero la positividad para marcadores de CME, como SSEA-3 o SSEA-4, sigue siendo debatida (Parolini et al., 2009; Bilic et al., 2008; Ueno et al., 2006). En cultivo, los fenotipos de ambas poblaciones celulares se mantienen desde el pase P0 hasta el pase P9 (Díaz-Prado et al., 2010a).

5.2. Potencial de diferenciación de las células aisladas de la Membrana Amniótica

La pluripotencia de las células derivadas de la MA la han demostrado varios científicos empezando por Tamagawa et al., (2004) siendo corroborada por estudios posteriores en donde demuestran la capacidad de estas células de diferenciarse *in vitro* hacia células de los tres linajes germinales (Insausti et al., 2010; Ilancheran et al., 2007; Miki et al., 2005).

Las CMEA presentan el fenotipo de las células progenitoras neuronales antes de cultivarlas en medio de inducción neural y la capacidad de diferenciarse hacia células similares a neuronas (linaje ectodérmico). La nestina y Musashi1 (células progenitoras neuronales) se expresan en las CMEA indiferenciadas pero su expresión se incrementa significativamente después de la inducción. Lo mismo sucede con TuJ 1, NF-medio, GFAP

Introducción

(Bilic et al., 2008; Toda et al., 2007), enolasa específica de neuronas y proteína asociada a los microtúbulos después de su cultivo en medio de inducción neural específico (Tamagawa et al., 2008; Kim et al., 2007; Portmann-Lanz et al., 2006; Sakuragawa et al., 2004).

Tamagawa et al., (2007) mostraron que las CMEA fueron capaces de diferenciarse a células con características de hepatocitos (linaje endodérmico). Las CMEA expresaron ARN hepatocítico típico, tal como el de la albúmina, K18, α -fetoproteína, 1-antitripsina y el del factor nuclear de hepatocitos (HNF-4) pero después de la inducción *in vitro* sólo expresaron el de la glucosa-6-fosfatasa, ornitina transcarbamilasa y almacenamiento de glucógeno.

En cuanto a la diferenciación de CMEA hacia el linaje mesodérmico, In't Anker et al., (2004) demostraron el potencial osteogénico y adipogénico. Después de la diferenciación osteogénica las CMEA sufrieron cambios morfológicos y mostraron depósitos de calcio cuando fueron teñidas con von Kossa. Por otro lado, después de diferenciación adipogénica, las CMEA se convirtieron en células con múltiples vacuolas que se tiñeron con Oil Red O. Posteriormente, Portmann-Lanz et al., (2006) mostraron la capacidad de diferenciación de estas células hacia los linajes condrogénicos y miogénicos. La diferenciación condrogénica la demostraron por la presencia de abundante colágeno en la MEC por medio de la tinción de azul alcian y la diferenciación miogénica la demostraron al determinar la expresión de factores de transcripción miogénicos tales como Myo D y Myogenin y la expresión proteica de desmina en las CMEA cultivadas en el medio de diferenciación. Alviano et al., (2007) confirmó estos resultados y fue el primero en demostrar el potencial de diferenciación angiogénico de estas células. Este último estudio reveló que las CMEA, después del cultivo en los medios de inducción con VEGF, expresaron marcadores endoteliales específicos tales como el receptor del VEGF, así como la aparición de CD34 y del factor von Willebrand.

En cuanto al potencial cardiomiogénico (linaje mesodérmico), las CMEA expresaron después de la inducción cardiomiogénica genes específicos cardíacos tales como GATA4, MLC-2a (cadena ligera de la miosina), MLC-2v, cTnl y cTnT (Tanaka et al., 1999; Zhao et al., 2005). Zhao et al., (2005) mostraron tras el trasplante de las CMEA en los corazones de ratas con infartos de miocardio, que estas CMEA sobrevivieron en el tejido cicatricial durante 2 meses y se diferenciaron en células similares a cardiomiocitos.

Las CEA poseen características de las células progenitoras neurales expresando algunos marcadores de diferenciación de células madre neurales, neuronas y células gliales tales como nestina, ácido glutámico descarboxilasa, GFAP y nucleótido cíclico fosfodiesterasa (Miki et al., 2005). Elwan et al., (2003) y Kakishita et al., (2000), demostraron la diferenciación de las CEA hacia células neurales con capacidad para sintetizar y liberar acetilcolina, catecolaminas y la dopamina, sugiriendo su posible utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Parolini et al., 2008).

Introducción

La diferenciación hepática de las CEA fue descrita también por Sakuragawa et al., (2000). Estos investigadores demostraron que las CEA cultivadas producían albúmina y α -fetoproteína y las identificaron integradas en el parénquima hepático de ratones con inmunodeficiencia combinada severa, tras el trasplante de CEA en el hígado. Estudios posteriores demostraron que estas CEA también muestran otras propiedades funcionales asociadas con hepatocitos, tales como almacenamiento de glucógeno y expresión de factores de transcripción enriquecidos en el hígado, como el HNF y varios genes metabolizantes de los fármacos (citocromo P450) (Miki et al., 2005; Takashima et al., 2004; Davila et al., 2004).

La diferenciación de las CEA a otro linaje endodérmico, el pancreático, también fue descrito. Wei et al., (2003) cultivaron estas CEA en presencia de nicotinamida para inducir la diferenciación pancreática y observaron la expresión de insulina.

La diferenciación de CEA a células cardíacas se evaluó por primera vez por Miki et al., (2005). Después de inducir la diferenciación de las CEA se detectó un patrón de tinción de α -actina muy similar al de los cardiomiocitos derivados de las CME, y de los factores de transcripción GATA-4 y Nkx 2.5.

La diferenciación de las CEA a otro linaje mesodérmico la describió Ilancheran et al., (2007), quienes mostraron que las CEA pueden diferenciarse en células con un fenotipo y marcadores característicos de los miocitos, osteoblastos y adipocitos.

6. La Membrana Amniótica como fuente de factores

Uno de los mecanismos propuestos de acción de la MA transplantada para facilitar la reepitelización, la reducción de la cicatriz y la inflamación (Choi et al., 2009) en pacientes con problemas en la piel es la liberación de factores de crecimiento tales como EGF, TGF- α , - β 1, - β 2 y - β 3, KGF, el receptor del KGF, HGF, el receptor del HGF, el bFGF, VEGF y PDGF (Manochantr et al., 2010), además de TIMP-1 y TIMP-2 implicadas en la curación normal de las heridas y en la respuesta inflamatoria. La cuantificación de estos factores de crecimiento utilizando el ensayo ELISA mostró unos mayores niveles en la MA en fresco en comparación con la MA descelularizada. También observaron una mayor localización de estos factores en el epitelio que en el estroma amniótico (Riau et al., 2010).

Estudios experimentales de curación de las heridas con la solución comercial de citoquinas derivadas de las células de la MA han mostrado el rápido cierre de las quemaduras y heridas crónicas en modelos animales. La proliferación, migración y diferenciación de los fibroblastos y queratinocitos se debe a la producción de los factores de crecimiento (Uberti et al., 2010). Además VEGF, angiogenina, y PDGF juegan un papel esencial en la angiogénesis (Uberti et al., 2010).

También las CEA y CMEA sintetizan y liberan factores favorables para tratar lesiones del sistema nervioso como los neurotransmisores acetilcolina, catecolaminas y dopamina (Parolini et al., 2008), pero también otras moléculas como activina y nogina (Toda et al., 2007; Sakuragawa et al., 2004). Además, el medio condicionado por las CEA

y CMEA de la MA tiene una función neurotrófica al secretar el NGF (Yang et al., 2013), neurotrofina-3 (NT-3) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Yang et al., 2013; Brohlin et al., 2009). Además, las CMEA producen varias citoquinas y factores inmunomoduladores como prostaglandina E2, IL-10, indoleamina 2,3-dioxigenasa, óxido nítrico y HLA-G (Soleymaninejadian et al., 2012).

C. EL CORDÓN UMBILICAL

1. Generalidades

El Cordón Umbilical (CU) une el feto a la madre durante el embarazo. Se desarrolla en la semana 26 de gestación a partir del mesodermo extraembrionario o embrionario (Sadler, 2004) y va creciendo progresivamente hasta formar un cordón helicoidal con un diámetro medio de 1,5 cm a término, que puede alcanzar una longitud de aproximadamente 60-65 cm de largo y un peso de aproximadamente 40 g en el nacimiento (Di Naro et al., 2001).

2. Estructura del Cordón Umbilical

El CU muestra una compartimentación tisular en el que las características celulares y elementos de la MEC difieren entre sí. Estudios estructurales y funcionales reconocen al menos seis zonas, que del exterior hacia el interior son (Figura 110):

- Epitelio umbilical (capa simple/múltiple de células epiteliales cúbicas).
- Estroma subamniótico.
- Hendiduras.
- Estroma intervascular (nombrado clásicamente como gelatina de Wharton).
- Estroma perivascular.
- Vasos (dos arterias y una vena) (Can y Karahuseyinoglu, 2007). Los vasos del CU y el mesénquima circundante (incluyendo la gelatina Wharton) derivan desde el mesodermo extraembrionario y/o mesodermo embrionario (Salehinejad et al., 2012).

La gelatina de Wharton, descrita por primera vez en 1956 por Thomas Wharton (Wharton, 1996) y que incluye las regiones perivascular, intervascular y subamniótica (Abdulrazzak et al., 2010), es una matriz de tejido conjuntivo mucoso constituido por células especializadas tipo fibroblasto y ocasionalmente mastocitos embebidos en una sustancia fundamental, compuesta principalmente de GAG. El más abundante, el ácido hialurónico, constituye el 70% de todos los GAG que encierra a los vasos umbilicales (Can y Karahuseyinoglu, 2007). El CU no tiene capilares ni vasos linfáticos.

El componente fibrilar más abundante del estroma intercelular y que construye fuertes enlaces con los GAG y PG, proporcionando al estroma una extraordinaria resistencia, son las fibras de colágeno (50% de tejido seco del CU), siendo los colágenos tipo I y III los más abundantes en la región intervascular y pared arterial, mientras que las fibras elásticas están ausentes (Sobolewski et al., 1997).

3. El Cordón Umbilical como fuente de células para Ingeniería Tisular

Hasta el momento, se han identificado hasta cuatro fuentes de células madre en el CU (Figura I10):

- Los amnioblastos (Miki et al., 2005).
- Células progenitoras hematopoyéticas de la sangre del CU (Ye et al., 1994).
- Células madre vasculares de la vena umbilical que se pueden dividir en células del subendotelio y del endotelio de la vena umbilical (HUVEC) (Han et al., 2011).
- Células madre de la gelatina de Wharton (CMMGW) (Troyer y Weiss, 2008), que son las células madre perivasculares, células madre de la zona intervascular y de la región subamniótica (Karahuseyinoglu et al, 2007).

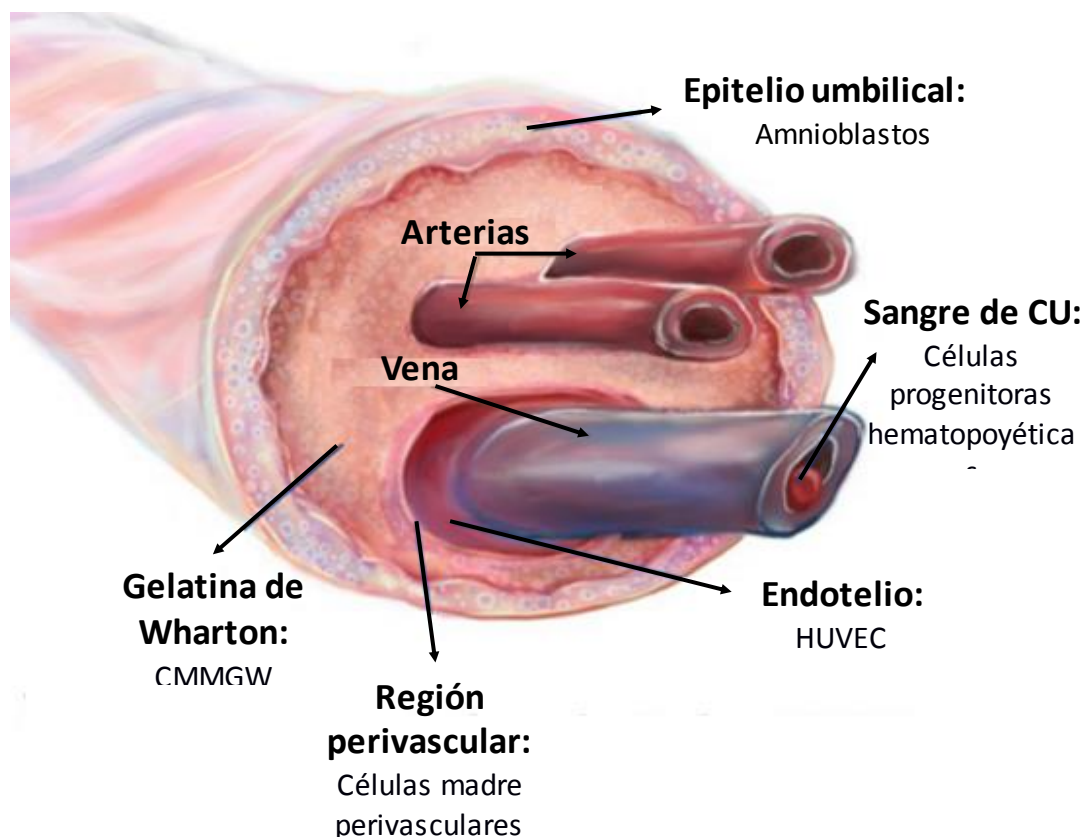


Figura I10: Estructura del CU y las células que se obtienen de él. Modificado de <https://cells4life.es/blog/sirven-las-celulas-madre-del-tejido-del-cordon-umbilical/>.

3.1. Caracterización inmunofenotípica de las células aisladas del Cordón Umbilical

Las CMMGW son la población predominante obtenida del CU, que se mantienen en una fase embriológica muy temprana y por lo tanto, todas ellas son células estromales mesenquimales primitivas (Watson et al., 2015; Petsa et al., 2009) con características de CMM adultas como las define la Sociedad Internacional de Terapia Celular: crecen como células adherentes con morfología mesenquimal, se autorenewan, expresan CD105, CD73, CD90 y carecen de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR.

A pesar de estas similitudes mencionadas, las CMMGW también presentan ciertas diferencias con respecto a las CMM adultas y similitudes con respecto a las CMM fetales como presentar una rápida proliferación y gran capacidad de expansión *ex vivo* (se pueden expandir 7-10 pases manteniendo un cariotipo estable). Esto se debe a la expresión de telomerasa (Weiss et al., 2006; Mitchell et al., 2003). Diversos autores han investigado la posible transformación tumoral de estas células, comprobándose, que a diferencia de las CME, no la sufren tras múltiples pases de cultivo *ex vivo*, ni desarrollan teratomas en animales. Además, las CMMGW son células pluripotentes que expresan Oct4, Nanog y Sox-2 (Sabapathy et al., 2014) aunque en niveles bajos en relación con las CME, y marcadores de células madre primitivas como SSEA4, TRA-1-60 y el transportador ABCG2 (Salehinejad et al., 2012).

Las CMMGW tienen efectos inmunosupresores. Experimentos *in vitro* comparando las CMM derivadas de médula ósea, CMEA y CMMGW mostraron que estas últimas secretaban más cantidad de factores inmunomoduladores tales como TGF- β 1, indoleamine 2,3-dioxigenasa, TSG6 y prostaglandina E2 cuando se exponían IL-1 β y TNF- α (Sabapathy et al., 2014). Además, expresan HLA de clase I pero no HLA de clase II (Troyer y Weiss, 2008). Por lo tanto, no deberían desencadenar una respuesta inmune de rechazo de huésped contra injerto (Weiss et al., 2006). Sin embargo, existe un trabajo que evaluó la capacidad de las CMMGW de producir una respuesta inmune cuando se inyectaron en la piel inflamada o cuando se expusieron a interferón previamente a la inyección, desencadenando la respuesta inmune (Cho et al., 2007).

3.2. Potencial de diferenciación de las células aisladas del Cordón Umbilical

Múltiples investigadores han estudiado la capacidad de diferenciación de las diferentes células madre que forman parte del CU. En particular, se ha demostrado que al igual que en el caso anteriormente mencionado de las células aisladas de la MA, las CMMGW se diferencian a células de los tres linajes germinales.

Las CMMGW expresan marcadores de células precursoras tales como nestina y pueden también ser inducidas *in vitro* hacia células con características morfológicas y bioquímicas de células neurales y células de Schwann (Kuroda et al., 2011) en un

Introducción

aproximadamente 87%, expresando marcadores propios de las células nerviosas (Anzalone et al., 2010; Fu et al., 2006b; Fu et al., 2004; Wang et al., 2004; Mitchell et al., 2003), además de que se pueden diferenciar *in vivo* en células neurales cuando se trasplantan dentro de cerebro de rata (Muñoz-Elias et al., 2004).

También se han diferenciado hacia células fotorreceptoras (linaje ectodérmico) usando un medio con taurina y β -mercaptoetanol. La diferenciación se confirmó mediante la tinción de la rodopsina (Sabapathy et al., 2014).

La diferenciación de las CMMGW hacia células β -pancreáticas lo describió entre otros Sabapathy et al., (2014) cultivando estas CMMGW en presencia de nicotinamida y β -mercaptoetanol para inducir la diferenciación hacia progenitores pancreáticos y observaron por inmunohistoquímica la expresión de insulina.

Las CMMGW tienen la habilidad de diferenciarse espontáneamente hacia células musculares lisas. Esto lo evaluaron detectando la presencia de músculos lisos vasculares confirmándolo por la tinción de α -SMA (Sabapathy et al., 2014). La diferenciación de las CMMGW hacia otras células del linaje mesodérmico también se han realizado diferenciando las CMMGW hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Sabapathy et al., 2014).

D. INGENIERIA TISULAR DE LA PIEL

Las heridas profundas o quemaduras de tercer grado causan la pérdida dramática de fluidos, pérdida del control de la T^a , desequilibrios en iones, inmunodepresión, dolor e invasión bacteriana. El tratamiento de estos pacientes requiere un rápido reemplazamiento de la piel para restablecer la barrera protectora y funcional que la epidermis diferenciada proporciona y disminuir la pérdida de agua y prevenir la infección. La dificultad en el tratamiento de estos pacientes con quemaduras extensas y profundas es el número limitado de sitios donantes disponibles para realizar un autoinjerto y la formación de una segunda herida en el sitio donante. Los aloinjertos obtenidos desde la piel de cadáver humano, los xenoinjertos desde piel de animales o las coberturas sintéticas podrían usarse para cubrir rápidamente las heridas de quemados sin tener la limitación de los autoinjertos (Hermans, 2014; Jones et al., 2013). Sin embargo, estas coberturas proporcionan protección temporal y los aloinjertos y xenoinjertos podrían ser rechazados pudiendo necesitar un tratamiento definitivo (Pouliot et al., 2002) y también poseen el riesgo de transmisión de enfermedades (Shelton et al., 1998).

Una nueva herramienta para el tratamiento de las heridas surge tras el rápido desarrollo de la Medicina Regenerativa para sintetizar sustitutos biológicos y mejorar la función de los tejidos. Se necesitan tres componentes: 1) células madre, que retienen su capacidad para autorrenovación o células diferenciadas; 2) soporte, que sirve para sostener a las células; y 3) factores de crecimiento y diferenciación (Toda et al., 2007). La Ingeniería Tisular emerge como una terapia experimental motivada principalmente por

la necesidad crítica de una cobertura permanente temprana de las lesiones por quemaduras extensas en pacientes con insuficientes zonas de piel autóloga para un autoinjerto (Oragui et al., 2011; Zhang y Fu, 2008).

1. Cultivo de láminas de epitelio

En pacientes que presentan heridas profundas con pérdida completa de la epidermis y de la dermis siempre que sea posible se realiza un autoinjerto de piel desde una zona donadora. Sin embargo, existen casos como los quemados con un 30-40% o más de la superficie corporal dañada, en donde esto no es posible ya que el problema radica en la disponibilidad de éste y la morbilidad del sitio de extracción, ocasionando una nueva herida al individuo y causando deformidades estéticas, además de infecciones (Macri y Clark, 2009).

En la década de los setenta Karasek y Charlton (1971) demostraron que los queratinocitos tratados con tripsina son capaces de crecer sobre láminas plásticas y en 1975, Rheinwald y Green describieron un sistema capaz de generar grandes superficies de epitelio estratificado mediante la proliferación y crecimiento *in vitro* de los queratinocitos, a través del uso combinado de células alimentadoras (fibroblastos murinos 3T3 irradiados) y medio de cultivo. Este procedimiento permitió expandir los queratinocitos propios del paciente aproximadamente 10.000 veces su número inicial. Así, 2 cm² de piel donante son suficientes para cubrir una superficie corporal equivalente a 2m², en 3-5 semanas (Jones et al., 2002) lo que constituye una de las bases fundamentales del interés clínico en los sustitutos epidérmicos (Velásquez et al., 2008). Estas láminas de epitelio se pueden injertar directamente en la zona donadora para acelerar y mejorar su regeneración para cosechar nuevos autoinjertos más rápido y varias veces desde el mismo sitio donante (Jones et al., 2002). Alternativamente, también se pueden utilizar en las quemaduras desbridadas, pero con una calidad de curación menos óptima, o en combinación con un autoinjerto de piel ampliamente mallado para un mejor resultado estético (Pouliot et al., 2002).

La calidad de los injertos de estas láminas de epitelio depende de la composición celular clonal, que supuestamente determina la supervivencia del injerto y el rendimiento a largo plazo cuando lo aplicamos *in vivo*. Los queratinocitos basales, que dan lugar a holoclones (colonias con elevado potencial proliferativo), son esenciales para el éxito de la supervivencia del injerto a largo plazo. Los meroclones, que consisten en células transitorias amplificadoras, tienen un potencial variable para la proliferación y pueden proporcionar solamente el cierre temporal de la herida si se aplica *in vivo* y los paraclones, forman la mayoría de la población epitelial normal pero son capaces de replicar solamente unas pocas veces antes de la diferenciación y senescencia (Shevchenko et al., 2010). Cuando se congelan estas láminas de epitelio, las células que

Introducción

la componen permanecen viables aunque la eficiencia de formación de colonias decrece sobre un 40-50% (Jones et al., 2002).

Las láminas de epitelio pueden ser también alogénicas, llegando a sobrevivir durante 30 meses después de su aplicación en pacientes. La supervivencia se debe a la ausencia de células de Langerhans detectables, linfocitos, melanocitos y células endoteliales, que podrían causar el rechazo (Jones et al., 2002). Estos injertos de láminas de epitelio (tanto auto como alogénicas) supusieron un gran avance en el tratamiento de los grandes quemados, reduciendo la mortalidad desde un 48% a un 14% (Currie et al., 2001).

Sin embargo, la aplicación de esta técnica a la clínica presenta una serie de limitaciones enumeradas a continuación. Como se ha mencionado anteriormente, en esta metodología es necesario el uso de células alimentadoras como soporte y para el crecimiento de células que son difíciles de cultivar como los queratinocitos. Se ha visto que las células alimentadoras 3T3 a través del medio condicionado promueven el crecimiento en cultivo de los queratinocitos, y producen componentes de la membrana basal como colágeno tipo IV y laminina que facilitarían la adhesión y proliferación de los queratinocitos ya que se adhieren mejor al sustrato (Alitalo et al., 1982), además de producir una serie de factores mitóticos que en su mayor parte no son bien conocidos (Velásquez et al., 2008). Debido a su rápida proliferación, para evitar la contaminación de los cultivos de queratinocitos o la respuesta inmune cuando se trasplantan al huésped, se detiene su proliferación mediante el tratamiento con mitomicina C (10 μ /ml) o por irradiación γ (6000 rads). La mitomicina es de origen animal con lo cual se estandarizó la inactivación de las células alimentadoras con la irradiación γ . Los fibroblastos humanos podrían usarse como células alimentadoras, pero es difícil detener su proliferación (Navsaria et al., 1995).

Por tanto, las células alimentadoras proporcionan un ambiente adecuado para el co-cultivo con una variedad de tipos celulares a través de diferentes mecanismos que no están claros, pero podría deberse a un mecanismo multifactorial, que incluiría la interacción célula-célula o célula-MEC, producción de factores de crecimiento solubles o citoquinas, factores antiapoptóticos y eliminación de sustancias tóxicas del medio de cultivo (Balasubramanian et al., 2008).

Sin embargo, aunque el uso de componentes animales funciona perfectamente para la propagación, mantenimiento y diferenciación de células *in vitro*, su presencia no es compatible con la posterior aplicación en humanos, por lo que es necesario acotar las condiciones para la obtención de estas líneas de grado clínico ya que recientemente se ha observado que las células que están en contacto con las células alimentadoras de ratón pueden incorporar un ácido siálico de origen no humano, el antígeno Neu5Gc considerado no apto para la terapia en humanos (Balasubramanian et al., 2008). Actualmente, la intención es intentar eliminar la utilización de estas células alimentadoras cultivando los queratinocitos en otros soportes compatibles con el uso en humanos.

Introducción

Otra limitación de esta técnica desde el punto de vista de su aplicación clínica es el medio de cultivo usado por Rheinwald y Green, (1975) para el cultivo de las láminas de epitelio, que consistió en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con suero bovino fetal (SBF) y factores como insulina (promueve la absorción de glucosa y aminoácidos); transferrina (detoxifica el hierro); hidrocortisona (promueve el anclaje de las células y proliferación celular); triiodotironina (anabólico); EGF (mitógeno para los queratinocitos) y toxina colérica (incrementa los niveles de AMPc). El suero usado suele ser SBF y su uso plantea el riesgo de contaminación xenogénica por la posibilidad de transmisión de agentes responsables de la encefalopatía espongiiforme bovina, dando lugar a complicaciones inmunológicas durante el trasplante. En humanos debido a ello no se pueden utilizar (Navsaria et al., 1995), con lo cual esta limitación abrió la búsqueda de encontrar suplementos alternativos adecuados como el suero humano, sustitutos sintéticos libres de suero animal, lisado de plaquetas humano, etc (Sabapathy et al., 2014).

Otro de los componentes que se debería eliminar es la toxina colérica ya que se trata de una exotoxina producida por *Vibrio cholerae*. La proteína consta de dos tipos de subunidades, A y B, unidas no covalentemente. La acción de la toxina comienza cuando la subunidad B se une al receptor de la membrana, el gangliósido GM1, y la subunidad A activa irreversiblemente la adenilciclase a través de la mono-ADP ribosilación de la proteína de unión a GTP, aumentando así el nivel de AMPc (Apte et al., 2013). Green, (1978) la usó con células epidérmicas humanas en cultivo, encontrando que el crecimiento colonial de las células mejoró notablemente. Estudios *in vivo* también demostraron como la toxina colérica estimuló el crecimiento de las células epidérmicas mediante su inyección intracutánea en el dorso de los ratones, ratas y hámsteres induciendo dos sucesivas divisiones mitóticas sincrónicas de los queratinocitos basales en la epidermis, con dos picos a las 24 y 48 h después de la inyección, que resultaron en hiperplasia transitoria sin interferir con la diferenciación epidérmica (Kuroki, 1981). El grosor de la epidermis interfolicular aumentó progresivamente después de la inyección, siendo mayor al día 4 y disminuyendo a la normalidad en el día 7.

Esta técnica de expansión de queratinocitos *in vitro* propuesta por Rheinwald y Green, (1975) requiere además que la lámina de epitelio esté confluyente antes de despegarla del frasco de cultivo y sólo reconstituye la epidermis (Pouliot et al., 2002). El uso de la dispasa (proteasa capaz de despegar la lámina de epitelio entera del frasco de cultivo), constituyó un importante avance técnico que convirtió en una realidad clínica el injerto de estas láminas de epitelio obtenidas mediante el cultivo de queratinocitos primarios (Jorcano, 2009). Sin embargo, se ha comprobado que el uso de dispasa provoca la alteración de la expresión de antígenos de superficie de los queratinocitos y reduce posteriormente su potencial adhesivo (Lam et al., 2002; Currie et al., 2001), lo que conlleva a una pobre tasa de prendimiento de los injertos (Mazlyzam et al., 2007), además de provocar la disminución del potencial de clonogenicidad (Pellegrini et al., 1999). Desde una perspectiva clínica, estas láminas de epitelio presentan también

dificultades relacionadas con el elevado tiempo de cultivo que se requiere durante el cual los pacientes con por ejemplo quemaduras podrían empeorar, la elevada fragilidad que estos injertos cultivados poseen en ausencia de equivalentes dérmicos, la limitada eficiencia de los injertos teniendo una pobre tasa de injerto (entre 15 al 70%) (Currie et al., 2001) y la ultraestructura anormal de la UDE, que causa la formación de ampollas y genera contracturas (Velásquez et al., 2008; Jones et al., 2002) dando lugar a unos pobres resultados estéticos y funcionales (Llames et al., 2004).

El descubrimiento de que las interacciones célula-célula (epiteliales-mesenquimales) son esenciales para la homeostasis, la organogénesis de la piel y su regeneración (Li et al., 2012), le dieron más importancia a los fibroblastos en el proceso de curación de las heridas, cambiando la dirección de la Ingeniería Tisular de la piel hacia el uso de equivalentes de piel formados por una bicapa sintetizada por queratinocitos y fibroblastos que secretan factores solubles que funcionan de una manera paracrina. Los queratinocitos secretan IL-1, TGF- β que estimulan a los fibroblastos a producir KGF, IL-6, HGF y TGF- β que regulan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos (Werner et al., 2007). Además, la interacción de queratinocito-fibroblasto también regula la transformación de los miofibroblastos (Shephard et al., 2004). La liberación de los queratinocitos y de fibroblastos en las heridas requieren un soporte que proporciona una estructura para facilitar la retención celular.

Por todo ello, se hizo evidente la necesidad de un sistema de reemplazo cutáneo más robusto y que se pareciera más a la estructura de la piel con dermis para mejorar la calidad de la epidermis, acelerar la regeneración de la piel (Compton et al., 1993) y aumentar la tasa de injerto (Kamolz et al., 2005).

2. Soporte dérmico

La mayoría de los métodos desarrollados para reconstruir una dermis dependen del cultivo de fibroblastos en un soporte para construir un tejido tridimensional (3D) (Blais et al., 2013). Los prerequisites para diseñar o escoger estos soportes son la biocompatibilidad, biodegradabilidad controlada, no toxicidad, no ser perjudicial ni carcinogénico ni tampoco producir una respuesta inmunológica y adherirse rápidamente a las heridas (Taghiabadi et al., 2015b; de la Puente et al., 2011; Shevchenko et al., 2010). Además debe tener resistencia mecánica (permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad, y plasticidad), poder ser procesada con diferentes formas y tamaños, la habilidad para regular las actividades celulares tales como la proliferación y diferenciación (Kuo et al., 2006) y la difusión de biomoduladores, tales como factores de crecimiento.

Se han desarrollado un gran número de soportes para la regeneración de la piel, sobre todo para los pacientes con pérdidas severas, en donde hay una necesidad ineludible de producción de equivalentes de piel a gran escala (Carretero et al., 2011).

Estos soportes se han fabricado con materiales naturales o sintéticos. Algunos materiales naturales, proteínas y polisacáridos, utilizados son el colágeno tipo I (Rosso et al., 2005), colágeno-alginato-celulosa (Kumar et al., 2017), ácido hialurónico (Scuderi et al., 2008), GAG, colágeno-GAG (Mazlyzam et al., 2007), elastina humana (Rnjak et al., 2009), polímeros de quitina-quitosano (Howling et al., 2001), colágeno-quitosano (Pajoum et al., 2009; Mazlyzam et al., 2007; Ma et al., 2003), alginatos, agarosa (Mehanna et al., 2015) dermis acelular, fibrina (Ramió-Lluch et al., 2017; Meana et al., 1998), plasma humano (Llames et al., 2004) o la MA (Yang et al., 2009). Entre los materiales artificiales investigados tenemos el ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polietileno tereftalato, poliortoésteres, polianhídridos y polifumaratos (Mahmoudi-Rad et al., 2013; de la Puente et al., 2011; Metcalfe y Ferguson, 2007). Los inconvenientes de los materiales naturales son la posible transferencia de patógenos, requieren técnicas de modificación y procesamiento y existe variabilidad debido a su naturaleza. Con respecto a los materiales sintéticos, requieren modificaciones superficiales para mejorar las interacciones celulares, propiedades mecánicas y de degradación, que se ven afectadas por las técnicas de procesamiento, y la degradación una vez trasplantados pueden desencadenar respuestas inflamatorias (de la Puente y Ludeña, 2014). Además, muchos de estos materiales son caros y difíciles de obtener (Pellegrini et al., 1999) y no proporcionan vascularización (Priya et al., 2008).

La mayoría de los ensayos clínicos previos con equivalentes de piel se llevaron a cabo usando como soporte el colágeno. La razón se debe a que los fibroblastos lo producen, siendo el principal componente de la MEC de la piel en el estadio final de la curación de las heridas (Hojo et al., 2003). Una alternativa, es el soporte dérmico sintetizado por la MEC secretada y ensamblada por los propios fibroblastos que la sintetizaron después de la adición de ascorbato al medio de cultivo (Pouliot et al., 2002). Los fibroblastos sintetizan así de forma natural colágeno, produciendo láminas que se pueden apilar para conseguir un equivalente dérmico más grueso antes de sembrar los queratinocitos.

3. Equivalente de piel basado en fibrina

Otro biomaterial natural que se utiliza es la fibrina, aunque como soporte el colágeno y la fibrina presentan similares efectos en la proliferación celular y viabilidad, cuando se refiere a la curación de las heridas, la fibrina presenta más ventajas porque de forma natural promueve la angiogénesis (Whelan et al., 2014).

La fibrina es una proteína hemostática biodegradable y biocompatible (Kober et al., 2015; Reinertsen et al., 2014) que actúa en el proceso de curación de las heridas formando la matriz provisional, integrándose con facilidad en el lecho de la herida simulando la piel durante las primeras etapas de la cicatrización (Arvelo et al., 2004). Proporciona un ambiente estable para los queratinocitos y fibroblastos manteniendo a las células madre como tales (Yamamoto et al., 2005; Llames et al., 2004) al atraparlas y

acelerar así la reconstrucción de la epidermis (Mazlyzam et al., 2007). También ofrece una distribución de las células y de nutrientes uniforme y un cultivo más eficiente (Mol et al., 2005) debido a la inmovilización rápida de las células y de los factores de crecimiento (Ye et al., 2000) durante la polimerización de la matriz que se asocia con elevados índices de producción de MEC (Jockenhoevel et al., 2001).

Otras ventajas que presenta es la baja inmunogenicidad, además de la fácil obtención incluso desde la sangre del propio paciente previniendo así la transmisión de enfermedades y reacciones inmunes (Reinertsen et al., 2014).

Las propiedades de la fibrina y subsecuente respuesta celular se pueden controlar al manipular las condiciones de polimerización tales como concentraciones de fibrinógeno y trombina, pH, y fuerza iónica. La alteración de los parámetros de la polimerización también afectan a las señales bioquímicas, tales como la concentración y distribución de los ligando de la MEC, citoquinas y factores de crecimiento. En conjunto con los estímulos bioquímicos, las señales físicas tales como la rigidez de la matriz, geometría de las fibrillas, la concentración de fibrina y las fuerzas transducidas también afectan al comportamiento celular (Whelan et al., 2014).

3.1. Activación de la fibrina

Para poder sintetizar la matriz de fibrina es necesario conocer los componentes que participan en su activación. La fibrina se forma a partir del fibrinógeno mediante la acción de la trombina, tras liberarse fibrinopéptidos en una reacción que depende del calcio. Esta fibrina y la fibronectina es la que se deposita inicialmente en la herida desde la circulación después de la lesión.

La fibrina es capaz de adherirse a sí misma mediante la acción del factor XIIIa (el factor XIII se activa por la acción de la trombina en una reacción dependiente de calcio) y producir un coágulo de fibrina estable (Figura I11). La deposición de la fibrina depende de las proporciones relativas de formación y destrucción. La plasmina y otros enzimas proteolíticos degradan la fibrina y fibrinógeno progresivamente en pequeños fragmentos polipeptídicos llamados productos de degradación de fibrina. Estos productos podrían inhibir la formación de fibrina por inhibición competitiva de la acción de trombina así como inhibiendo la polimerización de los monómeros de fibrina directamente. La adición aprotinina, un antiplasmina, protege al coágulo de polímeros de fibrina de la fibrinólisis prematura consiguiendo así estabilizar los polímeros de fibrina para facilitar el crecimiento de los fibroblastos que producen colágeno (Yamamoto et al., 2005).

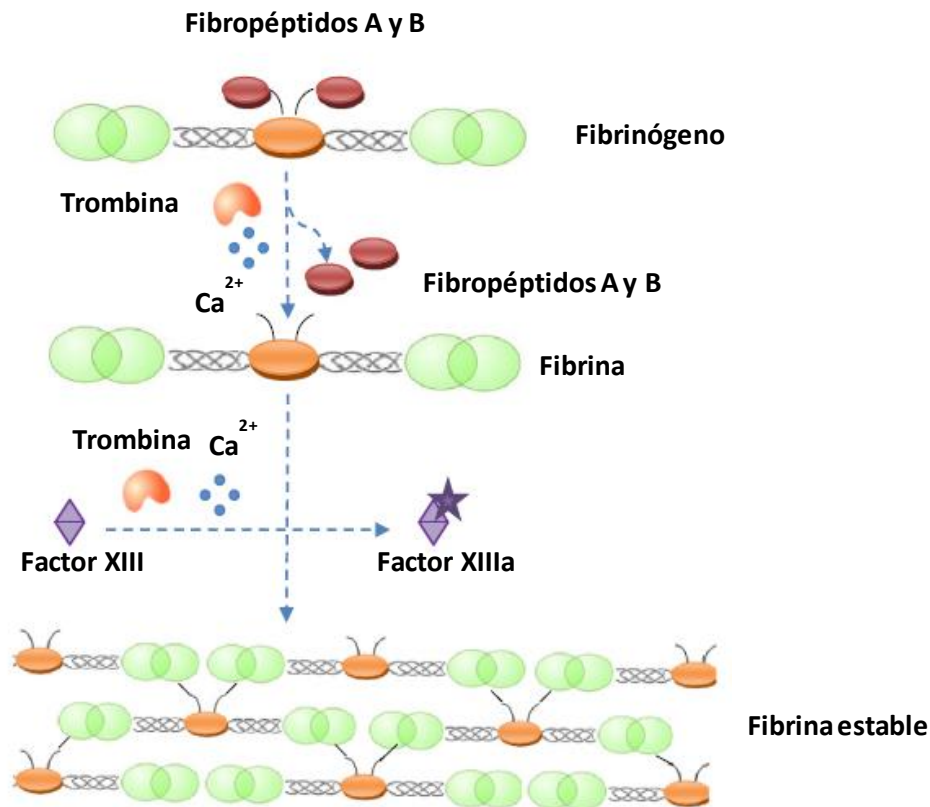


Figura I11: Formación del coágulo de fibrina. Modificado de de La Puente y Ludeña, 2014.

3.2. Fuentes de fibrina

Generalmente existen dos fuentes de fibrina humana: la fibrina comercial de los pegamentos tisulares y la fibrina obtenida a partir del plasma (Law et al., 2017).

Los problemas derivados del empleo de la fibrina comercial de los pegamentos tisulares es la necesidad de emplear múltiples unidades de crioprecipitados de fibrinógeno y fibronectina combinados con varios factores para proporcionar la superficie dérmica necesaria, con lo cual el riesgo de transmisión de enfermedades víricas aumenta [particularmente la hepatitis B y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)] (Currie et al., 2001), aunque este riesgo se reduce debido al cribado de donantes, al tratamiento de inactivación viral por calor, y el uso de detergentes para inactivar los lípidos de los virus envueltos transmitidos por la sangre en los derivados de plasma, lo que hace que estos productos sean seguros (Park et al., 2012). Los productos de un solo donante mejoran el margen de seguridad. Aunque se ha demostrado con ensayos clínicos que son productos seguros, algunas fibrinas comerciales de los pegamentos tisulares contienen aprotinina y trombina bovina existiendo un riesgo teórico de transmisión de alguna variante de la enfermedad de Creutzfeldt- Jakob desde estas fuentes.

La otra fuente de fibrina, a partir del plasma, si es autóloga se evita el riesgo de transmisión viral y son más seguras, siempre que no se utilice trombina o aprotinina exógena.

Introducción

Actualmente, la fibrina comercial de los pegamentos tisulares es la principal fuente de fibrina usada. Consiste en un conjunto de crioprecipitados de fibrinógeno y fibronectina combinados con factor XIII y aprotinina, que se añaden a la trombina y al calcio (Currie et al., 2001; Ye et al., 2000). Se sintetizan por la centrifugación de la sangre en un tubo citrado y recogiendo el plasma, que contiene el fibrinógeno en baja concentración. El incremento de esta concentración se puede llevar a cabo concentrando el fibrinógeno de un solo donante o mezclando el fibrinógeno de varios donantes hasta una concentración final de 60-115 mg/mL que se considera la adecuada (Kober et al., 2015) dando lugar a la elevada fuerza tensil y fuerte adhesión, propiedades que no son esenciales para su uso como soporte (Law et al., 2017).

Los beneficios del pegamento tisular como adhesivo se hicieron evidentes en los modelos animales cuando se roció en el lecho de la herida antes de la deposición de la lámina de epitelio comparado con el grupo control en el cual no se utilizó. Una semana después del trasplante, el porcentaje de injerto fue superior. Sin embargo, los análisis inmunohistoquímicos y ultraestructurales mostraron que la evolución de la epidermis humana cultivada después del trasplante fue similar en ambos grupos (Currie et al., 2001). Posteriormente, Ronfard et al., (1991) y Pellegrini et al., (1999) desarrollaron la técnica de cultivar láminas de epitelio autólogas de la misma forma que Rheinwald y Green, (1975) pero sobre el pegamento tisular de fibrina *in vitro*, sin observar la destrucción de la fibrina en 15 días, probablemente por el uso de aprotinina, mientras que los queratinocitos seguían crecieron hasta la confluencia y sintetizaron una membrana basal. Así, a partir de una biopsia de piel de 4,5 cm² obtuvieron 4,1 m² de equivalente de piel comparados con los 1,4 m² obtenidos cuando los cultivaron en superficies de plástico.

Una de las ventajas de estos equivalentes de piel es la eliminación del uso de dispa para despegarlos del frasco de cultivo que reduciría la expresión de antígenos de superficie de los queratinocitos y como consecuencia su potencial adhesivo, aumentando así la tasa de injerto en un 20% (Currie et al., 2001). El uso de la fibrina comercial de los pegamentos tisulares con queratinocitos, no solamente mantiene a los queratinocitos proliferativos sino que también proporciona un medio óptimo para su migración, proliferación y diferenciación, facilitando la manipulación de las láminas de epitelio que hasta entonces eran muy frágiles (Kaiser et al., 1994).

Posteriormente, el siguiente paso fue añadir fibroblastos a la matriz de fibrina. Meana et al., (1998) sintetizaron de esta forma una matriz con fibroblastos para el cultivo de los queratinocitos mejorando así su proliferación y lograron unos equivalentes de piel que una vez trasplantados en un modelo animal, injertaron adecuadamente logrando sintetizar una membrana basal ausente en otros modelos.

Recientemente, Yang et al., (2014) utilizaron una mezcla de pegamento tisular de fibrina con células madre de la médula ósea alogénicas para crear un apósito que formó rápidamente un gel sobre las heridas de los quemados. Mehanna et al., (2015) también usaron el mismo modelo pero para tratar heridas crónicas, encontrando una mejora

Introducción

significativa con respecto a la calidad funcional e histológica de los equivalentes de piel, evaluada a través de su función de barrera epidérmica así como de las propiedades mecánicas dérmicas.

El uso de plasma como fuente de fibrina representa una serie de grandes ventajas respecto a la fibrina comercial de los pegamentos. El plasma se obtiene simplemente por fraccionamiento directo de la sangre completa, siendo fácil de procesar y pudiendo ser totalmente autólogo (eliminando el riesgo de transmisión viral) (Llames et al., 2006). Además, el plasma solamente requiere la adición de calcio para coagular y formar la matriz de fibrina, mientras que la preparación de las matrices de fibrina a partir de los pegamentos tisulares es más laborioso, consume más tiempo y es más caro (aproximadamente para 5 ml el coste es de 2500 \$) (Park et al., 1999).

Esta matriz de fibrina sintetizada a partir de la fibrina del plasma, comprende una red de poros interconectados, donde el fibrinógeno es el factor más importante en cuanto a la estructura porosa. La concentración fisiológica de fibrinógeno se encuentra en torno a 1-5 mg/mL y la concentración de fibrinógeno adecuada para asegurar una buena incorporación, adherencia, y proliferación de los fibroblastos que a su vez afecta a la migración celular, proliferación y diferenciación de los queratinocitos se encuentra entre 2-3,5 mg/mL (de la Puente et al., 2011). Con este modelo, a diferencia del cultivo de láminas de epitelio por el método de Rheinwald y Green, (1975), los queratinocitos cultivados *in vitro* sobre la matriz de fibrina en un estado no confluyente y luego liberándolos en la herida puede reducir el tiempo necesario de cultivo de las láminas de epitelio. Esto tiene la ventaja de proporcionar queratinocitos que no han sufrido cambios fenotípicos asociados con la inhibición por contacto y por tanto no deberían tener disminuido el potencial adhesivo ni proliferativo. También se evita el uso de dispa. Estas láminas cultivadas pueden ser trasplantadas, manipularse y extraerse del frasco de cultivo manteniendo su integridad. También presenta otras ventajas con respecto a las anteriores como el empleo como coagulante de la trombina endógena presente en el plasma, la posibilidad de sustituir el antifibrinolítico de origen bovino por otros de origen sintético y la posibilidad de realizar una gran superficie de equivalentes dérmicos a partir de una simple y única donación a partir de un solo donante o paciente.

Este plasma no solo aporta las proteínas estructurales de la matriz sino que también contiene algunas moléculas que ayudan a la adhesión celular, tales como fibronectina (necesarias para que los fibroblastos puedan fijarse a la matriz e iniciar sus funciones fisiológicas), es un reservorio para factores de crecimiento, plaquetas, citoquinas y enzimas, que pueden promover la proliferación de los fibroblastos y queratinocitos, estimular y acelerar la curación del tejido e incluso la adipogénesis (Kober et al., 2015).

También se ha demostrado que aunque tanto el soporte de colágeno como el de fibrina proporcionan similares ambientes en los cuales los queratinocitos y fibroblastos pueden proliferar *in vitro*, la concentración de VEGF en el medio de cultivo en la matriz de fibrina es significativamente mayor que el soporte de colágeno. Este incremento de

VEGF no se debe al mayor número de células, sino a que los productos de degradación de la fibrina, componentes clave del coágulo, intrínsecamente estimulan la actividad angiogénica induciendo la secreción de este factor (Whelan et al., 2014; Feng et al., 2013; Huang et al., 2005) por las células. Esto es importante ya que la angiogénesis proporciona factores tróficos e incluso ayuda a la regeneración del sistema nervioso (Hojo et al., 2003).

Con el trasplante del equivalente de piel basado en la matriz de fibrina en humanos, éste mostró una excelente adhesión al lecho de la herida y proporcionó un soporte para la proliferación de la lámina de epitelio con la emergencia de células endoteliales vasculares en el trasplante después de tres días. Además la infiltración de células inflamatorias fueron bajas cuando lo compararon con la matriz de colágeno (Hojo et al., 2003).

4. Equivalente de piel basado en la Membrana Amniótica

La MA por si sola puede proporcionar una excelente cobertura temporal para las quemaduras mientras se preparan los injertos de piel o cuando hay un suministro limitado de injertos de piel (Mahmoudi-Rad et al., 2013).

En 1910, Davis fue el primero en introducir el uso de MA en fresco como un injerto de piel, y poco después, se utilizó la MA como una cobertura permanente para quemados, aunque se suspendió este uso debido a la posible presencia de infecciones (Sabella, 1913). Posteriormente, se empezaron a relizar estudios para examinar la seguridad microbiológica de su uso. Por ejemplo, la posibilidad de la criopreservación de las MA, permitió realizar la serología y estudios microbiológicos convenientes antes de su uso. Del mismo modo, las MA esterilizadas por radiación demostraron estar libres de contaminación microbiana en el tratamiento de quemaduras de segundo grado. Para optimizar el efecto antibacteriano, las MA impregnadas con plata demostraron mayor efecto curativo biológico que las no tratadas (Singh et al., 2008).

Actualmente, el uso de solamente la MA en pacientes con quemaduras extensas, si son superficiales o de grosor parcial, es un éxito, por ser un método seguro, fácil de usar y extremadamente beneficioso al permitir la rápida reepitelización (Ramakrishnan y Jayaraman, 1997). Sin embargo, cuando su uso es para el tratamiento de quemaduras profundas, el éxito es menor, ya que las MA experimentan autólisis y desintegración (Nordback et al., 2012; Maral et al., 1999).

En relación al dolor, Ley-Chavez et al., (2003) lo evaluaron en pacientes con quemaduras antes y después de la aplicación de MA, y observaron que el 100% de los pacientes presentaron una drástica reducción del dolor de 8-10 a 0-2 en una escala de 10 puntos (Lo y Pope, 2009).

Yan et al., (2004) investigaron como el injerto de la MA con células madre juega un papel efectivo en la curación de las heridas. Fu et al., (2006a) mantienen que las CMM autólogas pueden mejorar la calidad de la curación de las heridas y generar la piel

intacta *de novo*, resultando en una excelente regeneración de la piel después de una herida profunda (Kim et al., 2009).

La factibilidad, tolerancia y efectos beneficiosos de la MA criopreservada para el trasplante en humanos con úlceras en las piernas también ha sido demostrada por Tazuin et al., (2014), que crearon un modelo de piel basado en la MA desepitelizada y sembraron sobre ella solamente queratinocitos cultivándolo 21 días en interfase aire-líquido con medio de cultivo con toxina colérica y SBF.

E. INGENIERIA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO DE LA PIEL

1. Generalidades

La epidermis, además de funcionar como barrera física entre el organismo y su entorno externo, es una estructura metabólicamente activa que desempeña un papel fundamental en la homeostasis corporal, en particular debido a sus funciones neuroendocrinas, inmunes y sensoriales (Slominski y Wortsman, 2000; Rice et al., 1998).

La piel se encuentra densamente inervada con diferentes tipos de terminaciones nerviosas, que discriminan entre dolor, T^a y sentido del tacto. Cuando se produce una quemadura profunda, los nervios cutáneos y sus corpúsculos sensoriales son destruidos mientras que los cuerpos de células neuronales sensoriales persisten en el ganglio de la raíz dorsal a lo largo de la médula espinal (Ulmann et al., 2007).

Después de una quemadura profunda, la regeneración nerviosa cutánea ocurre por la migración de nuevas fibras nerviosas del lecho de la herida o desde fibras nerviosas de áreas adyacentes no lesionadas. Sin embargo, este proceso de regeneración nerviosa es imperfecto, y además, se ve afectado por la remodelación anárquica de la MEC de la dermis durante la cicatrización de las heridas. El 71% de las víctimas de quemados sufren sensaciones anormales y el 36% dolor crónico (Malenfant et al., 1996), sufriendo a menudo déficits sensoriales permanentes (Hermanson et al., 1986). Entre las posibles causas de esta sensibilidad anormal se encuentra la falta de fibras nerviosas, una reinervación en su mayoría de fibras A δ y C con un déficit en fibras A β , y la falta de unidades sensoriales como los corpúsculos sensoriales y folículos pilosos, incluso puede haber cambios en el procesamiento de la información por el SNC. La hipersensibilidad, incluso en las partes no quemadas del cuerpo, sugiere que los cambios en el procesamiento de la información sensorial por el SNC puede contribuir hasta cierto punto a la sensibilidad anormal (Blais et al., 2013).

La MEC es un factor clave en la regeneración axonal después de una lesión nerviosa. La interacción de un axón que se extiende en un microambiente permisivo puede aumentar la velocidad de alargamiento y grado de ramificación. Se acepta generalmente que la regeneración del SNC no ocurre fácilmente debido en parte al entorno de crecimiento no permisivo y la falta de factores de crecimiento adecuados a diferencia de la regeneración en el sistema nervioso periférico (SNP) que se produce con

más facilidad. En un estudio de David y Aguayo, (1981) destacaron la importancia de la MEC indicando que una neurona del SNC se podría regenerar cuando se coloca en un entorno similar al SNP. La laminina es el componente más abundante de la MEC periférica, se sobrerregula después de la lesión del nervio periférico (Wallquist et al., 2002) y parece desempeñar un papel crítico en la regeneración nerviosa periférica (Höke, 2006). Otro factor clave involucrado en la óptima regeneración axonal es el apoyo trófico proporcionado por las neurotrofinas (Rankin et al., 2008).

En este sentido se demostró que la regeneración del nervio se puede mejorar añadiendo laminina a los equivalentes de piel. De esta forma, cuatro meses después del trasplante de un equivalente de piel construido con una esponja de colágeno con laminina en un modelo animal, los injertos enriquecidos con laminina con respecto al control contuvieron siete veces más fibras nerviosas positivas para el NF medio con una mejora significativa del umbral de percepción de las fibras nerviosas A β y A δ . Además, aunque se encontraron un mayor número de fibras nerviosas, éstas no indujeron hiperestesia (Caissie et al., 2006).

Por lo tanto, la adición de laminina en el equivalente de piel promueve una mejora significativa en la regeneración de las fibras nerviosas. Esta mejora es interesante debido al déficit de estas fibras en quemaduras profundas y extensas (Ward et al., 2004).

2. Uso de la Membrana Amniótica como soporte

Por todo lo anterior la MA podría ser un buen soporte para la Ingeniería Tisular del sistema nervioso porque su membrana basal contiene laminina. Esta MA puede ser usada como sustrato para la regeneración de axones neuronales tanto en el SNC como en el SNP.

Existen numerosos estudios que analizaron el lado de la MA por el cual las células nerviosas crecen mejor. Las neuronas motoras embrionarias de pollo crecen y las neuritas se expanden extensivamente solamente sobre la membrana basal de la MA después de eliminar el epitelio. Varias proteínas purificadas, incluyendo colágenos, fibronectina, y laminina, promueven la adhesión *in vitro* de células neurales estimulando la elongación axonal desde neuronas del SNC y SNP, siendo la laminina, como hemos dicho antes, la más potente (Davis et al., 1987). Quizás la actividad más potente de la laminina descrita hasta ahora es su capacidad para inducir y promover el crecimiento de neuritas en neuronas cultivadas del SNC y SNP. Los otros componentes de la MEC, como la fibronectina y los diferentes tipos de colágeno muestran que son capaces de promover el crecimiento de las neuritas, pero su actividad varía con los diferentes tipos y tiende a ser más baja que la laminina (Engvall et al., 1986)

El uso de MA proporciona por tanto un ambiente adecuado para la regeneración de neuronas, previniendo la formación de cicatrices gliales, evitando atrofias o la

muerte de neuronas axotomizadas y promoviendo la germinación de neuronas (Wu y Hui, 2006).

3. Fuentes de células utilizadas

Para conseguir un equivalente de piel inervado mediante Ingeniería Tisular necesitamos células nerviosas. Se ha demostrado *in vitro* que las células madre neurales inmaduras y no comprometidas, que existen tanto en el cerebro en desarrollo como en el sistema nervioso adulto pueden someterse a la expansión y diferenciación hacia neuronas, astrocitos, y oligodendrocitos. Sin embargo, son raras en el SNC, requieren de procedimientos invasivos para obtenerlas, y tienen un potencial proliferativo limitado en cultivo (Mitchell et al., 2003).

Otra fuente son las células de Schwann, después de la lesión de los nervios empiezan a proliferar desde la parte distal y son una rica fuente de neurotrofinas y citoquinas que asisten a la regeneración axonal. Cuando los nervios son denervados, la infusión de células de Schwann promueve la regeneración y remielinización de los nervios periféricos. Sin embargo, estas células se obtienen a partir de biopsias de nervios y por tanto es una técnica invasiva. Además de su limitada capacidad de expansión *in vitro* (Walsh et al., 2010; Nishiura et al., 2004).

Como alternativa, se ha analizado la utilización de de las células madre adultas procedentes de otros tejidos que se han identificado en la mayoría de los tejidos y órganos (Mehanna et al., 2015) y que juegan un importante papel en la normal homeostasis y reparación del cuerpo. Estas células presentan la ventaja de que se pueden obtener desde el propio paciente y por lo tanto son inmunológicamente compatibles con éste, sin embargo, son difíciles de aislar y cultivar y por otra parte, para el trasplante de un número suficiente de células se necesita un suministro celular a gran escala.

Otra fuente son las CMM derivadas de la médula ósea que han sido consideradas candidatas para Terapia Celular por su gran capacidad de expansión *in vitro* y por su elevado potencial de diferenciación (Mehanna et al., 2015). Sin embargo, aunque son fácilmente obtenidas usando una simple aspiración de la médula ósea, este procedimiento es altamente invasivo (Manochantr et al., 2010) y las células madre disminuyen con la edad (Zhang et al., 2012b). Además de que cuando se trasplantan se organizan en multiláminas y se pierden rápido en el huésped (Liang et al., 2009).

En contraste, las CME proliferan muy rápido en cultivo y se diferencian hacia todos los tejidos, como el tejido nervioso, pero presentan el riesgo de formación de tumores una vez trasplantadas y por otra parte presentan problemas éticos y morales (Kim et al., 2014).

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son células madre pluripotentes, que se inducen artificialmente al introducir una serie de factores de transcripción en

Introducción

células somáticas y así conseguir la reprogramación a células nerviosas tanto *in vitro* e *in vivo*. Estas células no producen rechazo inmune al poder extraerse del mismo paciente. Sin embargo, al usar vectores virales para la transfección, la integración de estos en el genoma huésped podría incrementar el riesgo de formación de teratomas (Kim et al., 2014).

Por lo tanto, se necesitan nuevas fuentes de células madre que solventen los problemas de las fuentes anteriormente comentadas. Una posible alternativa para clínica, son las dos principales poblaciones de células madre/progenitoras que pueden ser obtenidas de la MA humana: las CEA y las CMEA (Miki et al., 2010; Diaz-Prado et al., 2010a) y las células madre procedentes del CU especialmente las CMMGW que como hemos dicho antes muestran características similares a las CMM (Cardoso et al., 2012; Ma et al., 2005). Tanto la MA como el CU son abundantes, se obtienen fácilmente, evitando problemas éticos o morales ya que se descartan normalmente y el procedimiento de recogida no es invasivo ni causa dolor (Liu et al., 2012; Niknejad et al., 2010).

Los tres tipos celulares presentan una serie de ventajas que las hacen adecuadas para Terapia Celular y Medicina Regenerativa (Insausti et al., 2010): presentan características de células madre (Ma et al., 2005) tales como como la habilidad de autorenovación, elevado potencial de proliferación (Mitchell et al., 2003) y pluripotencialidad diferenciándose a los tres linajes germinales *in vitro* (Garzón et al., 2012; Han et al., 2011; Dominici et al., 2006); muestran baja inmunogenicidad (Choi et al., 2013; Liu et al., 2012) y propiedades antiinflamatorias (Díaz-Prado et al., 2010a), no requieren el sacrificio de embriones humanos para su obtención (Insausti et al., 2010) y a diferencia de las CME no forman teratomas aunque expresan marcadores y son clonogénicas como éstas. Además, son fáciles de aislar y expandir (Diaz-Prado et al., 2010a). Se cultivan fácilmente, se aíslan con elevada pureza y se pueden diferenciar en células nerviosas *in vitro* cuando se cultivan en un medio de cultivo de inducción neural definido (Castillo-Melendez et al., 2013; Mitchell et al., 2003; Ma et al., 2005), adquiriendo la morfología propia de células nerviosas y sobreexpresan genes específicos neurales (Marcus et al., 2008; Tamagawa et al., 2008). Por lo tanto, se usan comúnmente en Ingeniería Tisular del tejido nervioso promoviendo la recuperación funcional después de lesiones agudas de la médula espinal y la regeneración de nervios periféricos (Li et al., 2013; Wu et al., 2006).

II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Justificación e hipótesis

El tratamiento clínico de los grandes quemados ha experimentado un desarrollo importante en los últimos años. Con la descripción del cultivo *in vitro* de láminas de queratinocitos en 1975 (Rheinwald et al., 1975) se puso de manifiesto la posibilidad de conseguir grandes proporciones de láminas de epitelio autólogas partiendo de una mínima biopsia de piel sana. Sin embargo, la experiencia clínica en el trasplante de estas láminas pusieron de manifiesto sus limitaciones como el largo tiempo necesario para la expansión *in vitro*, fragilidad mecánica durante el trasplante, baja tasa de prendimiento, formación de ampollas, contracturas y cicatrices.

Ante estos problemas y la necesidad de dotar a las láminas de queratinocitos, no solamente de un soporte físico que les confiera solidez, sino de un tejido subyacente vivo, en el que se incluyan fibroblastos que permitan el mejor crecimiento y diferenciación de los queratinocitos, no basta sólo con la reposición de la epidermis, sino que también es necesario reponer la dermis dañada. Esta dermis proporcionaría una mejor tasa de injerto, cierre más rápido la herida y mejores resultados cosméticos.

Emerge así la Ingeniería Tisular de la piel motivada principalmente por la necesidad crítica de cubrir permanentemente las extensas lesiones en quemados con insuficiente fuente de piel autóloga para un autoinjerto.

Como soporte se han utilizado una gran variedad de biomateriales. Sin embargo, algunos de estos materiales son caros, difíciles de obtener o son fuente de infecciones, además de fracasar en la vascularización (Pellegrini et al., 1999).

Nosotros queremos evaluar el plasma humano para sintetizar un soporte ya que contiene fibrina que es el componente de la matriz provisional de la herida y hace que las células cultivadas sobre esta matriz secreten VEGF promoviendo la angiogénesis, pudiendo solucionar de esta manera la ausencia de vascularización de los otros equivalentes sintetizados con otros biomateriales, en la que la circulación se restablece a los 10-15 días. Además el plasma se puede obtener del propio paciente con lo cual el equivalente de piel no sería rechazado una vez trasplantado.

Últimamente se está investigando a la MA como soporte en Ingeniería Tisular ya que es un biomaterial que se obtiene fácilmente, procedente de las placentas que se descartan después de las cesáreas. Terapéuticamente desde hace tiempo se usa como cobertura temporal y para cubrir los sitios donantes de piel en quemados por todas las propiedades que se han descrito. Por eso, también quisimos analizar su potencial como soporte para la creación de un equivalente de piel y de tejido nervioso.

Una de las mejoras en los equivalentes de piel además de la vascularización anteriormente comentada sería restablecer la funcionalidad de las terminaciones nerviosas y de la pigmentación. Investigaciones previas han descubierto que la asociación de los melanocitos con las terminaciones nerviosas periféricas causa la

Justificación e hipótesis

estimulación de su actividad es decir, estimulan la melanogénesis o la regeneración melanocítica. Además, las células endoteliales y musculares lisas responden a la modulación neuronal durante el proceso de neovascularización y curación de heridas. En los grandes quemados o heridas profundas las terminaciones nerviosas también se dañan y no se regeneran perdiendo la sensibilidad. Por lo tanto, el restablecimiento de las terminaciones nerviosas en estos pacientes debería mejorar la melanogénesis y la angiogénesis.

Para restablecer el tejido nervioso dañado se utilizan varios tipos celulares, pero todos ellos presentan una serie de inconvenientes como las células madre neurales que son escasas, requieren un procedimiento invasivo para obtenerlas y tienen un potencial limitado de proliferación en cultivo (Mitchell et al., 2003). Una posible fuente de células que podrían solventar estas limitaciones son las CEA y las CMEA obtenidas desde la MA y las CMMGW del CU. Todas ellas son fáciles de aislar y presentan características que las hacen buenas candidatas en Ingeniería Tisular.

La MA también ha sido utilizada como soporte en Ingeniería Tisular del sistema nervioso para el cultivo de neuronas sobre la membrana basal ya que la laminina y fibronectina que contiene promueven la adhesión *in vitro* y estimulan la elongación axonal de neuronas del SNC y SNP.

Ningún estudio hasta la fecha ha creado un equivalente de tejido nervioso utilizando la MA como soporte y estas fuentes de células diferenciadas hacia células similares a células nerviosas que posteriormente en un futuro se pudiera añadir al equivalente de piel y conseguir inervarlo.

Es por todo esto que para desarrollar este trabajo se han planteado las siguientes hipótesis:

1.- El plasma humano es una fuente alternativa de fibrina para la síntesis de un equivalente de piel.

2.- La MA es un buen soporte para la adhesión, fijación y proliferación de fibroblastos y queratinocitos para la síntesis de un equivalente de piel y de las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas hacia células nerviosas para la síntesis de un equivalente de tejido nervioso manteniendo su morfología.

3.- La MA y CU humanos son dos fuentes de células (CMEA, CEA y CMMGW) de gran utilidad en la Medicina Regenerativa, para tratar las lesiones del tejido nervioso.

III. OBJETIVOS

Objetivos principales:

1. Analizar la capacidad del plasma o MA humana como soporte para generar un equivalente de piel para reparar las heridas.
2. Analizar el potencial de la MA y CU como fuente de células para generar un equivalente de tejido nervioso usando la MA como soporte.

Objetivos secundarios:

1. Sintetizar un equivalente de piel humana utilizando como fuentes de células los queratinocitos y los fibroblastos y como soporte plasma humano. Este objetivo se desarrollará en dos partes: a) Obtención y caracterización *in vitro* del equivalente de piel, y b) Desarrollo de un modelo *in vivo* en ratón para analizar la posible aplicación terapéutica del equivalente obtenido.
2. Optimizar el método de obtención y preparación de MA para su utilización como soporte en Ingeniería Tisular aplicada a piel o regeneración nerviosa.
3. Sintetizar un equivalente de piel humana utilizando como fuentes de células los queratinocitos y los fibroblastos y como soporte la MA.
4. Valorar la posible utilización de células madre de la MA o del CU como fuente de células para la regeneración nerviosa.
5. Sintetizar un equivalente de tejido nervioso utilizando como fuentes de células las células madre de MA o CU diferenciadas a células nerviosas y como soporte la MA.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

A. OBTENCIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS

1. Obtención y procesamiento de las biopsias de piel

1.1 Obtención de las biopsias de piel humana

Las biopsias de piel (que incluían epidermis, dermis y tejido adiposo) se obtuvieron de pacientes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña de dos fuentes diferentes: a) pacientes de la Unidad de Quemados (n=44, tamaño de la biopsia entre 2-4 cm²) y b) pacientes que sufrieron amputaciones de miembros inferiores procedentes del Servicio de Autopsias (n=10, tamaño de la biopsia entre 3-5 cm²). Las muestras se trasladaron a la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos en un frasco estéril con DMEM (Gibco, España) suplementado con 1% de solución antibiótica antimicótica [penicilina (P) 10 U/ml, estreptomycin (E) 10 mg/ml y anfotericina B 25 µg/ml (Sigma-Aldrich Química S.A., España)] y se dejaron a 4°C durante 2-4 h hasta el momento de su procesamiento.

Algunos fragmentos de las biopsias de piel (n=3) se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricrómico de Masson y hematoxilina de Verhoeff) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de citoqueratinas (CK) epiteliales (-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10,-13,-14,-15,-16 y -19), K14, K10, involucrina, vimentina, laminina, melan-A, tirosinasa y S100), y otros se congelaron en *Optimal Cutting Temperature* (OCTTM Compound; Tissue-Tek, EEUU) para los análisis de inmunofluorescencia (determinación antigénica de vimentina).

1.2. Aislamiento y cultivo primario de los fibroblastos (Figura M1)

Antes de procesar la biopsia de piel, se retiró el medio de transporte y en condiciones de esterilidad, se lavó con tampón fosfato salino (PBS; Gibco, España) en el mismo frasco. Posteriormente, se traspasó la biopsia a una placa de Petri y con la ayuda de unas tijeras se eliminó el tejido graso subcutáneo hasta dejar expuesta la capa de dermis. Se lavó nuevamente y se pasó a otra placa de Petri para proceder a su fragmentación mecánica con unas tijeras y/o bisturí con el fin de obtener pequeños fragmentos de piel que se pasaron a un frasco con agitador magnético.

Para aislar los fibroblastos de las biopsias de piel, se añadió una solución enzimática de colagenasa clostridial tipo I (2 mg/ml; Sigma-Aldrich Química S.A., España) en DMEM (aproximadamente 40 ml) al frasco con los fragmentos de piel y se dejó en agitación a 37°C durante 3 h con un agitador magnético. Tras esta digestión se retiró el medio y se traspasó a un tubo cónico (Falcon, España), procurando no arrastrar los fragmentos de piel y se neutralizó con la misma cantidad de medio de inactivación (MI) compuesto por DMEM con un 10% de SBF (Gibco, España) y 1% de solución antibiótica antimicótica. Se centrifugó a 300xg durante 10 min. El precipitado

Material y métodos

celular donde se encontraban los fibroblastos se resuspendió en 5 ml de medio de fibroblastos (MF) compuesto por DMEM con un 10% de SBF y 1% de P (5 U /ml)/ E (5 µg/ml) (Gibco, España) y el número de células viables se determinó mediante el conteo con una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) utilizando el colorante vital azul tripán (1:20; Sigma-Aldrich Química S.A., España).

Para el cultivo primario de los fibroblastos, se sembraron 2×10^6 fibroblastos en un frasco de cultivo de 25 cm² (Greiner Bio-One, Alemania) con 10 ml de MF. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cada 2-3 días se les cambió el medio.

Cuando los fibroblastos alcanzaron un 70-80% de confluencia, se subcultivaron. Para ello, se retiró el MF y se lavaron con PBS. Se tripsinizaron con 1% de T/E (0,5 g T-0,2 g E) en PBS cubriendo la superficie del frasco de cultivo incubando a 37°C durante 5 min hasta que las células se despegaron. Una vez despegadas del frasco de cultivo y tras comprobar con un microscopio invertido de contraste de fases IX51 (Olympus España S.A., España) que las células se encontraban en suspensión, se recogió la suspensión celular del frasco de cultivo, se transfirió a un tubo cónico y se inactivó la T/E con el MI para realizar una centrifugación a 300xg durante 10 min. El precipitado celular se resuspendió en MF y se sembró en una superficie 5 veces mayor que la inicial con el objetivo de disponer así de un número suficiente de fibroblastos que se usaron en pase 1 o 2 para crear los equivalentes de piel.

1.3. Aislamiento y cultivo primario de queratinocitos (Figura M1)

1.3.1. Cultivo de fibroblastos murinos 3T3

La línea celular 3T3 (*European of Animal Cell Cultures* número 85022108) son fibroblastos murinos que se utilizan como células alimentadoras para el cultivo de los queratinocitos. Se utilizaron células criopreservadas de la línea original que se descongelaron por inmersión en un baño a 37°C y se centrifugaron a 300xg durante 10 min. El precipitado celular se resuspendió en 15 ml de MF y se cultivó en un frasco de cultivo de 75 cm². Cuando los frascos llegaron a la confluencia se tripsinizaron con 1% de T/E y se subcultivaron en una superficie 5 veces mayor a la inicial hasta que se consiguió el número de células suficiente. Para su utilización, fue necesario irradiarlas (para inactivar su proliferación) para lo cual se tripsinizaron y los precipitados celulares se resuspendieron en MF y se traspasaron a un frasco de cultivo de 25 cm² que se llevó al Servicio de Radioterapia del Hospital Oncológico de A Coruña, donde se les dió una dosis de 6000 rad durante 10 min con una bomba de cobalto.

Una vez las células fueron irradiadas, se recogió el medio y se traspasó a un tubo cónico para centrifugar a 300xg durante 10 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado celular se resuspendió en 20 ml de medio de cultivo para queratinocitos (MQ) compuesto por DMEM y Ham-F12 (Gibco, España) en una proporción 3:1 (V:V),

Material y métodos

suplementado con 10% de SBF, insulina (5 $\mu\text{l/ml}$), hidrocortisona (0,4 $\mu\text{l/ml}$), triyodotironina (1,3 ng/ml), adenina (24 $\mu\text{l/ml}$) y 1% de P/E (todos de Sigma-Aldrich Química S.A., España). Tras lo cual, se contaron y se sembraron $5-6 \times 10^6$ 3T3 en tantos frascos de 25 cm^2 como fueron necesarios para sembrar sobre ellos los queratinocitos obtenidos de la biopsia de piel.

1.3.2. Aislamiento y cultivo de queratinocitos

Tras la obtención de los fibroblastos de las biopsias de piel con la primera digestión, se procedió con una segunda digestión de los restos de piel para obtener los queratinocitos. Para ello, se añadió unos 40 ml de 1% de T/E en solución salina balanceada de Hanks con rojo fenol (Sigma-Aldrich Química S.A., España) al frasco con los restos de piel y se dejó en agitación a 37°C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se recogió la T/E en un tubo cónico y se neutralizó con igual cantidad de MI. Se añadió nueva T/E (40 ml) para continuar con una segunda digestión de los restos de piel. Se realizaron tantas digestiones como fueron necesarias hasta no obtener más células. Finalizadas las digestiones se juntaron todos los tubos con las células, se centrifugaron a 300xg durante 10 min y se procedió al conteo del número total de queratinocitos obtenidos, que se resuspendieron en MQ.

Para el cultivo primario de los queratinocitos, se prepararon frascos de cultivo de 25 cm^2 con una monocapa de 3T3 irradiadas y se añadieron 2×10^6 queratinocitos en 10 ml de MQ. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO_2 . El medio se cambió cada 2-3 días. Transcurridas 48 h se le añadió EGF (10 ng/ml; Austral Biologicals, España) al nuevo MQ. Cuando los cultivos llegaron al 70-80% de confluencia se subcultivaron en una superficie 5 veces mayor a la inicial, hasta el pase 1 o 2 los cuales se utilizaron para los equivalentes de piel.

En algunos casos ($n=5$) para comparar la proliferación de los queratinocitos con diferentes medios de cultivo, al MQ también se le añadió toxina colérica (10^{-10} M; Sigma-Aldrich Química S.A., España), y en otros se utilizaron los medios de queratinocitos comerciales 07 y 57 *EpiGRO*TM (Millipore, España) y se realizaron los contajes de las células adheridas al frasco de cultivo a los 4, 6 y 10 días.

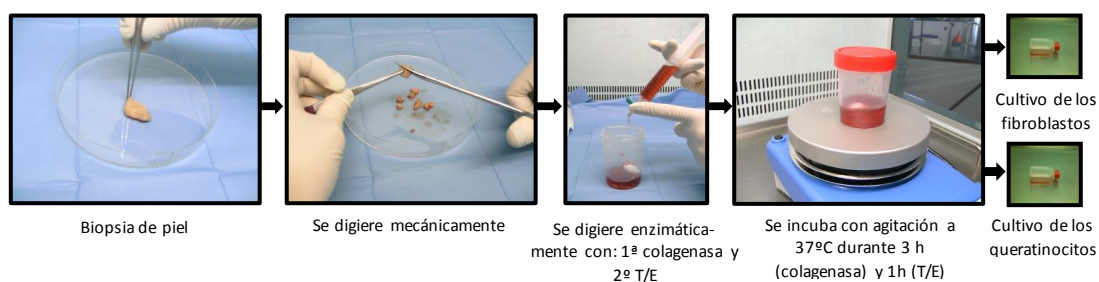


Figura M1: Proceso de aislamiento de los fibroblastos y queratinocitos a partir de las biopsias de piel.

2. Obtención y procesamiento de las Membranas Amnióticas

2.1. Obtención de las Membranas Amnióticas

Las placentas (n=29) se obtuvieron en el Hospital Materno Infantil Teresa Herrera de A Coruña (España) a partir de cesáreas programadas (para prevenir la posible contaminación durante el parto vaginal normal) seleccionando aquellas donantes que fueron negativas para VIH, hepatitis B y C y sífilis, evitando así el riesgo de transmisión de enfermedades. Las placentas se trasladaron a la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos en un frasco estéril con medio de transporte que consistió en medio 199 (Invitrogen, España) con los siguientes antibióticos: cotrimoxazol (50 µg/ml; Soltrim®; Almirall-Prodesfarma S.A., España), vancomicina (50 µg/ml; Vancomicina Hospira®; Laboratorio Hospira S.L., España), amikacina (50 µg/ml; Amikacina Normon®; Laboratorios Normon S.A., España) y anfotericina B (5 µg/ml; Fungizona®; Bristol-Myers Squibb S. L., España).

En una campana de flujo laminar, bajo condiciones de esterilidad, se separó la MA del corion y éste último se descartó. La MA se lavó 3 veces con cloruro sódico al 0,9% (NaCl; Sigma-Aldrich Química S.A., España) para eliminar los coágulos sanguíneos y el mucus. A partir de aquí las MA se utilizaron con dos fines y de acuerdo a ello se procesaron de forma diferente. Si se utilizaban como fuente de células se procesaban el mismo día en fresco y si se utilizaban como soporte se criopreservaban.

Un fragmento de la MA con y sin corion (n=3) se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricrómico de Masson y safranina O) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de vimentina y CK) y en el caso de la MA sin corion también se cogió otro fragmento que se congeló en OCT™ para los análisis de inmunofluorescencia (determinación antigénica de vimentina y CK).

2.2. Aislamiento y cultivo de las células derivadas de la Membrana Amniótica (Figura M2)

A partir de las MA (n=20) se aislaron dos tipos celulares, las CMEA y las CEA. Para ello, las MA se procesaron siguiendo el protocolo de Soncini et al., (2007). Se cortaron las MA en fragmentos pequeños de aproximadamente 2x2 cm² y se digirieron con una solución enzimática de dispasa (2,4 U/ml; Gibco, España) en PBS y se incubaron 37°C durante 7 min. El tejido digerido se centrifugó a 300xg durante 5 min y el sobrenadante se descartó. Una vez obtenido el precipitado celular de MA, se realizó una segunda digestión enzimática con colagenasa clostridial tipo I (0,75 mg/ml) y DNasa I (20 µg/ml; Sigma-Aldrich, USA) en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, España) a 37°C durante 3 h. La suspensión celular resultante se filtró a través de un filtro estéril de 70 µm (BD Biosciences, España) y se centrifugó a 300xg durante 10 min obteniendo en el precipitado celular las CMEA. Los fragmentos de MA no digeridos se incubaron

Material y métodos

con una solución de T/E al 0,25% en solución salina balanceada de Hanks con rojo fenol a 37°C durante 2-3 min para obtener las CEA. La suspensión celular resultante se centrifugó a 300xg durante 10 min.

Las CMEA y CEA aisladas, se resuspendieron por separado en 15 ml de DMEN con 20% de SBF y 1% de P/E, se sembraron en placas de cultivo de 75 cm² y se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cada 2-3 días se les cambio el medio a los cultivos. Al segundo día de cultivo al medio de las CEA se le añadió EGF (10 ng/ml).

Una vez que los cultivos llegaron al 70-80% de confluencia se realizaron subcultivos de ambos tipos celulares por tripsinización para obtener un número apropiado de células para los experimentos. Los CMEA y CEA en pase 1 o 2 fueron las que se utilizaron para la obtención de los equivalentes de tejido nervioso y en los estudios de proliferación.

Para comprobar el rendimiento celular obtenido, las MA (n=3), se pesaron y posteriormente después de aislar las CMEA y CEA se contaron las células adheridas al frasco de cultivo a las 24 h. El número de células viables se determinó con una cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul tripán.

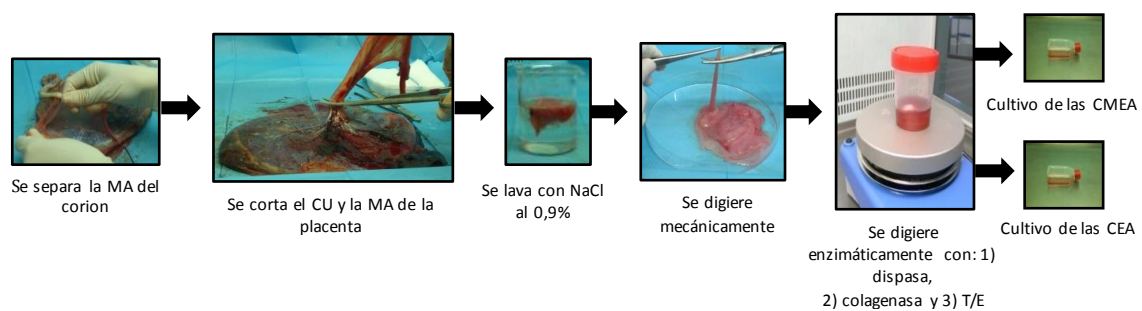


Figura M2: Proceso de aislamiento de las CMEA y CEA a partir de las MA obtenidas de placentas.

3. Obtención y procesamiento de los Cordones Umbilicales

3.1. Obtención de los Cordones Umbilicales

Los CU (n=22) se obtuvieron como las placentas a partir de cesáreas programadas seleccionadas en el Hospital Materno Infantil Teresa Herrera de A Coruña. Los CU se trasladaban a la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos en un frasco estéril con medio de transporte para los CU que consistió medio 199 con los siguientes antibióticos: cotrimoxazol (50 µg/ml), vancomicina (50 µg/ml), amikacina (50 µg/ml) y anfotericina B (5 µg/ml). En una campana de flujo laminar, bajo condiciones de esterilidad se lavaron 3 veces con NaCl al 0,9% para eliminar los coágulos, células sanguíneas y el mucus antes de proceder a su procesamiento.

En algunos casos (n=3), se cogieron muestras representativas de los CU, que se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina para los estudios

histoquímicos (H-E, azul alcian, safranina O, tricrómico de Masson y hematoxilina de Verhoeff) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de colágeno tipo I y fibronectina).

3.2. Aislamiento y cultivo de las células derivadas de la gelatina de Wharton (Figura M3)

Los CU compuestos principalmente por la gelatina de Wharton, se cortaron en secciones transversales y longitudinales, obteniendo explantes de aproximadamente 0,5 cm³ en los que se eliminaron las dos arterias y la vena para evitar la posible contaminación con células endoteliales. Se pusieron 4-5 explantes en cada placa de cultivo de 162 cm² de forma que el lado estromal adherente permaneció en contacto con la superficie de la placa de cultivo y se dejaron a 37°C con una atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 2 h, sin medio de cultivo, para que los explantes se pegasen bien a la placa.

Pasadas las 2 h, se les añadió 25 ml de medio de cultivo a los explantes que consistió en DMEM, 10% de SBF y 1% de P/E y se dejaron a 37°C con una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Se cambió el medio cada 2-3 días. Dos días después, los fragmentos de la gelatina de Wharton se eliminaron y las células siguieron en cultivo hasta llegar al 70-80% de confluencia, momento en el cual se realizaron subcultivos como se explicó anteriormente para obtener un número apropiado de células para los experimentos. Las CMMGW en pase 1 o 2 fueron las que se utilizaron para los equivalentes de tejido nervioso y estudios de proliferación.

Para comprobar el rendimiento celular obtenido, los CU (n=3), se midieron y posteriormente después de aislar las CMMGW se contaron las células adheridas a la placa de cultivo a las 48 h. El número de células viables se determinó mediante el conteo con una cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul tripán.

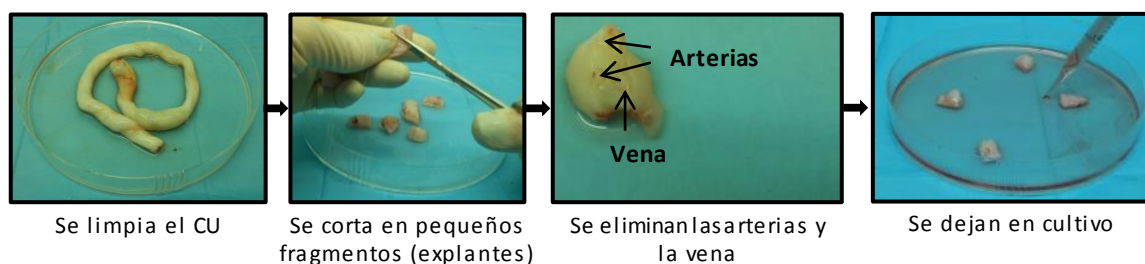


Figura M3: Proceso de aislamiento y cultivo de las CMMGW mediante el método del explante a partir de los CU.

4. Congelación y descongelación de las células

En algunos casos, cuando en los cultivos primarios de algunas de las poblaciones celulares (fibroblastos, queratinocitos, 3T3, CMEA, CEA y CMMGW) se obtuvieron un número superior de células al que se necesitaban en ese momento para los experimentos, éstas se congelaban para su posterior uso. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Las células se trataron con 10 ml de 1% de T/E en PBS durante 5 min para despegarlos de la superficie del frasco de cultivo. Se recogió la suspensión celular del frasco de cultivo, se transfirió a un tubo cónico y se inactivó la T/E con el MI para realizar una centrifugación a 300xg durante 10 min. Finalizada la centrifugación, el precipitado celular se mantuvo sobre hielo y se resuspendió en 2-3 ml de medio de congelación que consistió en 80% de DMEM, 10% de SBF y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich Química S.A., España). Cada frasco de cultivo de 75 cm² confluyente se congeló en 2-3 crioviales. Los crioviales, se dejaron a -80°C en una caja de poliespan durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se pasaron a la fase líquida del tanque de nitrógeno líquido (N₂L) a -196°C. En los casos en que fue necesaria su posterior utilización, los crioviales se descongelaron sumergiéndolos unos minutos en un baño a 37°C y se centrifugaron a 300xg durante 10 min. El precipitado celular obtenido se resuspendió en 2 ml del medio que correspondiese y se sembraron las células en frascos de cultivo de 75 cm² con 15 ml de medio de cultivo nuevo.

B. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS Y DE LOS EQUIVALENTES DE INGENIERIA TISULAR

1. Citoespines de células

Para los estudios de la caracterización inmunocitoquímica de las células se realizaron citoespines de los fibroblastos, queratinocitos, CMEA, CEA y CMMGW utilizando una citocentrífuga. Para ello, se centrifugaron 5×10^4 células sobre un portaobjetos a 300xg durante 10 min. Los portaobjetos obtenidos con las células se dejaron secar a 37°C durante 2 h o a T^a ambiente durante 4 h y se fijaron con acetona a 4°C durante 10 min. Antes de continuar con la técnica histológica correspondiente se dejaron secar a T^a ambiente durante 30 min.

2. Formación de los bloques y cortes de tejidos

Para los estudios de caracterización tanto de los tejidos iniciales de los que se partía para la obtención de células así como de los equivalentes tisulares sintetizados durante los experimentos, se prepararon bloques tisulares utilizando dos aproximaciones diferentes:

a) Obtención de bloques de tejidos en parafina. De cada muestra una parte se fijó en formaldehído al 4% durante 24 h dentro de un *cassett*. Después se dejaron en alcohol al 70%. Posteriormente, los *cassetts* se introdujeron en el inclusor automático STP 120 *Tissue processor* (Myr, España) para su deshidratación, aclarado en xilol e inclusión en parafina. Para la formación de los bloques se utilizó un centro modular de inclusión de tejidos Leica EG1150 (Leica Microsistemas S.L.U., España) y una vez formados se almacenaron a Tª ambiente hasta su uso. Se hicieron cortes seriados con el microtomo Leica RM2155 EG1150 (Leica Microsistemas S.L.U., España) con un grosor de 4 µm. Éstos permanecieron en la estufa a 37°C para un correcto secado hasta el momento de su utilización.

b) Obtención de bloques de tejidos congelados en OCT™. La otra parte equivalente de la muestra se incluyó en OCT™ y el bloque formado se congeló inmediatamente en isopentano a -50°C dentro de un recipiente con N₂L y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los cortes se realizaron con el criostato Leica RM2155 EG1150 (Leica Microsistemas S.L.U., España) con un grosor de 4 µm. Éstos permanecieron a -20°C hasta el momento de su utilización.

3. Técnicas de caracterización de tejidos y células

3.1. Tinciones histoquímicas

3.1.1. Tinciones de cortes de tejidos o equivalentes tisulares

Las tinciones se realizaron sobre cortes obtenidos de los bloques de tejidos o equivalentes tisulares incluidos en parafina. Para su utilización en las distintas técnicas fue necesario desparafinarlos en una estufa a 60°C durante 30 min, seguido de un tratamiento con xilol durante 10 min. Posteriormente, los portaobjetos con los cortes se sometieron a una hidratación en alcoholes decrecientes (100º y 96º) y agua destilada durante 10 min en cada uno. Seguidamente se sometieron a la tinción específica de cada una de las técnicas indicada a continuación:

H-E

Los cortes se sumergieron en hematoxilina de Harris (Panreac Química S.L.U., España) durante 5 min, se aclararon en agua corriente hasta obtener el viraje crómico y se contratiñeron con eosina (Panreac Química S.L.U., España) durante 5 min.

Esta tinción tiñe de color azul/violeta las estructuras ácidas (como el núcleo de las células) y de color rosa las estructuras básicas (como la MEC y el citoplasma de las células).

Tricrómico de Masson

Los cortes se sumergieron en alumbre férrico (Merck, Alemania) durante 30 min y después en hematoxilina férrica de Weigert (Fluka, España) durante 10 min, aclarándose tras ambos pasos con agua corriente. A continuación, los cortes se trataron con etanol-ácido pícrico (Panreac Química S.L.U., España) durante 6 min, se lavaron de nuevo con agua corriente durante 5 min, y se sometieron a pases consecutivos de fucsina de Ponceau (Merck, Alemania) durante 8 min, ácido fosfomolibdico I (VWR Prolabo, Francia) durante 5 min, ácido fosfomolibdico II (VWR Prolabo, Francia) durante 5 min y azul de anilina (Merck, Alemania) durante 12 min.

Esta tinción tiñe de color rosa los citoplasmas de las células y de color azul/violeta los núcleos y de color azul también las fibras de colágeno.

Hematoxilina de Verhoeff

Los cortes se sumergieron en hematoxilina férrica de Verhoeff (Panreac Química S.L.U., España) durante 30 min y en cloruro férrico al 10% (Merck, Alemania) unos pases hasta diferenciarse, aclarándose tras ambos pasos con agua corriente. A continuación, los cortes se trataron con tiosulfato sódico al 5% (Panreac Química S.L.U., España) durante 1 min, se lavaron de nuevo con agua corriente y tiñeron con Van Gienson (Merck, Alemania) durante 1 min.

Esta tinción tiñe de color negro las fibras de elastina.

Azul alcían

Los cortes se sumergieron en azul alcían (Panreac Química S.L.U., España) durante 30 min y se lavaron en agua destilada.

Esta tinción tiñe de color azul los mucopolisacáridos ácidos.

Safranina O

Los cortes se sumergieron en Safranina O (Sigma-Aldrich, España) durante 10 min y se aclararon con agua corriente. A continuación, los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Weighert (Panreac Química S.L.U., España) durante 10 min y se aclararon con agua destilada.

Esta tinción tiñe de color anaranjado los GAG.

Azul de toluidina

Los corte se tiñeron con la solución de azul de toluidina al 0,2% (Merck, Alemania) en tampón acetato a pH 4,2 durante 3 min. A continuación, se lavaron en tampón acetato a pH 4,2 y con agua destilada.

Esta tinción tiñe los elementos de carácter metacromático de color rojo/púrpura como las estructuras ricas en PG (como heparán sulfato) y de color azul los núcleos.

Tinción de plata de Bielschowsky

Los cortes se sumergieron en nitrato de plata amoniacal al 20% (Panreac Química S.L.U., España) durante 30 min a 37°C y se realizaron 3 lavados en agua destilada. Posteriormente, se sumergieron 2 veces en formol al 3,7-4% durante 30 seg de cada baño. Se tiñeron con plata amoniacal durante 30 seg y otra vez se realizan 2 baños en formol 3,7-4% durante 1 min cada uno. Se lavaron los cortes con agua destilada. Se sumergieron en cloruro de oro III al 0,1% (Merck, Alemania) durante 10 min. Se lavaron en agua destilada y se sumergieron en tiosulfato sódico al 5% (Panreac Química S.L.U., España) durante 5 min y se aclararon con agua destilada.

Esta tinción tiñe de negro los axones y dendritas.

En todas las tinciones indicadas anteriormente, el paso final tras la tinción fue la deshidratación de los cortes teñidos en alcoholes crecientes (96º y 100º) y aclarado con xilol, 10 min cada uno. Finalmente, se montaron los cortes con DePeX (Sigma-Aldrich Química S.A., España).

3.1.2. Tinciones de células en cultivo

En otros casos para teñir células que estaban creciendo en cultivo, éstas se cultivaron directamente en cámaras de 8 pocillos para microscopía (BD Falcon, Francia). Para su tinción, se retiró el medio de cultivo y la cámara con las células sobre el portaobjetos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min antes de someter los respectivos portaobjetos a las siguientes tinciones:

Oil Red O

Se retiró el fijador y las células se lavaron con alcohol isopropílico al 60% (Panreac Química S.L.U., España), evitando que las células adheridas al cristal se levantasen. Inmediatamente después, se metió el portaobjetos con las células en Oil Red O (Sigma-Aldrich, EEUU) previamente filtrado durante 20 min. Después de esto, se lavó con alcohol isopropílico al 60% para diferenciar. Se lavaron en agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina de Gill III (Merk, Alemania) durante 3 min. Seguidamente, se lavó en agua destilada durante 10 min y se montó con glicergel (Dako, Dinamarca).

Esta tinción tiñe de color rojo los lípidos intracelulares, mientras que los núcleos de las células se tiñen de color azul.

Rojo alizarina

Se retiró el fijador y las células se lavaron con PBS. Inmediatamente después, se metió el portaobjetos con las células en rojo alizarina al 1% en hidróxido de potasio (Merck, Alemania) durante 10 min. Después se equilibró en frío con PBS 1X y se montaron con glicergel.

Esta tinción tiñe color rojo los precipitados de calcio.

3.2. Técnicas inmunológicas

3.2.1. Técnicas de inmunohistoquímica en células

Para caracterizar a los fibroblastos, queratinocitos, CMEA, CEA y CMMGW se realizó una inmunocitoquímica de estas células. Para ello, se realizaron citoespines de cada tipo celular y se fijaron con acetona a 4°C durante 10 min. Tras el secado a Tª ambiente, se realizó un lavado de 10 min con PBS pH 7,6 y un pretratamiento de desenmascaramiento antigénico con proteinasa K (Dako, EEUU) durante 10 min para el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-CK y citrato sódico para el AcMo anti-vimentina. La actividad peroxidasa endógena se inhibió utilizando la solución bloqueadora de la peroxidasa del *kit EnVision™* de Dako (Dako, EEUU) durante 10 min y a continuación las células se lavaron con PBS pH 7,6 durante 10 min para proceder a la incubación con los Ac primarios: AcMo anti-vimentina y AcMo anti-CK, a Tª ambiente durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS pH 7,6 y cada muestra se incubó a Tª ambiente durante 30 min con el Ac secundario *Polymered Envision plus policlonal (Labelled polymer-HRP)*; Dako Cytomation, EEUU). Finalizada esta segunda incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS pH 7,6 durante 5 min. Se reveló la reacción con 1:50 de la solución cromogénica 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB, Dako Cytomation), deteniendo la reacción con agua destilada a los 5 min. Posteriormente, se contratiñeron con la hematoxilina de Gill III durante 2 min. Por último, los cortes se aclararon con agua destilada y se deshidrataron utilizando alcoholes crecientes (96º y 100º) y xilol, 10 min cada uno y se montaron en DePeX (Sigma-Aldrich Química S.A., España).

3.2.2. Técnicas de inmunohistoquímica en tejido

En el caso de los tejidos o de los equivalentes de Ingeniería Tisular, se utilizaron cortes de los bloques conservados en parafina. Al igual que en el caso de las tinciones histoquímicas, los cortes se sometieron a un desparafinado en una estufa durante 30 min a 60°C, seguido de un tratamiento con xilol durante 10 min. A continuación se llevó a cabo una hidratación en alcoholes decrecientes (100º y 96º) y agua destilada, 10 min cada uno. Se realizó un lavado con PBS 1X conteniendo *Tween 20* (Sigma-Aldrich Química S.A., España) en una concentración de 1:1000 (PBS pH 7,6) durante 10 min. En algunos casos se realizó un pretratamiento con proteinasa K durante 10 min o citrato sódico 0,1 M durante 20 min. Se lavaron los cortes con PBS pH 7,6 durante 5 min. A continuación, se incubaron 10 min con la solución bloqueante de la actividad peroxidasa. Se lavaron los cortes con PBS pH 7,6 durante 10 min. Seguidamente, se realizó la incubación durante 1 h a Tª ambiente con cada uno de los Ac primarios específicos en cada caso: AcMo anti-CK, anti-K14, anti-K10, anti-involucrina, anti-

Material y métodos

vimentina, anti-laminina, anti-melan-A, anti-tirosinasa, anti-p63, anti-Ki67, anti-fibronectina y anti-colágeno tipo I y II o el Ac policlonal anti-S100. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS pH 7,6. Posteriormente, se incubaron con el Ac secundario *Polymered Envision plus policlonal* durante 30 min. Inmediatamente después, se llevaron a cabo 3 lavados de 5 min con PBS pH 7,6. Se reveló la reacción con 1:50 de DAB, deteniendo la reacción con agua destilada a los 5 min. Posteriormente, se contratiñeron con la hematoxilina de Gill III durante 2 min. Por último, los cortes se aclararon con agua destilada y se deshidrataron utilizando alcoholes crecientes (96º y 100º) y xilol 10 min cada uno y se montaron en DePeX.

En las dos técnicas anteriores los controles negativos carecían de Ac primario y solo se incubaron con los Ac secundarios *Polymered Envision plus policlonal*.

3.2.3. Técnicas de inmunofluorescencia en células

Para caracterizar las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas hacia células similares a células nerviosas, éstas se cultivaron en cámaras de 8 pocillos para microscopía. Se lavaron con PBS pH 7,4 (Dako, EEUU) y se fijaron con acetona a 4ºC durante 10 min. Tras el secado a Tª ambiente, los pocillos se hidrataron durante 5 min con PBS pH 7,4 durante 10 min. A continuación, las preparaciones se lavaron de nuevo con tampón PBS pH 7,4 durante 10 min y se procedió a la incubación durante 1 h a Tª ambiente con uno de los siguientes Ac primarios: Ac policlonal anti-GFAP, AcMo anti-NF, AcMo anti-Receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), Ac policlonal anti-S100 y AcMo anti-vimentina. Finalizada la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón PBS pH 7,4 y se añadió el correspondiente Ac secundario: Ac policlonal anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Dako, Dinamarca) para el NGFR, Ac policlonal anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón marcado con ficoeritrina (PE; Dako, Dinamarca) para la vimentina y Ac policlonal anti-Igs fracción F(ab)2 de conejo marcado con FITC para GFAP, S100 y NF. Se incubaron durante 30 min en oscuridad. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS pH 7,4. Por último, para teñir los núcleos, se añadió el colorante fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 100 ng/ml; Sigma-Aldrich Química S.A., España) durante 20 min. Se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS pH 7,4 y se montaron con glicergel.

3.2.4. Técnicas de inmunofluorescencia simple en tejidos

Tras la descongelación de los cortes a Tª ambiente, se lavaron con PBS pH 7,4 y se fijaron con acetona a 4°C durante 10 min. Tras el secado a Tª ambiente se volvieron a lavar los portaobjetos con PBS pH 7,4 durante 10 min y se comenzó con la incubación del primer AcMo primario anti-vimentina durante 1h a Tª ambiente. Finalizada la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS pH 7,4 y se añadió el correspondiente el Ac policlonal secundario anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón marcado con FITC durante 30 min en oscuridad. Por último, se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS pH 7,4 y se contratiñeron los núcleos con DAPI durante 20 min. Se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS pH 7,4 y se montaron con glicergel.

3.2.5. Técnicas de inmunofluorescencia doble en tejidos

Los cortes se descongelaron a Tª ambiente, se lavaron con PBS pH 7,4, se fijaron con acetona a 4°C durante 10 min, se volvieron a lavar con PBS pH 7,4 durante 10 min y se comenzó con la incubación del primer AcMo primario anti-CK durante 1 h a Tª ambiente. Las secciones se lavaron con PBS pH 7,4 y se incubaron con el primer Ac policlonal secundario anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón marcado con FITC durante 30 min en oscuridad. Se lavaron con PBS pH 7,4 y se incubaron con el segundo AcMo primario anti-vimentina durante 1 h. Después se lavaron con PBS pH 7,4 y se incubaron con el segundo Ac policlonal secundario anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón marcado con PE durante 30 min. Por último, se lavaron con PBS pH 7,4 y se contratiñeron los núcleos con DAPI durante 20 min. Se lavaron y se montaron con glicergel.

En las tres técnicas anteriores los controles negativos carecían de Ac primario y solo se incubaron con los Ac secundarios conjugados con FITC o PE.

Todas las muestras teñidas anteriormente tanto histoquímicas como inmunológicas se examinaron microscópicamente con un Olympus BX61 (Olympus España S.A., España) equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A., España).

| ANTICUERPO | HOSPEDADOR | CLON | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|--|-------------------|-------------|--------------------|-----------------------------|
| Primarios | | | | |
| CK | Ratón | AE1/AE3 | 1:50 | Dako |
| K14 | Ratón | L-L002 | 1:50 | Diadnostics BioSystems |
| K10 | Ratón | DE-K10 | 1:2000 | Neomarkers |
| Involucrina | Ratón | SY5 | 1:1000 | Sigma |
| Vimentina | Ratón | V9 | 1:100 | Abcam |
| Laminina | Ratón | LAM-89 | 1:500 | Sigma |
| Melan-A | Ratón | A103 | 1:100 | Sigma |
| Tirosinasa | Ratón | T311 | 1:200 | Sigma |
| S100 | Conejo | - | 1:400 | Dako |
| P63 | Ratón | 4A4 | 1:400 | Thermo Scientific |
| Ki67 | Ratón | - | Listo para usar | Novacastra Laboratories |
| Fibronectina | Ratón | SPM246 | 1:20 | Santa Cruz Biotechnology |
| Colágeno tipo I | Ratón | COL-1 | 1:50 | Abcam |
| Colágeno tipo II | Ratón | COL-2 | 1:100 | Abcam |
| GFAP | Conejo | - | 1:1000 | Dako |
| NF-M | Conejo | EP2460 | 1:100 | Abcam |
| NGFR p75 | Ratón | ME20.4 | 1:1000 | Sigma |
| Secundarios | | | | |
| anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón-FITC | Cabra | - | 1:50 | Dako |
| anti-Igs fracción F(ab)2 de conejo-FITC | Cabra | - | 1:100 | Invitrogen |
| anti-Igs fracción F(ab)2 de ratón-PE | Cabra | - | 1:40 | Dako |

Tabla M1: Listado de Ac y condiciones utilizados en este estudio.

3.3. Estudio de microscopía electrónica de barrido

En algunos casos los tejidos se caracterizaron por MEB. Para ello, los fragmentos representativos de las muestras a analizar se lavaron con PBS pH 7,4 y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón 0,1M cacodilato pH 7,4 durante 12-24 h a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron utilizando concentraciones crecientes de etanol (70º, 90º y 100º) durante 15 min y se secaron utilizando un desecador por punto crítico modelo CPD 030 (Bal-Tec/Leica MS, Alemania). Finalmente, se cubrieron con un baño de oro utilizando un metalizador modelo SCD 050 (Bal-Tec/Leica MS, Alemania). La visualización se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6400 (Jeol, Japón) con un rango de magnificación de 1000-6000X. La presencia de NaCl cristalizado se descartó en modo de EDS (analizador por energía dispersiva de rayos-X).

4. Multipotencialidad de las CMEA, CEA y CMMGW

La multipotencialidad de las CMEA, CEA y CMMGW se comprobó mediante la inducción de su diferenciación al linaje mesodérmico. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Diferenciación adipogénica:

En una cámara de 8 pocillos para microscopía, se sembraron $1,5 \times 10^5$ CMEA, CEA o CMMGW por pocillo (n=3). Las células fueron inducidas por su cultivo en DMEM alto en glucosa (Gibco, España), 10% de SBF, dexametasona (1 μ M; StemCell Technologies Inc., EEUU), 3-isobutil-1-metilxantina (0,5 mM; Sigma-Aldrich Química S.A., España), insulina (10 μ M; Sigma-Aldrich Química S.A., España) y indometacina (200 μ M; Sigma-Aldrich Química S.A., España). Se cultivaron durante 21 días y el medio se cambió cada 2-3 días.

Transcurrido el tiempo de diferenciación, se realizó el análisis histoquímico (Oil Red O) de las células.

Diferenciación osteogénica:

En una cámara de 8 pocillos para microscopía, se sembraron $1,5 \times 10^5$ CMEA, CEA o CMMGW por pocillo (n=3). Las células fueron inducidas por su cultivo en DMEM alto en glucosa, 10% de SBF, dexametasona (10 μ M), ácido ascórbico (50 μ g/ml; Sigma-Aldrich Química S.A., España) y β -glicerofosfato (10 mM; StemCell Technologies Inc., EEUU). Se cultivaron durante 21 días y el medio se cambió cada 2-3 días.

Transcurrido el tiempo de diferenciación, se realizó el análisis histoquímico (rojo alizarina) de las células.

Diferenciación condrogénica:

Se centrifugaron 5×10^5 CMEA, CEA o CMMGW en DMEM con 10% de SBF y 1% de P/E en un tubo de poliestireno con fondo en V (J.C. Catalán S. L., España) durante 8-10 min a 300xg (n=3). Se sacaron de la centrífuga y se dejaron en la estufa a 37°C durante 24 h, para que las células formasen la micromasa. Pasadas las 24 h, se les dió un golpe seco a los tubos con el fin de que las micromasas quedasen en suspensión. Para la inducción condrogénica se cultivaron las micromasas en DMEM alto en glucosa, 1% de SBF, insulina (6,25 µg/ml), TGF-β1 (10ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) y ácido ascórbico fresco (50 ng/ml). Se cultivaron durante 21 días y el medio se cambió cada 2-3 días.

Transcurrido el tiempo de diferenciación, se realizó el análisis histoquímico (azul de toluidina) e inmunohistoquímico (determinación antigénica de colágeno tipo II) de las micromasas.

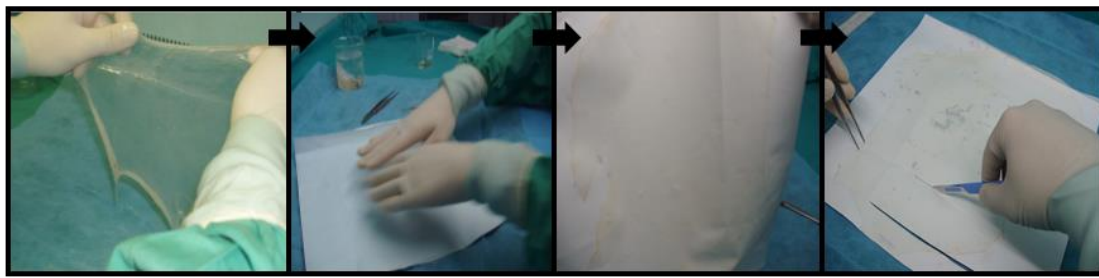
En todos los casos, se realizaron controles negativos de la adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis cultivando las células con medio DMEM, 10% de SBF y 1% de P/E.

C. PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA SU UTILIZACIÓN COMO SOPORTE

1. Criopreservación de la Membrana Amniótica (Figura M4)

Una vez obtenidas las MA (n=9) se dejaron en medio 199 con los siguientes antibióticos: cotrimoxazol (50 µg/ml), vancomicina (50 µg/ml), amikacina (50 µg/ml) y anfotericina B (5 µg/ml) a 4°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de la MA con NaCl al 0,9% para proceder con su criopreservación. Para ello, se lavaron las MA con PBS y se colocaron sobre un papel de nitrocelulosa (Millipore, Irlanda) que quedó adherido a la MA por el lado estromal y se cortaron parches de 4x4 cm². Estos parches se introdujeron en bolsas para criopreservar Kapton-teflon DF700 (Fresenius Kabi, Alemania) y se les añadió medio de criopreservación, que consistió en 20 ml de medio 199 con un 10% de DMSO y se sellaron. Se dejaron en una batea con hielo en agitación durante 30 min para permitir que la solución de criopreservación se equilibrase con el tejido. Cada parche de MA se criopreservó siguiendo el programa de congelación controlada usando un equipo CM2000 (Carburos Metálicos, España). La congelación fue de -1°C/min hasta -40°C, -2°C/min hasta -60°C, y de -5°C/min hasta -150°C. Todas las bolsas con los parches de MA se guardaron en la fase gas del N₂L a -150°C hasta su uso.

Formación de los parches de MA



Se estira la MA Se coloca el papel de nitrocelulosa por encima de la MA Papel de nitrocelulosa con la MA pegada Se cortan parches de 4x4 cm²

Criopreservación de los parches de MA



Se colocan los parches en bolsas con medio de criopreservación Se sellan las bolsas Se dejan en hielo para equilibrar Se realiza la congelación controlada Se guardan las bolsas en fase gas del N₂L

Figura M4: Proceso de criopreservación de la MA.

2. Descongelación de la Membrana Amniótica

Para la descongelación de la MA criopreservada se extrajo la bolsa con el parche de MA y se dejó durante 5 min a T^a ambiente seguido por un baño de agua a 37°C hasta la completa descongelación. Se secó la bolsa con una gasa y se desinfectó el borde de la bolsa con povidona iodada (Betadine; Pharma SAU, España). En la campana de flujo laminar, con unas tijeras estériles se cortó la bolsa. Se realizaron lavados secuenciales para reducir el daño celular debido a cambios osmóticos, por progresiva dilución con NaCl al 0,9% a 4°C. Se repitió el proceso 5 veces hasta eliminar totalmente el medio de criopreservación.

En algunos casos, para su caracterización tras la descongelación, se cogió una muestra representativa de MA (n=3) y se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricrómico de Masson, Safranina O y azul alcian) e inmuistoquímicos (determinación antigénica de laminina, fibronectina y vimentina).

3. Descelularización de la Membrana Amniótica

3.1. Elección del tratamiento

Una vez descongelados los parches de MA se trataron con diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos para saber cuál era el más efectivo en la eliminación tanto de las CEA como de las CMEA sin la degradación de la MEC y sin afectar a la membrana basal.

Para ello, se pusieron los parches de MA de diferentes pacientes (n=5) sobre placas de cultivo con el lado estromal hacia abajo y se incubaron con los diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos. En la Tabla M2 se describen los diferentes métodos con las sustancias químicas y/o enzimas, concentraciones, Tª y tiempos utilizados para descelularizar la MA. Las MA se dejaron a 4°C y 37°C en una atmósfera húmeda y 5% CO₂ hasta finalizar el tiempo de cada método de descelularización. Después se lavaron 3 veces en PBS y se cogió una muestra representativa de MA tratada que se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricómico de Masson, Safranina O y azul alcian) e inmuistoquímicos (determinación antigénica de laminina, fibronectina y vimentina).

| Método de descelularización | %/[] | Tª | Tiempo |
|--|----------|------|--------|
| EDTA (Sigma-Aldrich Química S.A., España) | 0,02% | 37°C | 1 h |
| EDTA | 0,02% | 37°C | 2 h |
| EDTA | 0,1% | 4°C | 16 h |
| EDTA | 0,1% | 37°C | 30 min |
| EDTA | 0,1% | 37°C | 1 h |
| T/E | 0,25% | 37°C | 10 min |
| T/E | 0,25% | 37°C | 30 min |
| T/E | 1% | 37°C | 10 min |
| T/E | 1% | 37°C | 30 min |
| Acutasa (Accutase™; PAA Laboratories GmbH, Alemania) | - | 37°C | 1 h |
| Dispasa (Gibco, España) | 1,2 U/ml | 37°C | 30 min |
| Dispasa | 1,2 U/ml | 37°C | 1 h |

Tabla M2: Métodos de descelularización de la MA. Tipo de tratamiento químico y/o enzimático, concentración (%), Tª y tiempo utilizados.

3.2. Análisis del ADN residual en las Membranas Amnióticas descelularizadas

De forma adicional a los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos, para comprobar molecularmente que método de descelularización era el más adecuado se realizó la cuantificación del ADN residual que quedaba en las MA tras llevar a cabo cada método de descelularización. Para ello, el ADN de las MA tratadas con los diferentes métodos se extrajo mediante el *Gentra Puregene Tissue Kit* (Qiagen Iberia S.L., España) según las instrucciones del fabricante. A partir de 10 mg de cada MA (n=5, por cada tratamiento) tratada con los diferentes métodos de descelularización, se cortó el tejido en fragmentos pequeños y se pusieron en un mortero en donde se congelaron en N₂L. Se le añadió 300 µl de solución de lisis celular para lisar las células. Posteriormente se calentaron a 65°C durante 30 min. Se le añadió 1,5 µl de proteinasa K, se mezcló e incubó a 55°C toda la noche para lisar el tejido completamente. Para eliminar el ARN se le añadió 1,5 µl de solución RNasa A y se incubó a 37°C durante 30 min. Después se dejaron en hielo 1 min y se añadió 100 µl de solución de precipitación de proteínas. Se centrifugó a 16,000xg durante 3 min. En un tubo con 300 µl de isopropanol se añadió el sobrenadante y se centrifugó a 16,000xg durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 300 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 16,000xg durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 50 µl de solución de hidratación del DNA y se incubó a 65°C durante 1 h. Por último, se incubó a T^a ambiente toda la noche en agitación.

La calidad y concentración de los extractos de DNA se determinaron con un espectrofotómetro Nano-Drop-1000 (Thermo-Fisher Scientific, EEUU).

D. INGENIERIA TISULAR DE LA PIEL

1. Desarrollo del equivalente de piel basado en la utilización de plasma humano como soporte

1.1. Construcción de un equivalente de piel utilizando plasma humano como soporte (modelo *in vitro*)

1. 1. 1. Obtención de plasma

Se usó plasma de donantes de sangre (n=10) como fuente de fibrina procedente del Banco de Sangre del Hospital Teresa Herrera del grupo 0+ y se midió la concentración de fibrinógeno con un coagulómetro *ACL Top coagulometer* (Izasa, España).

1.1.2. Preparación de la dermis

Para preparar la dermis del equivalente de piel formada por la matriz de fibrina obtenida del plasma humano con fibroblastos, se procedió a añadir en un frasco de cultivo de 150 cm² (TPP Techno Plastic Products AG, Suiza): fibroblastos (1×10^5 en 2 ml de MQ), entre 20-25 ml de plasma dependiendo de la concentración de fibrinógeno inicial (40-50 mg/lámina), NaCl al 0,9% (hasta completar un volumen final de 50 ml), 400 µl de ácido tranexámico (Amchafibrin; Rottapharm S.L., España) y por último 4 ml de cloruro cálcico al 1% (CaCl₂; Sigma-Aldrich Química S.A., España) en NaCl al 0,9% para iniciar el proceso de polimerización.

Las matrices se dejaron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂ al menos durante 1 h hasta su coagulación.

1.1.3. Cultivo secundario de queratinocitos sobre la dermis (Figura M5)

Para sintetizar el equivalente de piel, después de la coagulación de la matriz de fibrina, se sembraron en su superficie los queratinocitos a una densidad de 5000-12000 queratinocitos/cm² con MQ. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. A partir del segundo día se le añadió EGF. Se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂ hasta que la llegaron a la confluencia.

Para su caracterización en algunos casos (n=7), se cogió un fragmento del equivalente de piel y se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricrómico de Masson y hematoxilina de Verhoeff) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de CK, K14, K10, involucrina, laminina, melan-A, tirosinasa y S100) y el otro fragmento se congeló en OCTTM para los análisis de inmunofluorescencia (determinación antigénica de vimentina).

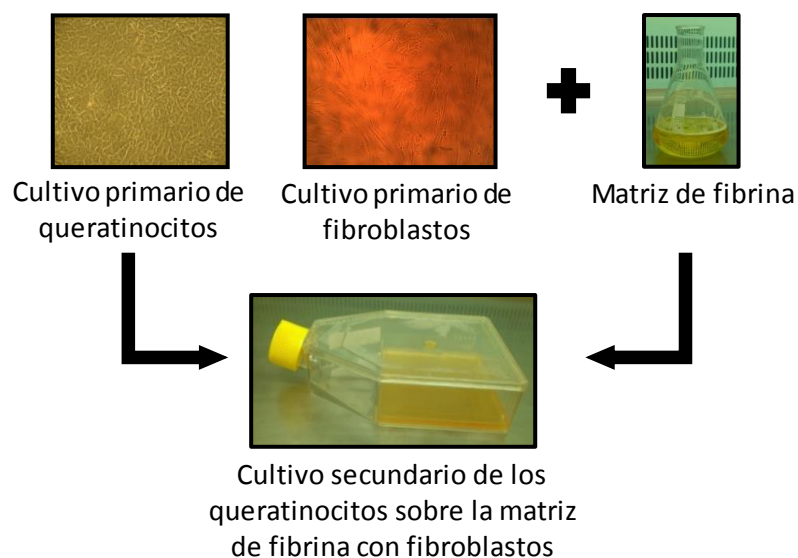


Figura M5: Esquema de la realización del equivalente de piel *in vitro*.

1.2. Trasplante experimental del equivalente de piel utilizando plasma como soporte (modelo *in vivo*)

1.2.1. Diseño experimental

Se utilizaron un total de 11 ratones *Athymic Nude-Foxn1 nu/nu* macho de 5-6 semanas de edad (Harlan Interfauna Ibérica, S.L., España) para evitar el rechazo de los injertos de los equivalentes de piel. Los ratones se distribuyeron en dos experimentos diferentes en su diseño (según número de ratones y tiempo de seguimiento):

Experimento A: Se utilizaron 5 ratones de los cuales, uno de ellos se usó como control (sin injerto del equivalente de piel) y a los 4 restantes se les realizaron los trasplantes del equivalente de piel y se sacrificaron a los 21 días.

Experimento B: Se utilizaron 6 ratones de los cuales, dos de ellos se usaron como control (uno sin injerto del equivalente de piel y el otro con autoinjerto de su propia piel) y a los 4 restantes se les realizaron los trasplantes del equivalente de piel y se sacrificaron a los 4 meses.

1.2.2. Preparación del equivalente de piel para su trasplante (Figura M6)

Cuando los queratinocitos sembrados sobre la matriz de fibrina con fibroblastos alcanzaron la confluencia, se preparó el equivalente de piel el mismo día del trasplante experimental. Para ello, a Tª ambiente se retiró el medio de cultivo y se abrió el frasco de cultivo por su parte superior. Se cubrió el equivalente de piel con un tul estéril (Tulgrasum; Laboratorio Farmacéutico S.I.T., España), al que previamente se le eliminó parte de la grasa con ayuda de una gasa, de forma que ésta ocupó toda la superficie del equivalente de piel.

Una vez efectuada esta operación, el tul se fijó a la superficie superior del equivalente de piel, en la cual se encuentran los queratinocitos, mediante el empleo de un adhesivo tisular orgánico (Histoacryl; B/Braun, España). Se aplicaron pequeñas gotas de este pegamento sobre los bordes del equivalente de piel. Una vez seco, se procedió a despegar el equivalente de piel del frasco de cultivo mediante el empleo de una espátula (TPP Techno Plastic Products AG, Suiza). Una vez se despegó, se enrolló sobre sí mismo y se introdujo en un tubo cónico estéril con DMEM y se dejaron a 4°C hasta su transporte.

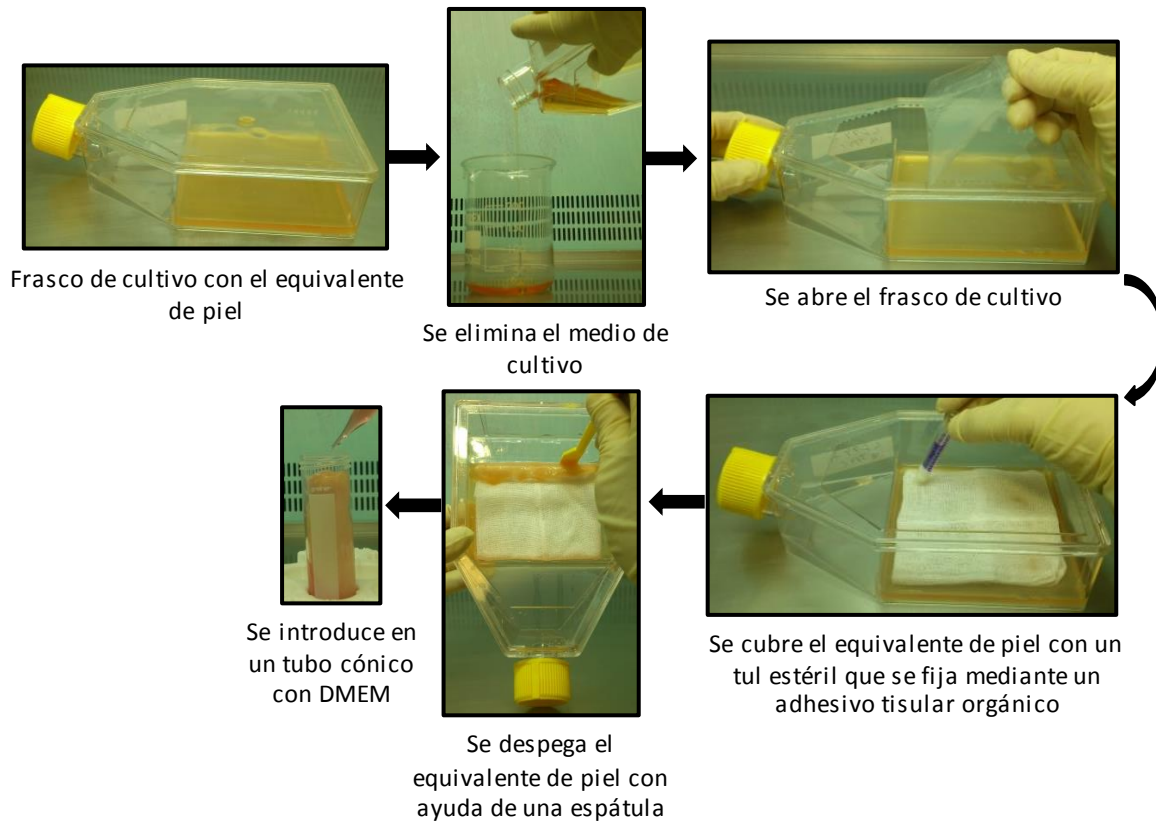


Figura M6: Separación manual del equivalente de piel del frasco de cultivo y preparación para su transporte.

1.2.3. Trasplante del equivalente de piel (Figura M7)

Los equivalentes de piel se trasplantaron en el dorso de los ratones. Para ello, se anestesiaron los ratones con Sevorene 4-6%. Una vez anestesiados, se desinfectó el dorso con povidona iodada. Después se realizó un corte mediante bisturí de una superficie de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, se retiró la piel de esta zona y se dejó en PBS estéril para congelarlo y descongelarlo 3 veces en N_2L con el fin de desvitalizarla. En lugar de la piel de ratón se injertó el equivalente de piel de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, retirando el tul que sirvió para el montaje y se suturó a los márgenes de la herida de los ratones receptores con hilo de seda. La piel desvitalizada se colocó encima de la zona injertada para proteger el equivalente de piel trasplantado y se suturó también a los bordes de la herida.

En uno de los ratones control del experimento B en el cual se realizó el autoinjerto, la piel del dorso se volvió a injertar y suturar en el mismo sitio.

Se verificó la estabilidad de la zona de los injertos de los ratones trasplantados así como del ratón control autoinjertado observando la presencia de complicaciones como sangrado, infección y pérdida del injerto.

Los ratones se mantuvieron en jaulas con aisladores ambientales en el animalario de la Unidad de Cirugía Experimental del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña. Con el objetivo de mantenerlos en las condiciones lo más libre posible de

patógenos, durante el tiempo que duraron los experimentos se les dió de beber agua autoclavada y comida esterilizada.

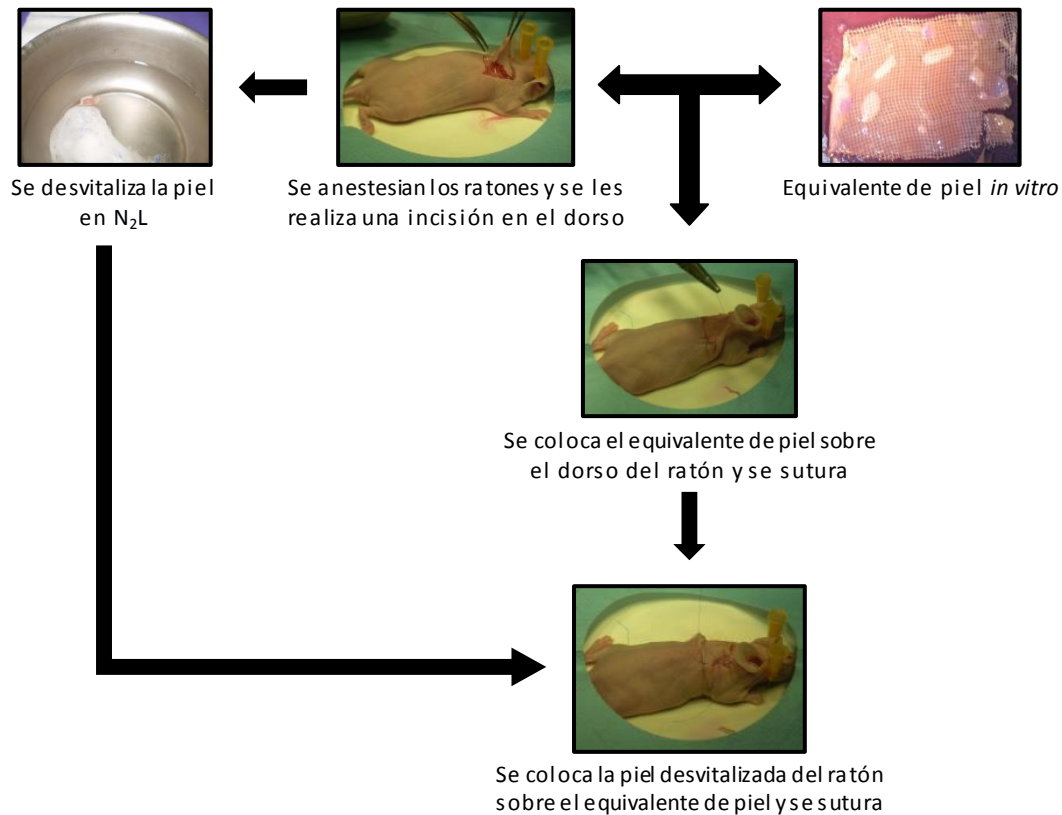


Figura M7: Trasplante experimental del equivalente de piel en el modelo animal.

1.2.4. Seguimiento macroscópico de los injertos

Para estudiar la evolución a nivel macroscópico del trasplante de los injertos se observó el estado de la curación de la herida a los 21 días y a los 4 meses (según el grupo) después del trasplante. Para evaluarla tuvimos en cuenta los siguientes criterios:

-Criterio de supervivencia del equivalente de piel: evidencia del color rosado o normal de la epidermis.

-Criterio de necrosis: si la herida se vuelve marrón u de color oscuro, la epidermis se cae y la dermis queda expuesta a las 2 semanas después del trasplante.

-Criterio de rechazo: si el injerto sobrevive durante 2 semanas y la epidermis es visible, pero en un lapso de tiempo el color se vuelve marrón u oscuro. Gradualmente se separan la epidermis y la dermis y el área necrótica de la epidermis alcanza el 50% o más. El estudio histológico muestra la degeneración y necrosis de la epidermis, e infiltración de linfocitos en la dermis y en la UDE.

-Criterios cosméticos de la herida: color (rosado±violeta/rojo), superficie lisa, y flexibilidad o rigidez de la herida.

1.2.5. Caracterización microscópica de los injertos

A los 21 días y a los 4 meses (dependiendo del experimento), los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ y se extrajeron los injertos del equivalente de piel realizando una biopsia aproximadamente en la misma localización en la que se realizó en injerto de 1,5x1,5 cm² para asegurarnos de que se recogía la zona injertada y parte de la piel del ratón receptor.

Cada biopsia se dividió en dos fragmentos de los cuales uno de ellos se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricrómico de Masson y hematoxilina de Verhoeff) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de CK, K14, K10, involucrina, vimentina, laminina, melan-A, tirosinasa y S100) y el otro fragmento se congeló en OCTTM para los análisis de inmunofluorescencia (determinación antigénica de vimentina). Además, en el caso de los ratones del experimento B, de las biopsias obtenidas se cogió un fragmento y se fijó en glutaraldehído al 2,5% en tampón 0,1M cacodilato pH 7,4 para su caracterización por MEB.

Tanto en los equivalentes de piel *in vitro*, como en los controles e injertos se midió el grosor de la epidermis en tres zonas diferentes de cada muestra teñida con H-E (n=10).

2. Desarrollo del equivalente de piel basado en la utilización de la Membrana Amniótica como soporte

2.1. Selección del lado de la Membrana Amniótica sobre el que cultivar los fibroblastos y los queratinocitos

Para determinar el lado más apropiado de la MA sobre el que cultivar los fibroblastos y queratinocitos, se hicieron diversos cultivos tanto de los fibroblastos como de los queratinocitos sobre el lado estromal o sobre el epitelial (tanto sin descelularizar como descelularizado) de la MA (Tabla M3):

| Lado de la MA | Fibroblastos | Queratinocitos |
|------------------------------|--------------|----------------|
| Estromal | 4 | 3 |
| Epitelial sin descelularizar | 3 | 4 |
| Epitelial descelularizado | 7 | 7 |

Tabla M3: Número de experimentos que se han realizado sembrando los fibroblastos o queratinocitos sobre el lado estromal, o sobre el lado epitelial sin descelularizar y descelularizado.

Para ello, se descongelaron los parches de MA y se colocaron en los dispositivos *Cell Crown*TM (Scaffdex, Finlandia) de 1,6 cm² con el lado estromal o epitelial hacia arriba, según correspondiese para inmovilizarla y que pudiesen servir de soporte. En el

Material y métodos

caso de la utilización de la MA descelerizada se comprobó al microscopio invertido de contraste de fases que se habían eliminado todas las células antes de su utilización. A continuación, este dispositivo con la MA se colocó en una placa de cultivo y se sembraron 1×10^6 fibroblastos o queratinocitos (según experimento) directamente sobre la MA como se explicó anteriormente con medio de MF y con el MQ respectivamente, hasta que llegaron a la confluencia (Figura M8). Se les cambió el medio de cultivo cada 2-3 días. El cultivo de la MA con las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% CO_2 .

Al final del período de cultivo, el equivalente de piel se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de CK y vimentina).

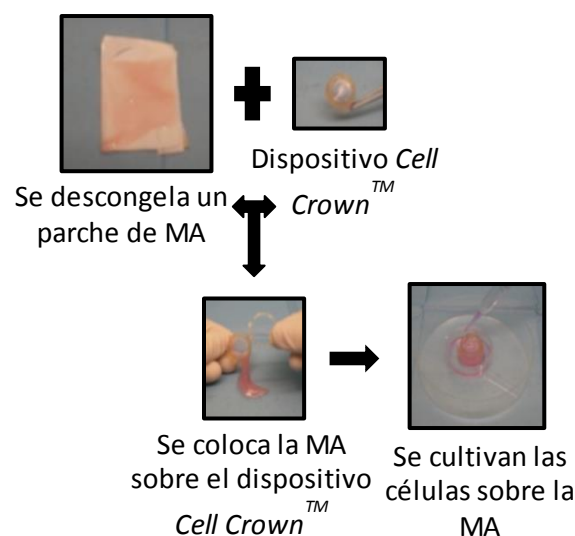


Figura M8: Preparación de la MA sobre los dispositivos *Cell Crown*[™] y cultivo de las células sobre ella.

2.2. Construcción de un equivalente de piel utilizando la MA como soporte (modelo *in vitro*)

Una vez seleccionados los lados de la MA más adecuados para sembrar cada tipo de células, para sintetizar el equivalente de piel se sembraron 5×10^5 fibroblastos sobre una placa de cultivo de 12 pocillos con MF. Un día después, cuando los fibroblastos se adhirieron a la placa y formaron una monocapa, se les eliminó el MF y se lavaron con PBS para eliminar las células que no se pegaron y se colocó por encima un parche $4 \times 4 \text{ cm}^2$ de MA descelerizada con T/E durante 30 min a 37°C , con el lado estromal en contacto con los fibroblastos y estabilizada con un dispositivo *Cell Crown*[™] de $1,6 \text{ cm}^2$. Posteriormente, se sembraron sobre la membrana basal de la MA 1×10^6 queratinocitos y se cultivaron con MQ de forma sumergida hasta que llegaron a la confluencia a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% CO_2 . El medio se cambió cada 2-3 días.

Al final del período de cultivo, la mitad del equivalente de piel se fijó en formaldehído al 4 % y se incluyó en parafina para los estudios histoquímicos (H-E, tricrómico de Masson y hematoxilina de Verhoeff) e inmunohistoquímicos (determinación antigénica de CK, K14, K10, involucrina, laminina, melan A, tirosinasa y S100) y otra mitad se congeló en OCT™ para los análisis de inmunofluorescencia (determinación antigénica de vimentina).

E. INGENIERÍA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO

1. Inducción de la diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW a células con características de células nerviosas

En una cámara de 8 pocillos para microscopía se sembraron $1,5 \times 10^5$ CMEA, CEA o CMMGW por pocillo. El medio de diferenciación estaba compuesto por DMEM, 10% de SBF, ácido retinoico (30 μ M; Sigma-Aldrich Química S.A., España), bFGF (10 ng/ml; Sigma-Aldrich Química S.A., España), EGF (10 ng/ml), L-glutamina (2 mM; Sigma-Aldrich Química S.A., España), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, España), 2-mercaptoetanol (55 μ M; Gibco, España), piruvato sódico (1mM; Sigma-Aldrich Química S.A., España), 1% de insulina-transferrina-selenio (Sigma-Aldrich Química S.A., España) y ácido ascórbico (2 mM).

Los tres tipos celulares se cultivaron durante 21 días y el medio se cambió cada 2-3 días. Los experimentos de inducción neural se realizaron por triplicado para cada tipo celular. Transcurrido el tiempo de cultivo, se analizó la diferenciación de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas mediante inmunofluorescencia (determinación antigénica de GFAP, NF, NGFR, S100 y vimentina). La cuantificación de la expresión de cada marcador se determinó contando el número de células positivas para cada determinado marcador con respecto al número total de núcleos DAPI positivos en 10 campos visuales al azar (n=3) determinando así un porcentaje.

2. Estudio de la proliferación de los diferentes tipos celulares en presencia de medio condicionado por la Membrana Amniótica

2.1. Obtención del medio condicionado por la Membrana Amniótica

Para obtener el medio condicionado por la MA (n=3), se añadió a cada fragmento de MA de aproximadamente $4 \times 4 \text{ cm}^2$, 25 ml de DMEM y 10% de SBF y se dejaron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% CO₂ durante 120 h en agitación. Este medio se recogió y se utilizó el mismo día de su obtención.

2.2. Estudio de proliferación celular

Para estudiar la proliferación de las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas, se sembraron por triplicado 5×10^4 células de cada tipo a analizar ($n=5$) en pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano Corning™ (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) con medio comercial para neuronas Quantum 286 con el suplemento G5 (PAA, España) y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 24 h. Al día siguiente, el medio se reemplazó por 100 µl de medio tóxico DMSO (control negativo), 100 µl de medio comercial para neuronas Quantum 286 con el suplemento G5 (control positivo) o por 100 µl del medio condicionado por la MA a varias concentraciones con el medio comercial específico de neuronas Quantum 286+suplemento G5 (V:V): 25%, 50%, 75% y 100% y se dejaron en cultivo otras 24 h. Al final del período de incubación, la viabilidad celular se determinó usando el kit de proliferación celular bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Roche Applied Science, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Para ello, se le añadió al medio de incubación 10 µl de MTT (concentración final 0,5 mg/ml) y se incubaron durante 4 h. Después de la incubación se le añadió 100 µl de solución solubilizadora a cada pocillo y se incubaron toda la noche. Se cuantificó la absorbancia con un lector de ELISA (Sunrise™ Tecan Group, Canadá) a una longitud de onda de 570 nm. La absorbancia se correlaciona directamente con el número de células presentes en el pocillo.

3. Desarrollo del equivalente de tejido nervioso basado en la utilización de la Membrana Amniótica como soporte (modelo *in vitro*)

Para sintetizar el equivalente de tejido nervioso, se descongelaron los parches de MA, se descelularizaron con 1% de T/E a 37°C durante 30 min y se colocaron en los dispositivos *Cell Crown*™ de 1,6 cm² con la membrana basal de la cara epitelial hacia arriba. A continuación, este dispositivo se colocó en una placa de cultivo y se sembraron 1×10^6 CMEA, CEA o CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas directamente sobre la membrana basal de la MA y se cultivaron con medio de crecimiento para neuronas Quantum 286 con el suplemento G5. Se dejaron en cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% CO₂ hasta que llegaron a la confluencia cambiándoles el medio cada 2-3 días.

La obtención del equivalente de tejido nervioso *in vitro* se realizó por triplicado para cada tipo celular. Al final del período de cultivo los equivalentes de tejido nervioso se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina para los estudios histoquímicos (azul de toluidina y tinción de plata de Bielschowsky).

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa informático SPSS 22.0 para *Windows*. Los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

G. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los donantes de plasma, células o tejidos humanos firmaron el consentimiento informado necesario para la utilización de sus muestras y datos en investigación. El proyecto de la presente tesis fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-Ferrol (nº de expediente 2015/616). Además, la parte específica de la tesis que implica el uso de animales de experimentación fue aprobada por el Comité de Experimentación Animal del mismo centro.

V. RESULTADOS

A. INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL

1. Obtención y cultivo de fibroblastos y queratinocitos

Para los experimentos de obtención de equivalentes de piel se utilizaron biopsias de dos tipos de donantes con distintas características que influyeron en el rendimiento celular obtenido. Así, cuando se utilizaron biopsias de pacientes que habían sufrido alguna quemadura, cuya edad media fue de $32,18 \pm 15,83$ años, el tamaño de la biopsia fue de 2-4 cm² y el número de queratinocitos obtenido por biopsia fue aproximadamente $16 \times 10^6 \pm 7 \times 10^6$.

Sin embargo, cuando la biopsia procedía de miembros inferiores amputados de pacientes cuya edad media fue de $85,1 \pm 3,87$ años, aunque en este caso la media del tamaño de la biopsia fue de 4-8 cm², el número de queratinocitos obtenido fue significativamente menor, aproximadamente $4,85 \times 10^6 \pm 6,7 \times 10^6$.

1.1 Determinación del mejor medio de cultivo para el cultivo de los queratinocitos

Para comparar las diferencias de proliferación con distintos medios se realizaron cultivos primarios de los queratinocitos con el MQ, descrito en **Materiales y Métodos**, con y sin toxina colérica (descrito en la literatura) y con dos medios comerciales *EpiGRO*TM (07 y 57), utilizando como referencia la proliferación celular obtenida con el MQ sin toxina. Los resultados obtenidos demuestran que, aunque cuando se añadió toxina colérica al medio MQ la proliferación a los 4 días fue un $10,72 \pm 10,27\%$ mayor que con el MQ sin toxina, a partir de ahí la proliferación disminuyó hasta un $53,57 \pm 6,11\%$ a los 10 días. Con los medios comerciales la proliferación fue menor en todos los casos disminuyendo a los 10 días hasta un $22,96 \pm 3,50\%$ y $20,41 \pm 4,25\%$ con el medio comercial *EpiGRO*TM 07 y 57 respectivamente (Figura R1).

El descenso de la proliferación en los casos en los que utilizamos el MQ y el MQ con la toxina colérica puede deberse a que los queratinocitos alcanzaron el máximo pico de proliferación a los 4 días y entre los 6 y 10 días alcanzaron la confluencia parando de proliferar. Con ambos medios comerciales sin embargo, el pico de máxima proliferación lo alcanzaron a los 6 días, tardando un poco más de tiempo en activarse y a los 10 días volvió a disminuir la proliferación. En vista de los resultados obtenidos aunque con el MQ con la toxina colérica a los 4 días la proliferación fuera ligeramente mayor que sin ella, debido a su posible toxicidad, y a que esta diferencia no se mantenía a lo largo del cultivo, se decidió utilizar el medio MQ para cultivar los queratinocitos en el resto de los experimentos.

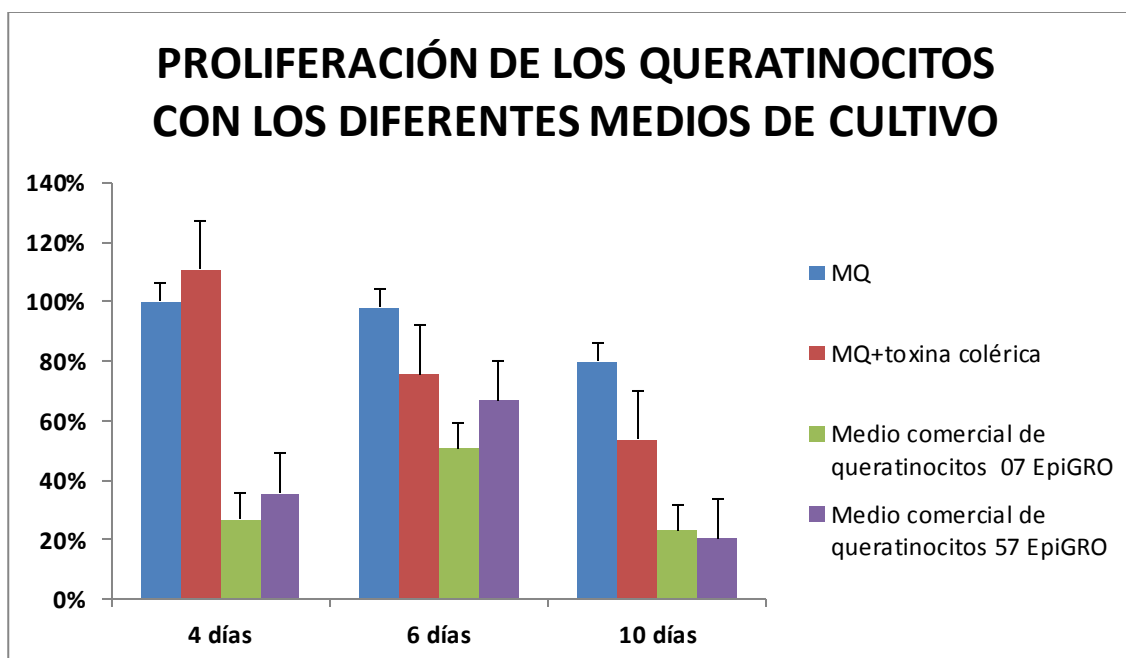


Figura R1: Comparación de la proliferación con los distintos medios de cultivo para queratinocitos con respecto al MQ (n=5). Se representan las medias y la desviación típica de los valores.

1.2. Cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos

Una vez procesada cada una de las biopsias se obtuvieron las poblaciones de fibroblastos y queratinocitos.

Los fibroblastos sembrados y cultivados con MF alcanzaron la confluencia a los 5-6 días (Figura R2a). Estas células que presentaron una elevada capacidad de proliferación, mostraron un citoplasma en forma de huso con largas y delgadas proyecciones, típica morfología fibroblástica, expresando además el antígeno vimentina, marcador de células mesenquimales (Figura R2c) pero no CK, marcador de células epiteliales (Figura R2e).

Los queratinocitos cultivados con MQ, el primer día mostraron una forma de huso ancho y corto pero entre los días 3-4, se pudieron ver colonias de células con morfología poligonal que se dispusieron en empalizada, con núcleos redondos y centrados que proliferaban e iban desplazando a las células 3T3 irradiadas de la superficie del frasco de cultivo alcanzando la confluencia entre los 10-12 días (Figura R2b). Estos queratinocitos expresaron CK, (Figura R2f) pero no vimentina (Figura R2d).

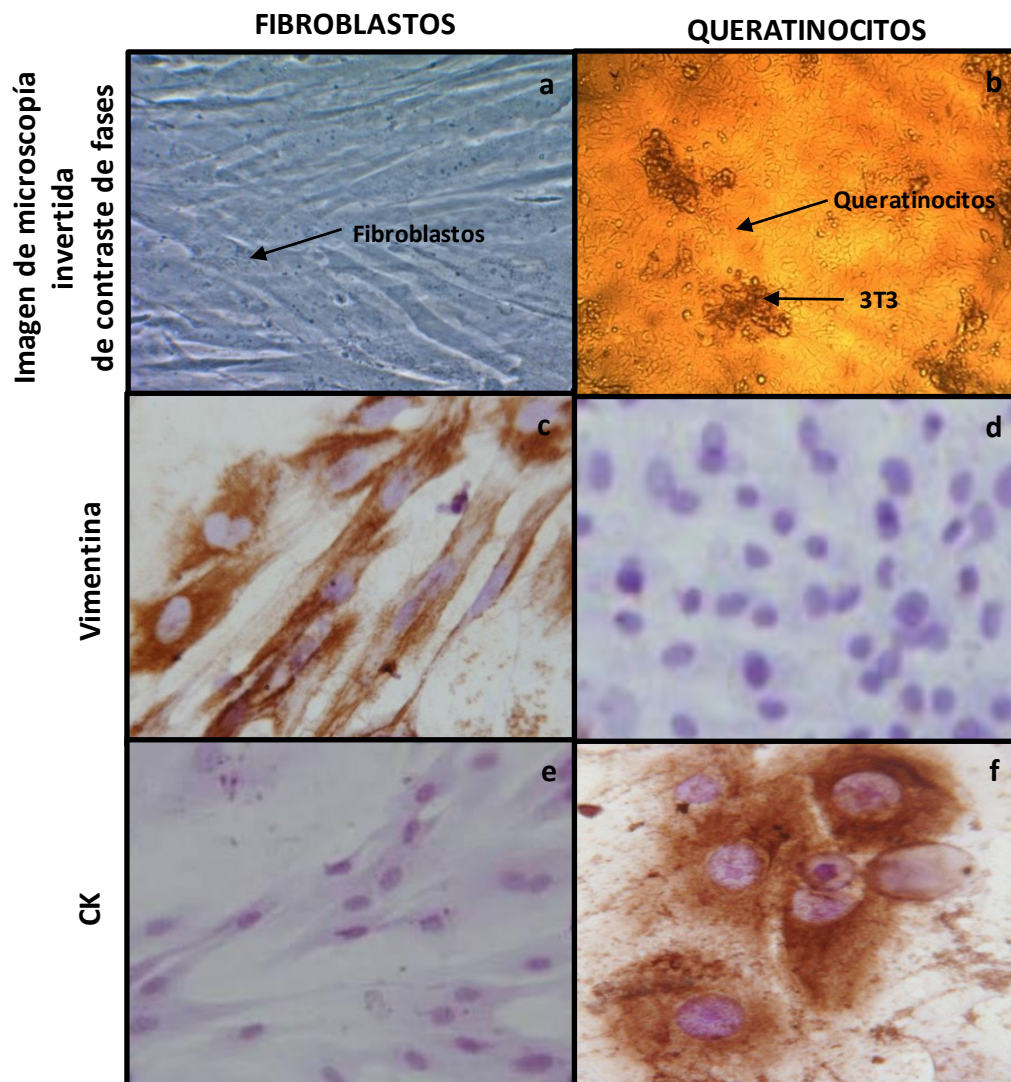


Figura R2: Cultivo primario de fibroblastos y queratinocitos. Imagen de microscopía invertida de contraste de fases del cultivo de los fibroblastos (a) y queratinocitos (b) a los 5 días. Inmunocitoquímica para detectar la expresión de vimentina en los fibroblastos (c) y en los queratinocitos (d) y para detectar la expresión de CK en los fibroblastos (e) y en los queratinocitos (f). 200X (b) y 400X (a y c-f).

2. Construcción de un equivalente de piel usando fibrina obtenida a partir de plasma humano como soporte (modelo *in vitro*)

Una vez obtenidas las poblaciones de fibroblastos y queratinocitos en número suficiente a partir de los cultivos primarios (pase 1 o 2), se procedió a la construcción de los equivalentes de piel utilizando como equivalente de la dermis a los fibroblastos cultivados en una matriz de fibrina y como epidermis a los queratinocitos cultivados sobre el gel.

Para la obtención de la fibrina, se utilizaron como fuente diferentes plasmas humanos (n=10). La concentración de fibrinógeno de los plasmas utilizados varió entre 1,63-2,5 mg/ml siendo la media $2,08 \pm 0,26$ mg/ml. Primero se realizaron pruebas para determinar cuál sería la concentración de fibrinógeno óptima para la síntesis de los

Resultados

equivalentes de piel sin que estos sufrieran roturas. Tras obtener 40 equivalentes de piel con los 10 plasmas de donantes diferentes, se determinó que la concentración adecuada se encontraba en torno a 40-50 mg/lámina (Figura R3a).

Los fibroblastos sembrados en el interior del gel de fibrina fueron capaces de adherirse a las proteínas de este gel, observándose a las pocas horas una apariencia bipolar con la emisión de prolongaciones alargadas desde el cuerpo celular disponiéndose en monocapa (Figura R3a). Con el transcurso de los días, se pudo observar con el microscopio invertido de contraste de fases el aumento progresivo del número de fibroblastos presentes en la dermis y como éstos migraban y se disponían en múltiples estratos (Figura R3b).

En cuanto a los queratinocitos sembrados sobre este gel de fibrina con fibroblastos, fueron capaces de adherirse a la superficie del gel a las 24 h después de haberlos sembrado a una densidad 1/5 y formaron colonias alcanzando la confluencia entre 11-14 días con el MQ (Figura R3c).

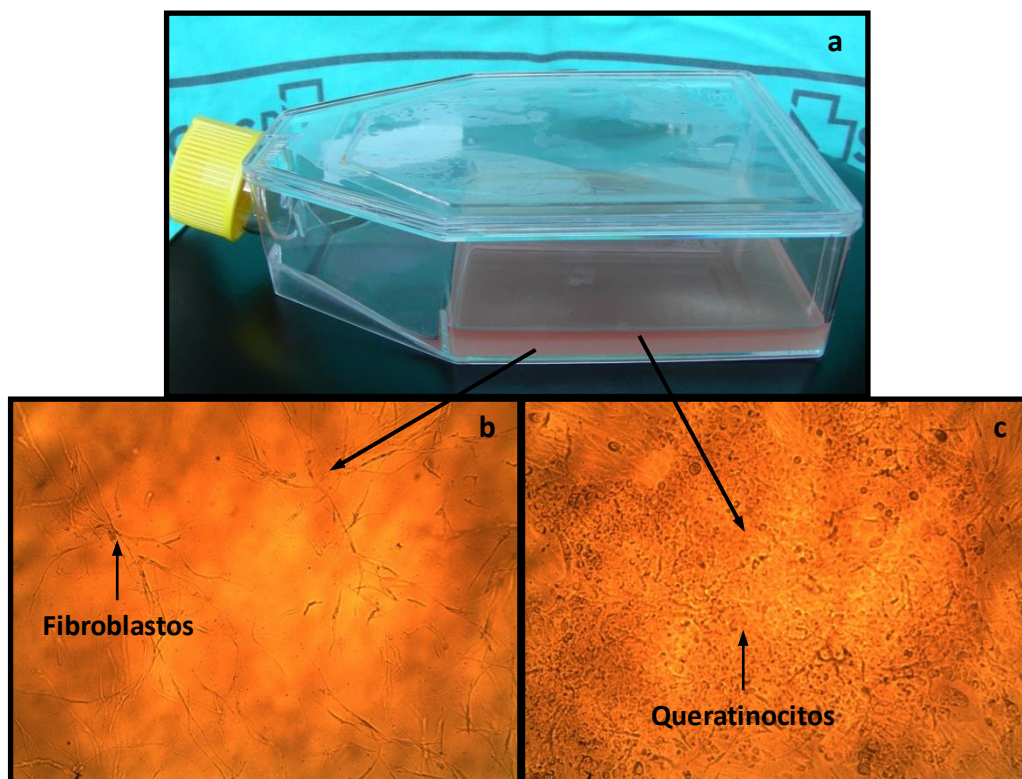


Figura R3: Equivalente de piel *in vitro*. Equivalente de piel cultivado en el frasco de cultivo (a). Imagen de microscopía de contraste de fases de la matriz de fibrina conteniendo a los fibroblastos (b) y de los queratinocitos sembrados sobre la superficie de la matriz de fibrina a los 14 días de cultivo (c). 400X (a y c).

En ninguno de los equivalentes de piel se apreció retracción significativa, de tal manera que la superficie inicialmente cultivada fue la obtenida. Se pudieron despegar del frasco de cultivo de forma manual sin el uso de enzimas y una vez despegado el equivalente de piel mostró buena flexibilidad pudiéndolo manipular fácilmente.

Aproximadamente el tiempo necesario para la obtención del equivalente de piel osciló entre 25 y 32 días. Este período de tiempo comprendió desde la recepción y el procesamiento de la biopsia hasta la confluencia del cultivo de queratinocitos sobre la dermis de fibrina y fibroblastos.

2.1. Análisis histológico del equivalente de piel *in vitro*

La caracterización histológica inicial del equivalente de piel *in vitro* se realizó con diversas tinciones de una porción representativa incluida en parafina.

El análisis histoquímico con la tinción con H-E (Figura R4a) evidenció a los 11-14 días la existencia de dos estructuras completamente diferentes: una epidermis delgada formada por 1-2 láminas y una dermis densa. La epidermis constó de un estrato basal y un estrato suprabasal. El estrato basal estaba formado por células cuboides, en algunas de ellas se observaron mitosis con núcleos localizados centralmente y nucléolos fácilmente visibles (Figura R4a flecha). Las células mostraron una interacción activa con la fibrina de la matriz, presentando como formaciones celulares que se proyectaban hacia ésta. El estrato espinoso en cambio estaba formado por células poliédricas, con núcleos que presentaron cromatina homogénea, sin nucléolos prominentes.

Para demostrar la presencia de las fibras de colágeno se empleó la tinción de tricrómico de Masson (Figura R4b). Los citoplasmas de las células de la epidermis y de la dermis se tiñeron de color rojo mientras que las fibras de colágeno de la dermis se tiñeron de azul. Con esta tinción se pudo observar en el equivalente de piel *in vitro* una matriz pobre en fibras de colágeno, sin vasos sanguíneos ni estructuras pilosebáceas. La mayoría de la matriz del equivalente de piel todavía estaba compuesta de fibrina. Para observar las fibras elásticas se empleó la tinción de hematoxilina de Verhoeff que las teñiría de negro. En nuestro equivalente de piel *in vitro* a los 11-14 días aún no se pudieron apreciar estas fibras (Figura R4c).

El análisis inmunohistoquímico mostró la presencia de una capa de queratinocitos, mono o biestratificada, que reaccionaron con el anticuerpo que detecta el antígeno CK (AE1/AE3) (Figura R4d). El anticuerpo AE1 reconoció la mayor parte de las CK de la subfamilia ácida y el anticuerpo AE3 a todos los miembros de la subfamilia básica. El estrato basal expresó K14 (Figura R4e) y los estratos suprabasales expresaron K10 (Figura R4f) pero no involucrina (no existe aún diferenciación celular) (Figura R4g).

En cuanto a la expresión de otros componentes, se detectó en la membrana basal una ligera tinción para la laminina (Figura R4h recuadro) y en la dermis, los fibroblastos expresaron vimentina (Figura R4i). Por último, tratamos de identificar la presencia de melanocitos analizando la expresión de tres antígenos específicos, melan-A, tirosinasa y la proteína S100, con resultados negativos (Figura R4j, j y k), lo que parece indicar la ausencia de melanocitos en el equivalente de piel *in vitro*.

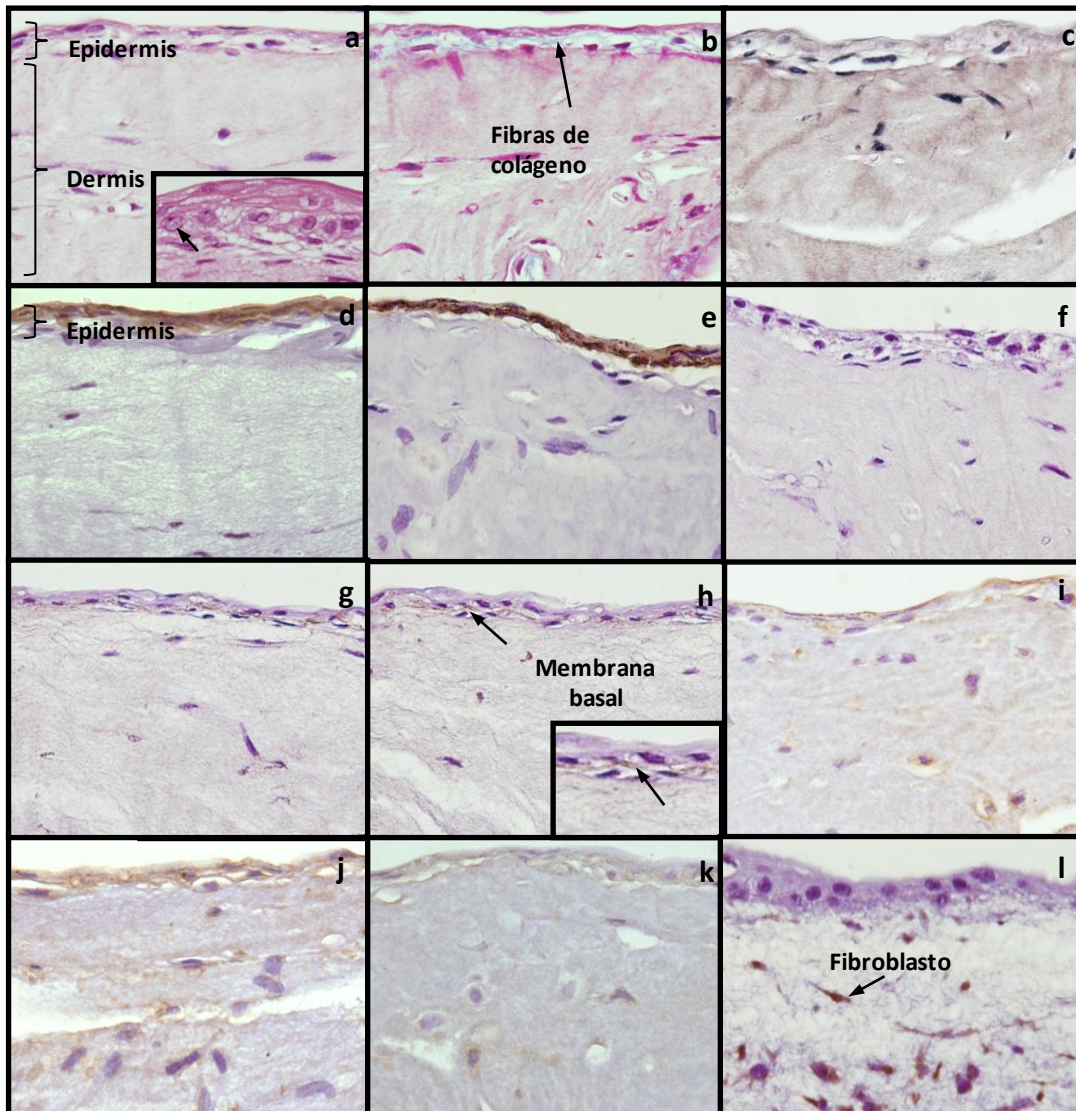


Figura R4: Caracterización histológica de una zona representativa del equivalente de piel *in vitro*. Análisis histoquímico con la tinción de H-E (flecha: señala los nucléolos) (a), tricrómico de Masson (b) y hematoxilina de Verhoeff (c). Análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia de CK (d), K14 (e), K10 (f), involucrina (g), laminina (recuadro: ampliación de la membrana basal) (h), melan-A (i), tirosinasa (j), S100 (k) y vimentina (l). 400X.

2.2. Trasplante experimental del equivalente de piel (modelo *in vivo*)

Para analizar la capacidad del equivalente de piel *in vitro* de actuar como un injerto viable en un modelo *in vivo*, se utilizaron ratones *Athymic Nude-Foxn1 nu/nu*.

Para ello se realizaron dos experimentos por separado:

| EXPERIMENTO | Nº de ratones | | | SACRIFICIO |
|-------------|------------------------|--|---------|------------|
| | CONTROL sin injerto | CONTROL autoinjerto de su propia piel | INJERTO | |
| A | 1 | - | 4 | 21 días |
| B | 1 | 1 | 4 | 4 meses |

Tabla R1: Condiciones de los experimentos A y B del modelo *in vivo*.

Trascurrido el tiempo post-injerto indicado en cada experimento se analizaron diferentes parámetros:

2.2.1. Análisis macroscópico del trasplante experimental

Para estudiar la evolución a nivel macroscópico del trasplante de los injertos en el modelo animal se observó el estado de la curación de la herida después del trasplante.

Tanto a los 21 días como a los 4 meses la supervivencia de los injertos fue del 100%. No hubo rechazo ya que no se observaron zonas necróticas. A los 21 días cuando se recuperaron los injertos, las heridas ya se habían curado y a los 4 meses se integraron perfectamente en el ratón.

En el experimento A, se analizó el injerto a los 21 días. Todos los injertos del equivalente de piel que se realizaron en los ratones sobrevivieron y prendieron en el lecho de la herida. El aspecto macroscópico mostró una región costrosa central necrotizada en la región superior de la espalda injertada que se correspondió con el injerto de piel desvitalizada del ratón que se colocó como apósito y que no se desprendió en su totalidad debido a las suturas que aún no se habían reabsorbido, dando la impresión de desprenderse fácilmente (Figura R5a). El aspecto exterior de la zona injertada fue el de una piel algo enrojecida y un poco más adelgazada que la piel de alrededor, con cierta retracción (Figura R5b). Al extraer el injerto incluyendo piel sana adyacente, al liberarla de los planos profundos, se observó que estaba adherida sobre todo en el tramo central, pero se consiguió liberarla fácilmente con ayuda de unas tijeras. Al analizar con la lupa el injerto extraído, se observó que la parte exterior estaba algo adelgazada, eritematosa y retraída. Interiormente, la estructura dérmica se conservó y presentó un marcado color blanquecino. La elasticidad y textura fue muy similar a la de la piel circundante.

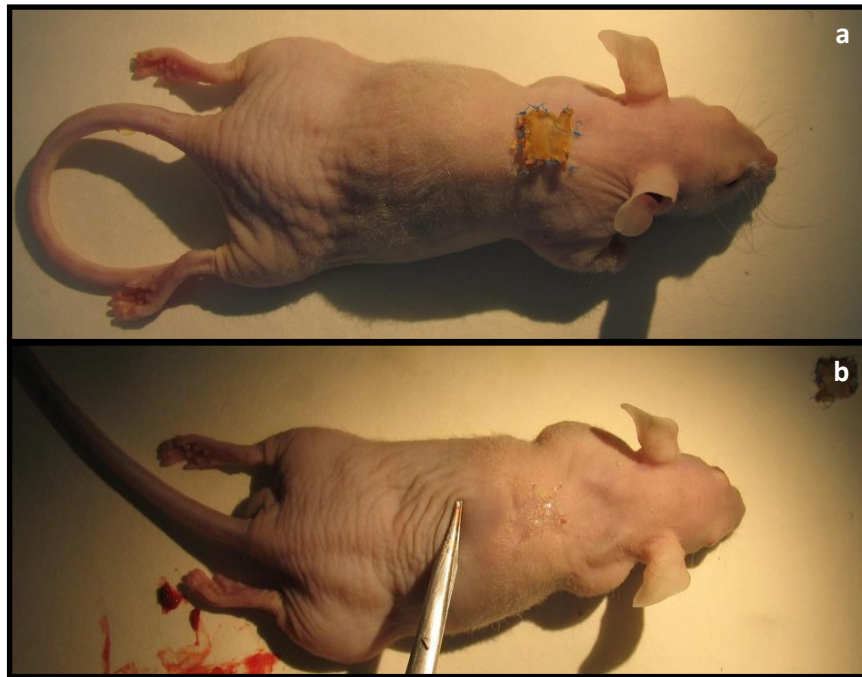


Figura R5: Aspecto macroscópico del equivalente de piel tras 21 días del trasplante en un ratón representativo. Observación de la piel de ratón desvitalizada colocada como apósito que no se desprendió (a). Observación de la buena integración del injerto del equivalente de piel en el modelo animal (b).

En el experimento B, se analizó el injerto a los 4 meses. Resultó difícil distinguir donde se realizaron los injertos porque tampoco se vieron los bordes muy retraídos (Figura R6a). No hubo rechazo inmune, sangrado ni infección. La porción del equivalente de piel humana regenerada en el ratón se extrajo fácilmente de los planos profundos ya que no estaba adherida y se movía libremente sobre la fascia dorsal (Figura R6b). Al observar con la lupa el segmento extraído, tampoco se vieron diferencias con la piel del ratón adyacente. El color, la elasticidad y textura fue muy similar a la de la piel del ratón.

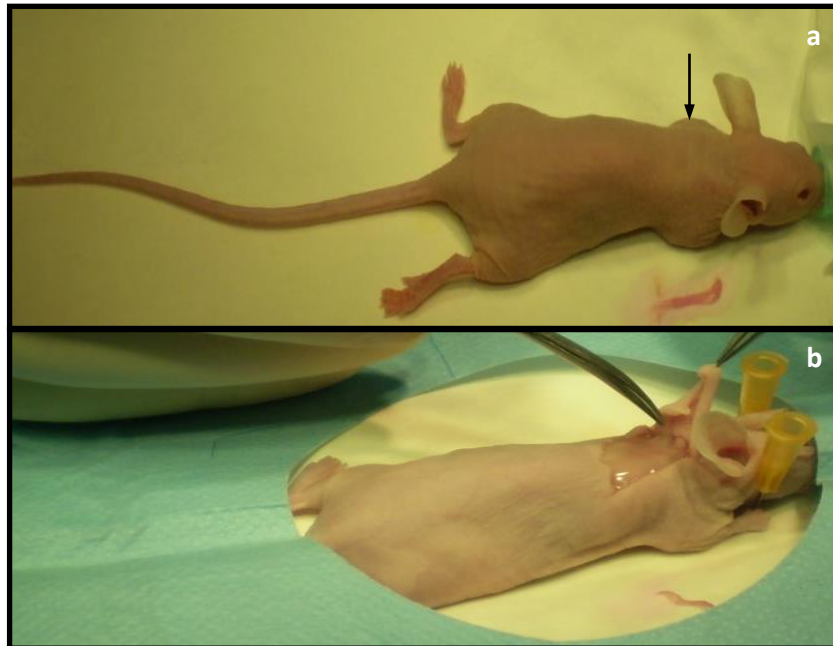


Figura R6: Aspecto macroscópico del equivalente de piel tras 4 meses del trasplante en un ratón representativo. Observación de la buena integración del injerto del equivalente de piel en el modelo animal (a). Extracción del injerto para su posterior análisis histológico (b)

2.2.2. Análisis histológico de los injertos trasplantados

Para analizar de forma conveniente los injertos de los equivalentes de piel humana en los ratones, se realizaron, en paralelo, como controles los mismos análisis histoquímicos, inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia con piel control humana y de ratón utilizados en cada grupo.

2.2.2.1. Piel control

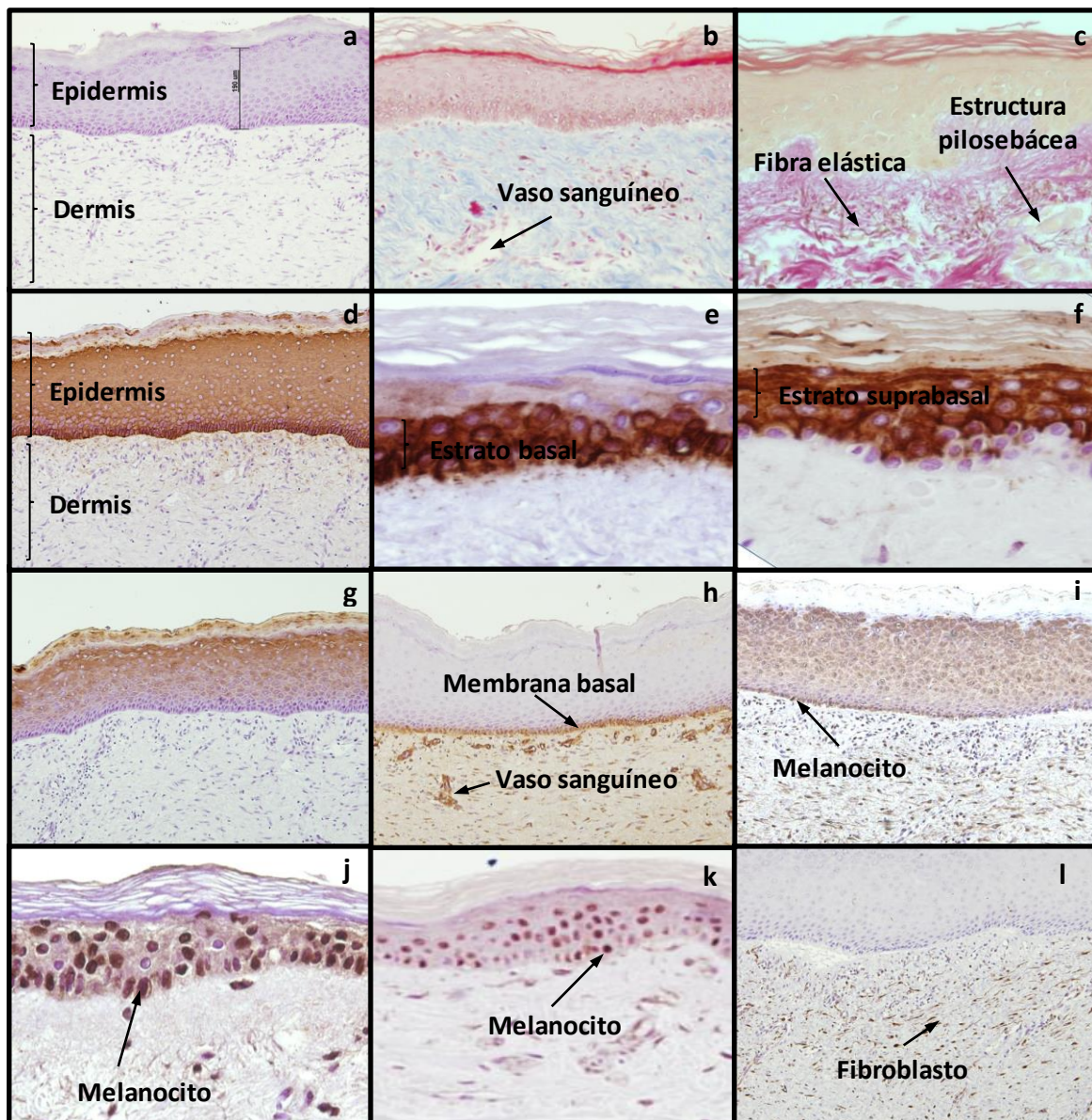
* Piel control humana

Con la tinción H-E se pudo observar claramente una epidermis con cuatro estratos, con distinta morfología y características, y una dermis por debajo. Los estratos de la epidermis de la piel de los humanos se ven mejor en la piel gruesa (Figura R7a) que en la piel fina (Figura R7b). El estrato basal presentó células cúbicas o cilíndricas bajas formando una sola capa que expresaron K14 (Figura R7e). Otras células que se pudieron identificar fueron los melanocitos de aspecto redondeado con un citoplasma poco teñido que expresaron melan-A, tirosinasa y S100 (Figura R7i-k).

En el estrato espinoso las células con forma poliédrica, nucléolos prominentes y basofilia citoplasmática expresaron K10 (Figura R7f). En el estrato granuloso las células se caracterizaron por poseer numerosos gránulos densos y basófilos de queratohialina que ocuparon el citoplasma y expresaron involucrina (Figura R7g). El estrato córneo se correspondió con los restos aplanados y fusionados de las células que expresaron involucrina (Figura R7g).

Resultados

Bajo la epidermis separada por la membrana basal que expresó laminina que también identificó a los vasos sanguíneos en la dermis (Figura R8h), se encontró una dermis poblada de fibroblastos que expresaron vimentina (Figura R8l). Con las tinciones de tricrómico de Masson y hematoxilina de Verhoeff se pudieron diferenciar una dermis papilar laxa y rica en fibras de colágeno muy finas y entrelazadas y con escasas fibras elásticas y una dermis reticular formada por haces irregulares de colágeno y fibras elásticas largas y gruesas (Figura R8b y c). En la dermis también se pudieron observar estructuras pilosebáceas (Figura R7c).



*** Piel control de ratón**

La piel de ratón es diferente a la humana. Con la tinción de H-E se pudo observar también claramente una epidermis y una dermis por debajo, pero la epidermis era mucho más fina que la humana, solamente formada por dos estratos y relativamente lisa (Figura R8a). El estrato basal presentó células cúbicas formando solo una capa expresando K14 (Figura R8e). El estrato suprabasal también estaba formado por células cúbicas que expresaron K10 (Figura R8f). En cuanto a los melanocitos, al ser los anticuerpos utilizados para detectar los antígenos melan-A (Figura R8i) tirosinasa (Figura R8j) y S100 (Figura R8k), específicos de humanos, los resultados fueron negativos. Bajo la epidermis se encontró una dermis poblada de fibroblastos que expresaron vimentina (Figura R8l) separada por una membrana basal aunque no se detectó la expresión de laminina debido a que el anticuerpo utilizado es específico de humanos (Figura R8h). De la dermis se puede decir que es una matriz rica en fibras de colágeno (Figura R8b), no detectando fibras elásticas con la tinción de hematoxilina de Verhoeff ya que éstas debían ser muy finas (Figura R8c). A diferencia de la piel humana no se pudo diferenciar la dermis papilar de la reticular. Presenta una gran cantidad de estructuras pilosebáceas y vasos sanguíneos (Figura R8a y b), al contrario que en la piel de humanos que tiene estas estructuras muy esparcidas.

Debajo de la dermis se pudo observar la hipodermis formada por adipocitos (Figura R8b).

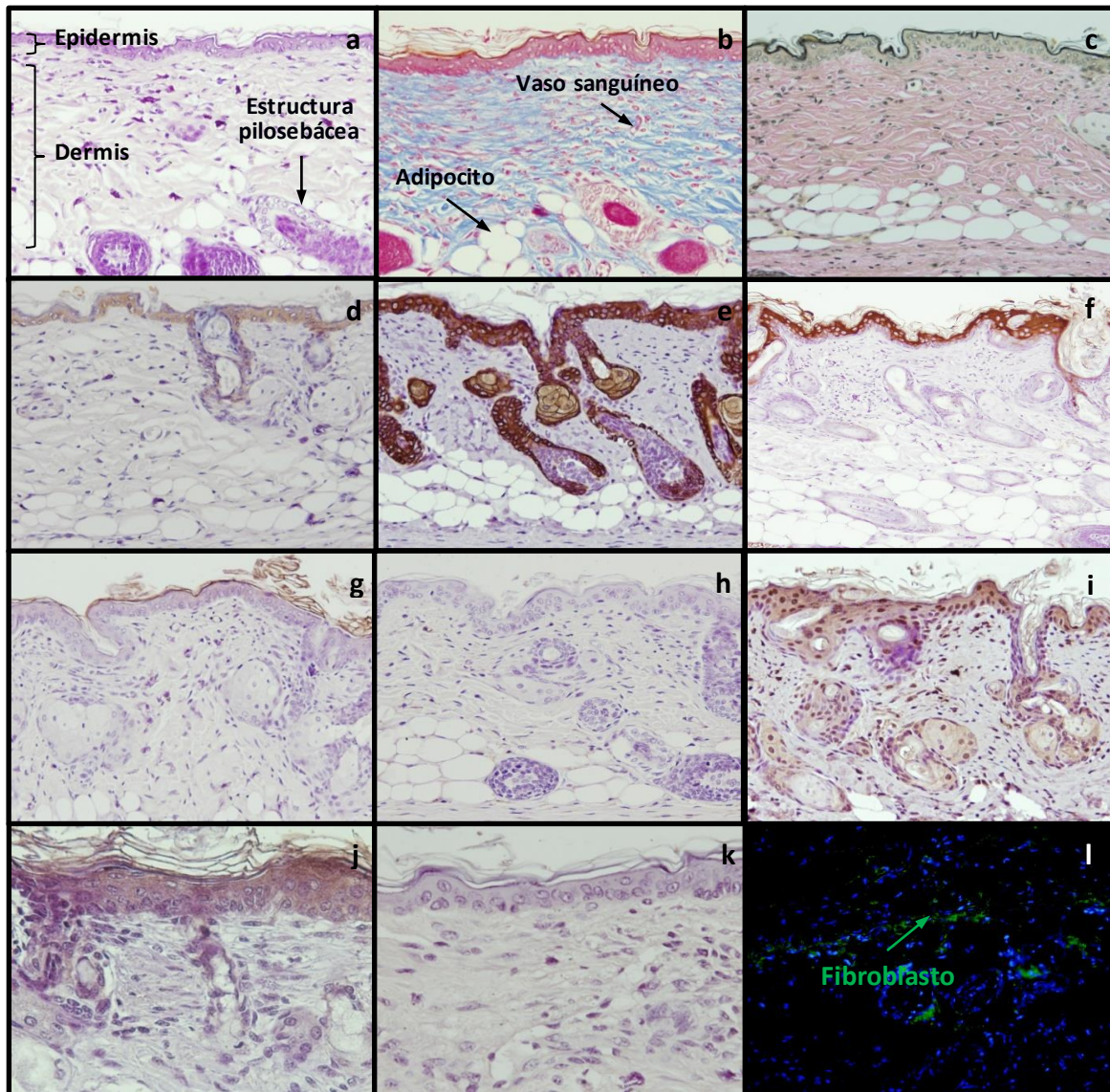


Figura R8: Análisis histológico de la piel del ratón control. Análisis histoquímico con la tinción de H-E (a), tricrómico de Masson (b) y hematoxilina de Verhoeff (c). Análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia de CK (d), K14 (e), K10 (f), involucrina (g), laminina (h), melan-A (i), tirosinasa (j) y S100 (k). Análisis de inmunofluorescencia para detectar vimentina (l). 400X (a-k) y 200X (l).

***Piel control de ratón autoinjertada**

La piel control de ratón autoinjertada fue similar a la piel control de ratón. Al igual que la piel control de ratón, con la tinción de H-E se pudo observar una epidermis delgada y una dermis por debajo (Figura R9a). El estrato basal presentó células cúbicas formando solo una capa expresando K14 (Figura R9e). El estrato suprabasal también estaba formado por células cúbicas que expresaron K10 (Figura R9f). De nuevo los melanocitos no se pudieron detectar por la ausencia de reconocimiento de los anticuerpos empleados por los antígenos equivalentes en el ratón tales como melan-A (Figura R9i), tirosinasa (Figura R9j) y S100 (Figura R9k).

Resultados

Al igual que la piel control de ratón, la dermis constituida por fibroblastos que expresaron vimentina (Figura R10l), estaba separada por una membrana basal no detectable por el anticuerpo que detecta la expresión del antígeno laminina humana (Figura R10h). La dermis poseía fibras de colágeno (Figura R10b), pero no se detectaron fibras elásticas con la tinción de hematoxilina de Verhoeff ya que éstas debían ser muy finas (Figura R9c). Presenta una gran cantidad de estructuras pilosebáceas y vasos sanguíneos (Figura R9a y c). Debajo de la dermis se pudo observar la hipodermis formada por adipocitos (Figura R9b).

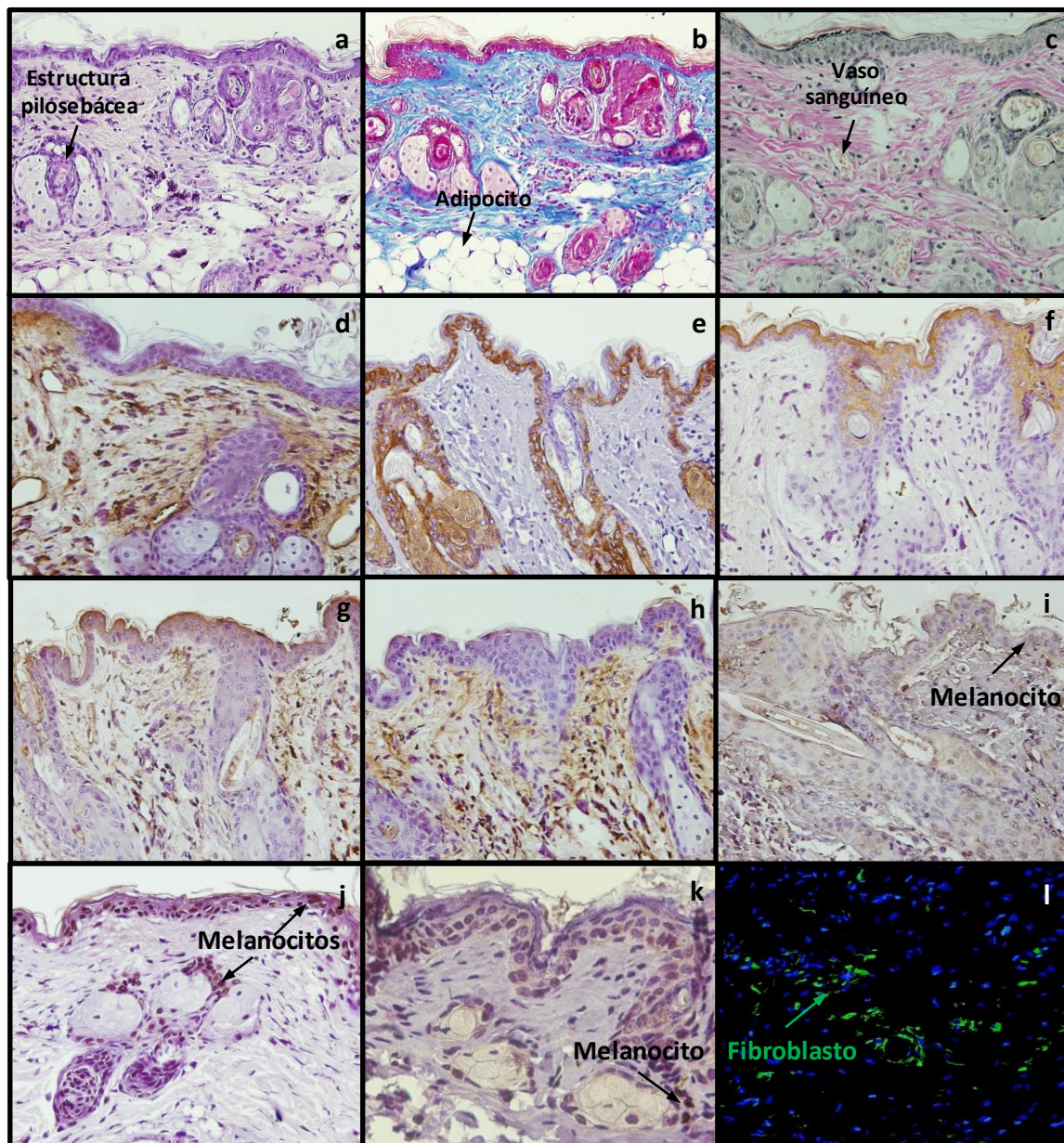


Figura R9: Análisis histológico de la piel control de ratón autoinjertado. Análisis histoquímico con la tinción de H-E (a), tricrómico de Masson (b) y hematoxilina de Verhoeff (c). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de CK (d), K14 (e), K10 (f), involucrina (g), laminina (h), melan-A (i), tirosinasa (j) y S100 (k). Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de vimentina (l). 400X (a-k) y 200X (l).

2.2.2.2. Injertos de los equivalentes de piel en los dos experimentos de ratones

Para el análisis microscópico de los injertos en los dos experimentos de ratones se analizaron en cada uno de ellos dos zonas por separado: la zona de unión injerto humano-piel de ratón y la zona del injerto. A continuación se describen los resultados obtenidos en un animal representativo de cada experimento en ambas zonas.

*** Experimento A:**

- Zona de unión injerto humano-piel de ratón

Mediante la tinción de tricrómico de Masson se pudo ver una zona más engrosada sin crestas epidérmicas (pero que se estaban empezando a formar) con abundantes fibras de colágeno y con la formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura R10a). Las fibras de colágeno en la dermis estaban dispuestas paralelamente a la epidermis indicando la incorrecta maduración de la herida. La unión epidermis-dermis fue plana. No existió evidencia de infiltración de células inflamatorias. La infiltración de las células inflamatorias se observaría con la formación de una banda edematosa entre la epidermis y la dermis, indicando el rechazo del implante que se acabaría separando la epidermis de la dermis. Con el anticuerpo que detecta el antígeno involucrina se pudo localizar la zona injertada ya que el anticuerpo reconoce sólo la zona humana (Figura R10b), con el anticuerpo que detecta el antígeno K10, que tiñe tanto humano como ratón, se pudo observar que la epidermis del injerto fue más gruesa que la del ratón (Figura R10c) y con el anticuerpo que detecta el antígeno laminina, que también solo reconoce lo humano, se observó la profundidad del injerto en la dermis (Figura R10d).

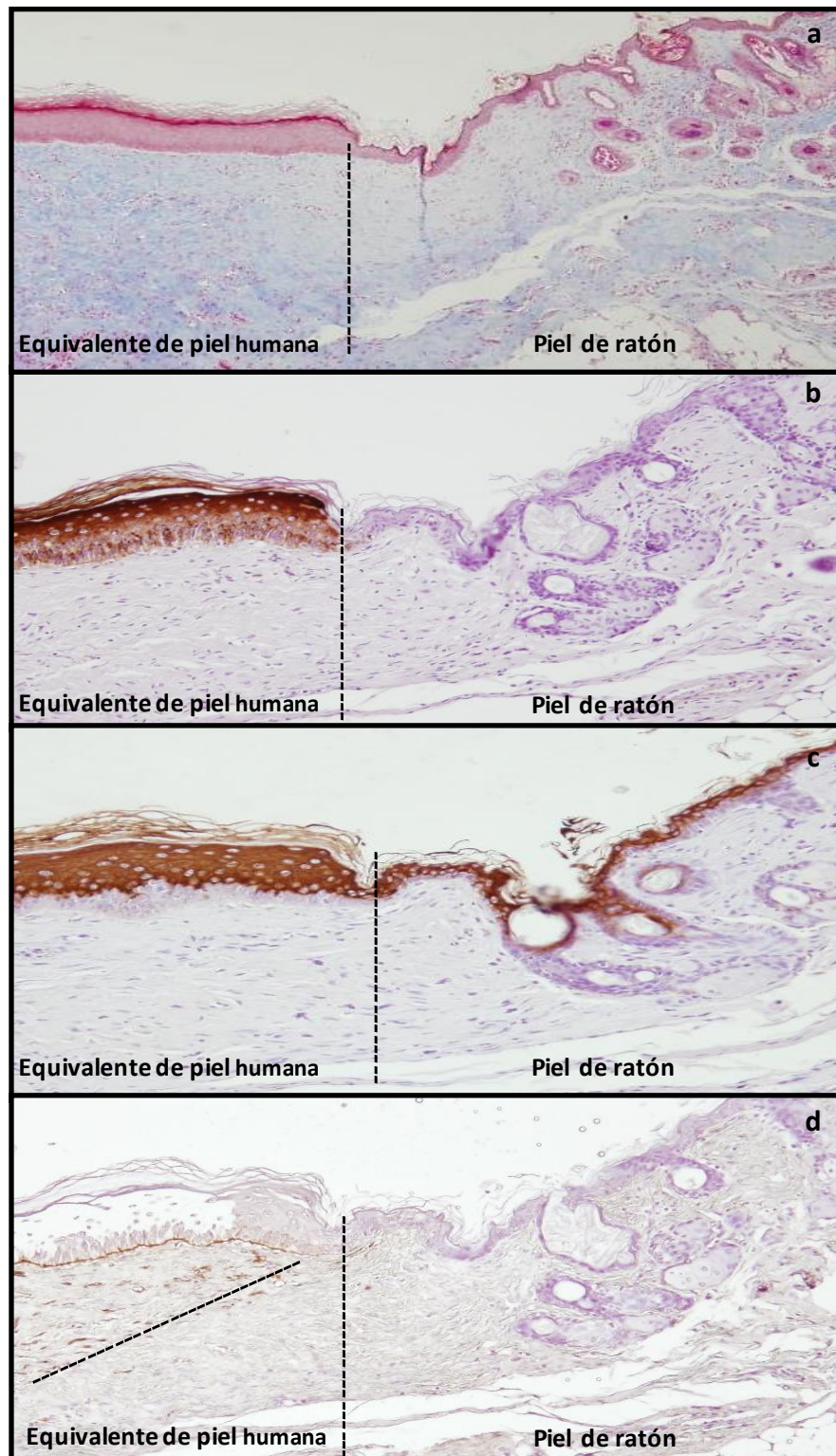


Figura R10: Región injerto (izquierda)-ratón (derecha) tras 21 días del trasplante en un ratón representativo. Análisis histoquímico con tricrómico de Masson (a). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de involucrina (b), K10 (c) y laminina (d). Las líneas discontinuas separan el equivalente de piel humana injertado de la piel del ratón. 40X.

- Zona del injerto

A los 21 días, el injerto desarrolló una epidermis estratificada y diferenciada y una dermis claramente definida con muchas de las características morfológicas de la piel intacta (Figura R11a).

La epidermis constó de un estrato basal formado por una hilera de células columnares que expresaron K14 (Figura R11e). Las células de los estratos suprabasales expresaron K10 (Figura R11f) e involucrina (Figura R11g). Las uniones intercelulares fueron visibles entre los queratinocitos en el estrato espinoso (Figura R11i recuadro). Las células en el estrato granular fueron aplanadas y con gránulos oscuros y las células en el estrato córneo mostraron escamas de queratina largas y planas.

Los fibroblastos y queratinocitos ya sintetizaron la membrana basal detectada por la expresión de laminina (Figura R11h) y también el injerto presentó melanocitos demostrado por expresión de melan-A (Figura R11i), tirosinasa (Figura R11j) y S100 (Figura R11k).

Mediante inmunofluorescencia se vió que la epidermis se encontró sobre una dermis de fibroblastos que expresaron vimentina (Figura R11m) y que sintetizaron fibras de colágeno delgadas que se dispusieron paralelamente formando una red subepidermal (Figura R11b y c) bien vascularizada pero sin folículos pilosos ni fibras elásticas gruesas (Figura R11c).

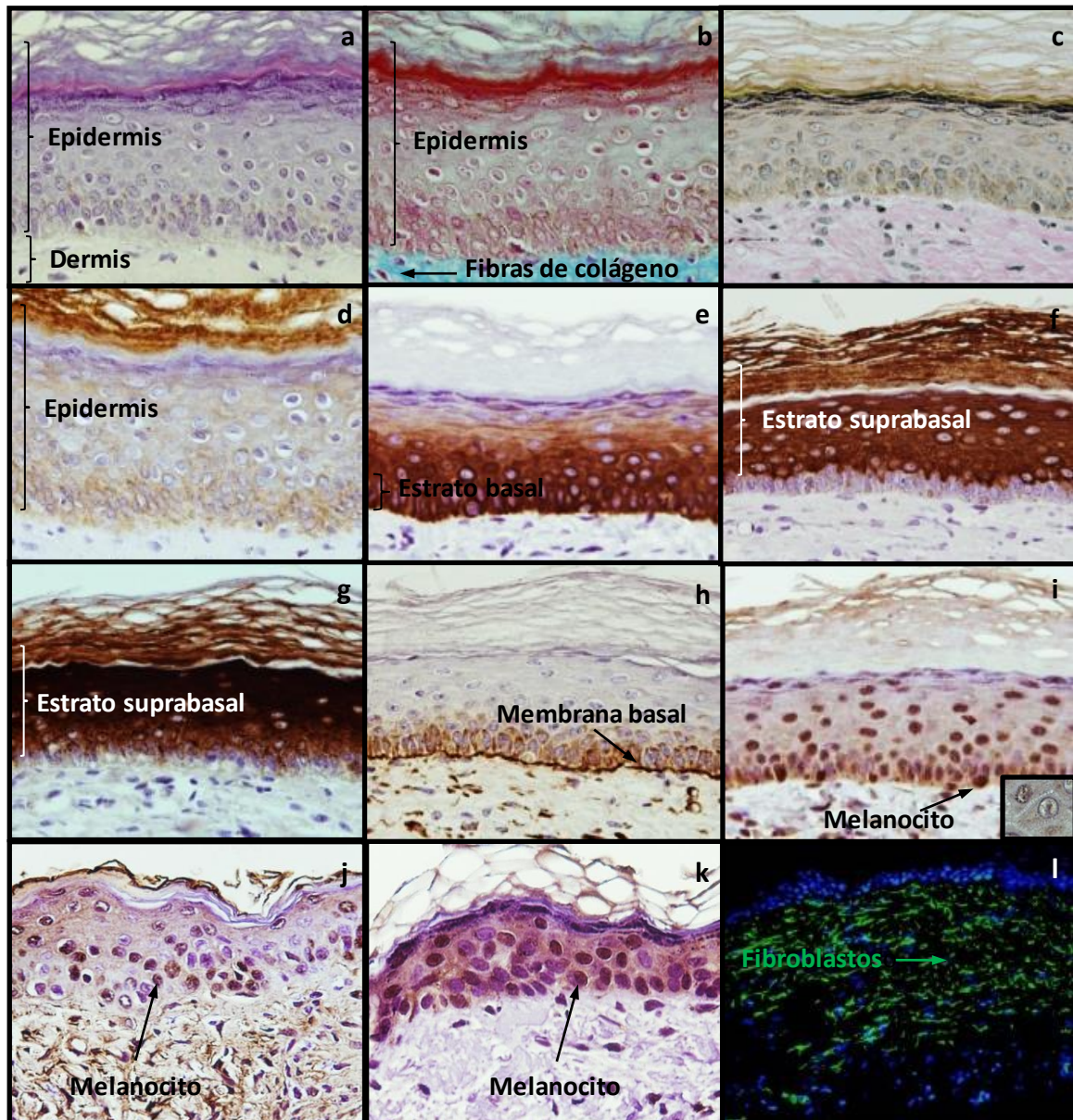


Figura R11: Análisis histológico del injerto 21 días después del trasplante en un ratón representativo. Análisis histoquímico con la tinción de H-E (a), tricrómico de Masson (b) y hematoxilina de Verhoeff (c). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de CK (d), K14 (e), K10 (f), involucrina (g), laminina (h), melan-A (i) (recuadro: detalle de las uniones intercelulares), tirosinasa (j) y S100 (k). Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de vimentina (l). 400X (a-k) y 200X (l).

Experimento B:

- Zona de unión injerto humano–piel de ratón

La epidermis más delgada que a los 21 días, formada por 2-4 estratos adquirió el mismo fenotipo que la piel del ratón. Las fibras de colágeno fueron más gruesas y no se dispusieron tan paralelamente, sino formando bucles (Figura R12a) indicando la maduración de estas fibras.

Con los anticuerpos que detectan la expresión del antígeno involucrina y de la laminina, respectivamente, ya no se pudo localizar la zona injertada ya que ambos anticuerpos reconocen solo la parte humana aunque si intuir (Figura R12b y d, líneas discontinuas). Sin embargo, con el anticuerpo que detecta la expresión del antígeno K10 que reconoce tanto el antígeno humano como el de ratón se pudo observar la continuidad de la epidermis del injerto con la del ratón (Figura R12c).

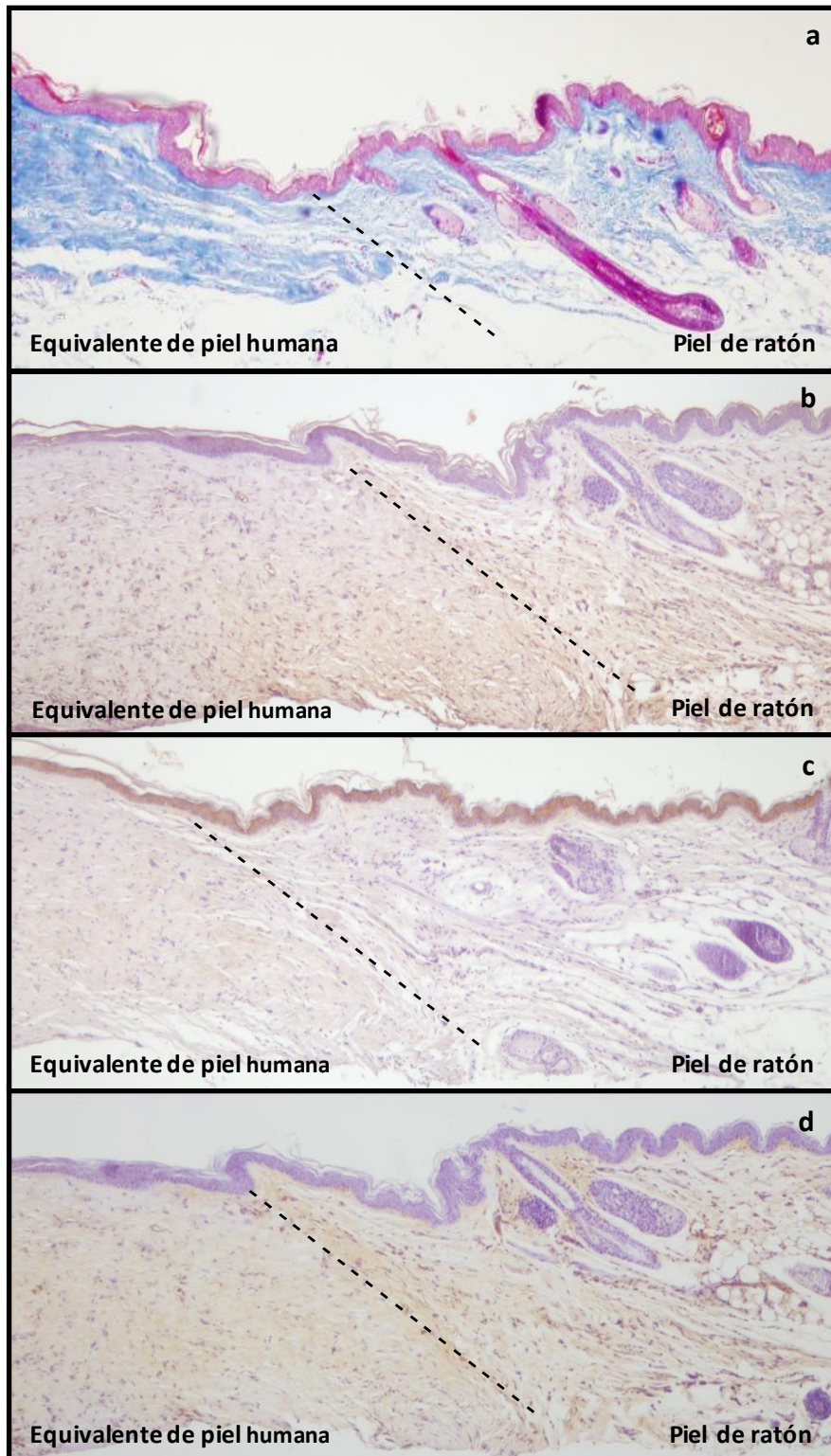


Figura R12: Región injerto (izquierda)-ratón (derecha) tras 4 meses del trasplante en un ratón representativo. Análisis histoquímico con tricrómico de Masson (a). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión involucrina (b), K10 (c) y laminina (d). Las líneas discontinuas separan el equivalente de piel humana injertada de la piel del ratón. 40X.

- Zona del injerto

La epidermis constó de un estrato basal que expresó K14 (Figura R13e) así como de un estrato suprabasal que expresó tanto K10 (Figura R13f) como involucrina (Figura R13g).

La membrana basal de origen humano que aparecía a los 21 días ya no está presente [ya no expresa el antígeno laminina humano (Figura R13h)], integrándose completamente en el ratón, y siendo reemplazada por una membrana basal sintetizada por los queratinocitos y fibroblastos murinos.

Se siguieron detectando melanocitos como se pudo observar con los anticuerpos que detectan la expresión de los antígenos melan-A (Figura R13i), tirosinasa (Figura R13j) y S100 (Figura R13k) que ya teñían los melanocitos en el ratón a los 21 días.

La dermis aún contenía fibroblastos humanos (Figura R13l) que seguían sintetizando las fibras de colágeno más gruesas que a los 21 días alineadas con las líneas de tensión (Figura R13b), con folículos pilosos y glándulas sebáceas pero sin fibras elásticas (Figura R13c y e). Se observaron unas pocas células inflamatorias en la dermis (Figura R13a) y mediante el anticuerpo que reconoce el antígeno S100 se pudieron observar nervios entre la dermis y el tejido adiposo (Figura R13k recuadro).

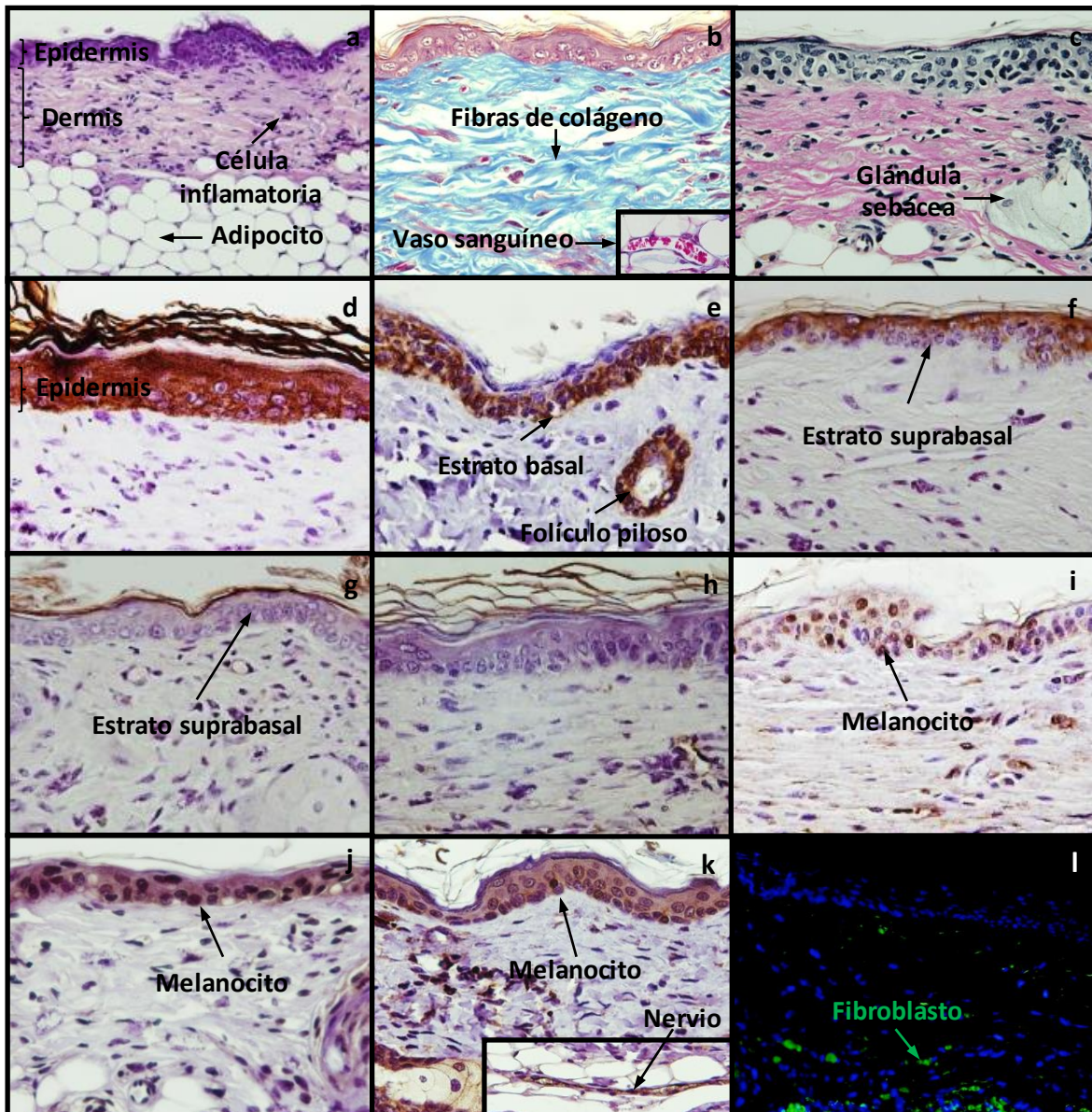


Figura R13: Análisis histológico del injerto 4 meses después del trasplante en un ratón representativo. Análisis histoquímico con las tinciones de H-E (a), tricrómico de Masson (recuadro: detalle vaso sanguíneo) (b) y hematoxilina de Verhoeff (c). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de CK (d), K14 (e), K10 (f), involucrina (g), laminina (h), melan-A (i), tirosinasa (j) y S100 (recuadro: nervio) (k). Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de vimentina (l). 400X (b-k) y 200X (a y l).

Resultados

Otro de los parámetros en el que nos fijamos fue en el grosor de la epidermis tanto en los equivalentes de piel *in vitro*, como en los controles e injertos.

Mediante la medida del grosor de la epidermis en las H-E anteriores se pudo observar que:

- La epidermis de los equivalente de piel *in vitro* fueron delgadas, con un grosor de 1-2 láminas ($9,89 \pm 0,63 \mu\text{m}$) (Figura R14d).

- A los 21 días cuando se extrajeron los injerto, la epidermis fue más gruesa, y constó de aproximadamente 10 láminas de queratinocitos bien organizados ($47,48 \pm 31,2 \mu\text{m}$) (Figura R14e). Este resultado se encuentra entre el grosor de la piel humana control gruesa ($232,2 \pm 35,75 \mu\text{m}$) (Figura R14a) y delgada ($35 \pm 1,54 \mu\text{m}$) (Figura R14b).

- A los 4 meses, el grosor epitelial del equivalente de piel injertado en los ratones fue similar a la piel de ratón adquiriendo su mismo fenotipo, con 2-4 láminas ($24,33 \pm 7,63 \mu\text{m}$) (Figura R14f) al igual que la epidermis de los ratones control ($22,06 \pm 4,33 \mu\text{m}$) (Figura R14c).

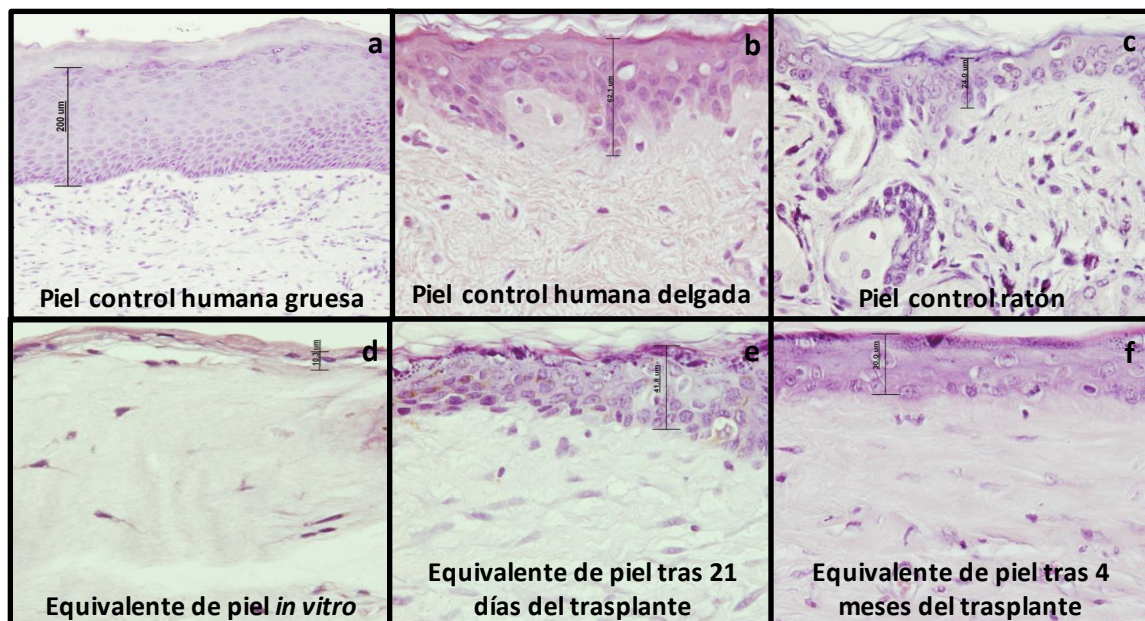


Figura R14: Grosor de la epidermis de las pieles control y de los equivalentes de piel *in vitro* y trasplantados en una zona representativa. Análisis histoquímico con la tinción de H-E de la piel de los controles de piel humana gruesa (a) y delgada (b) como de ratón (c) y de los equivalentes de piel *in vitro* (d) y después de 21 días (e) y 4 meses del trasplante (f). 40X.

2.2.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido

Este análisis solo se realizó en el caso de los ratones del Experimento B. Con MEB se observó que los injertos del equivalente de piel a los 4 meses no mostraron apenas diferencias cuando se compararon con la piel del ratón control como la del ratón control autoinjertado. Los resultados confirmaron los anteriores análisis histoquímicos, inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia. En todos los casos se pudo observar una dermis y una epidermis (Figura R15a-c).

La epidermis constó de numerosas células poligonales mostrando las mismas características de la superficie epidermal en empalizada de la piel humana nativa (Figura R15d-f). Después de 4 meses trasplantado, los equivalentes de piel ya presentaron algunos anejos cutáneos como folículos pilosos (Figura R15i) al igual que las pieles controles de los ratones (Figura R15g y h).

La dermis mostró fibras de colágeno como principal componente de la MEC sintetizadas por los fibroblastos (Figura R15j-ll), también se pudieron observar fibras elásticas al tener un mayor poder de resolución que con la tinción de hematoxilina de Verhoeff que no las detectaba (Figura R15m y n) y numerosos eritrocitos debido a que nuevos vasos sanguíneos se neosintetizaron y leucocitos en el caso del ratón injertado con el equivalente de piel a los 4 meses (Figura R15k, ñ-p).

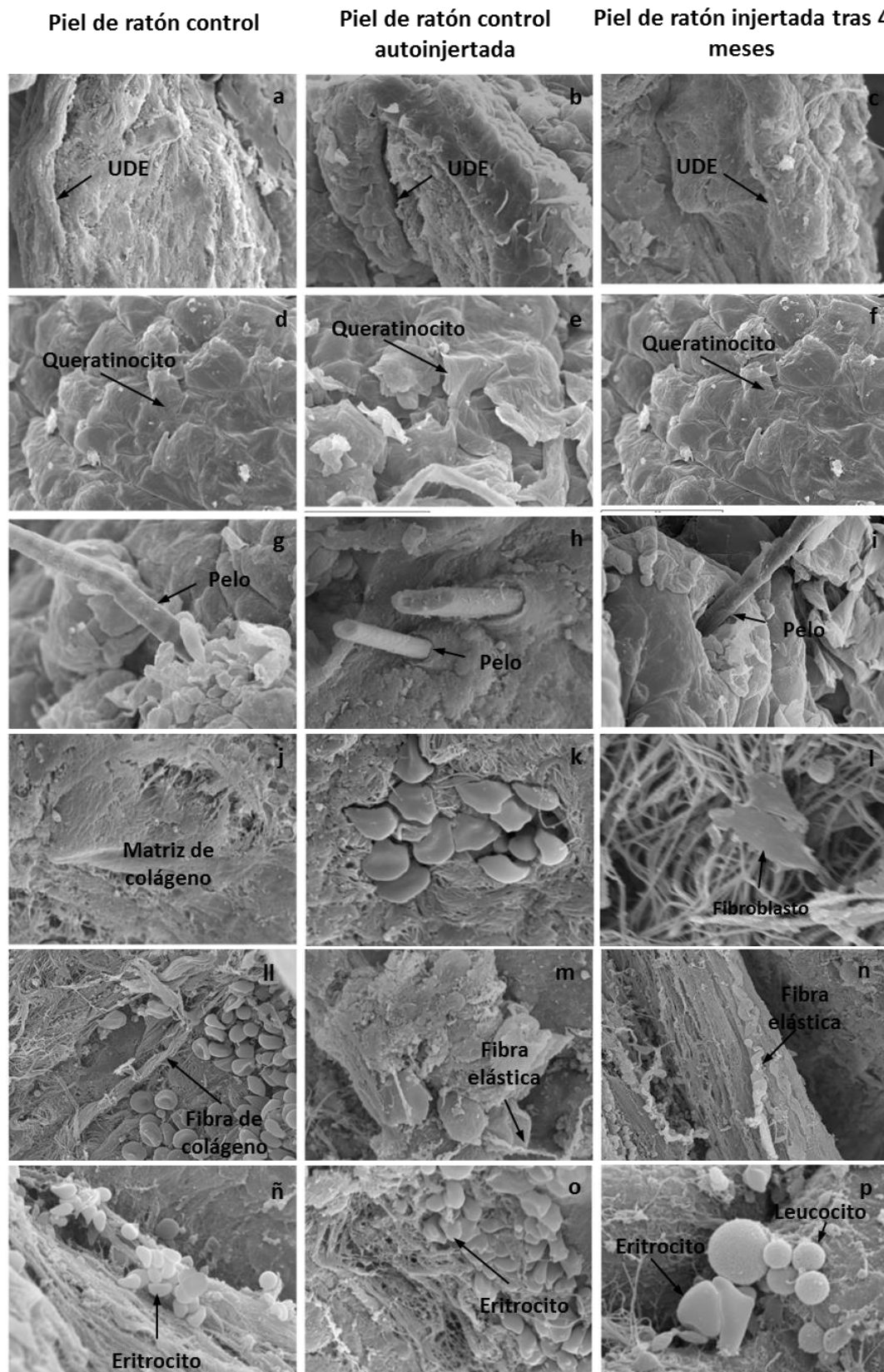


Figura R15: Análisis de MEB de la piel de ratón control, de la piel de ratón control autoinjertada y del injerto de equivalente de piel trasplantado a los 4 meses en un ratón representativo. UDE (a-c), queratinocitos (d-f), folículo piloso (g-i), matriz de colágeno (j), vaso sanguíneo con eritrocitos (k), detalle de un fibroblasto sintetizando fibras de colágeno (l), fibra de colágeno (ll), fibras elásticas (m y n) y eritrocitos y leucocitos (ñ-p). 10000X.

3. Construcción de un equivalente de piel usando la Membrana Amniótica como soporte (modelo *in vitro*)

3.1. Obtención y preparación del soporte de Membrana Amniótica

3.1.1. Obtención y criopreservación de las Membranas Amnióticas

Se obtuvieron 29 MA, de las cuales 9 se criopreservaron para utilizarlas como soporte y 20 se utilizaron para extraer las CMEA y CEA (utilizadas en el apartado B de resultados). La edad media de las donantes fue de $35,92 \pm 4,97$ años.

Las MA se criopreservaron durante largos períodos de tiempo (incluso hasta 2 años) en la fase líquida del N_2L sin sufrir roturas una vez se descongelaron (Figura R16).

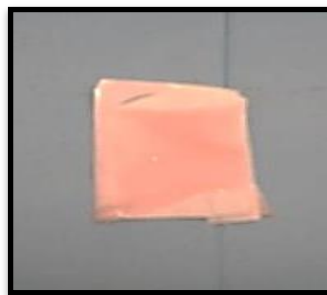


Figura R16: Parche de MA descongelado.

3.1.2. Caracterización histológica de la Membranas Amnióticas antes de su criopreservación

Una pequeña porción de cada MA se examinó en fresco histoquímicamente utilizando las tinciones H-E, tricrómico de Masson y Safranina O e inmunohistoquímicamente para detectar la expresión de CK y de vimentina.

Confirmando lo que se describió anteriormente en el apartado de **Introducción**, se observaron las siguientes capas en la estructura de la MA (Figura R17a):

a) Una capa de epitelio columnar que consistió en una única capa de CEA que expresaron CK (Figura R17b); b) este epitelio se extendió sobre una membrana basal; c) a su vez, se encontró adherida a la capa estromal. Esta última lámina estaba formada por: a) capa compacta, que forma el esqueleto fibroso principal de la MA; b) la capa fibroblástica, en la que se encuentran las CMEA (Figura R17c) que sintetizan las fibras de colágeno de la capa compacta como se pudo observar con la tinción de tricrómico de Masson (Figura R17d); y c) la capa esponjosa, que presentó un elevado contenido de PG y glicoproteínas, dándole esa apariencia esponjosa que se traduce en una coloración más tenue en tinciones como la H-E (Figura R17a) y Safranina O (Figura R17e).

Adherido a la MA tenemos el corion formado por mesodermo coriónico que constó de una lámina reticular sobre la membrana basal que la separa de la lámina de los trofoblastos (Figura R17a).

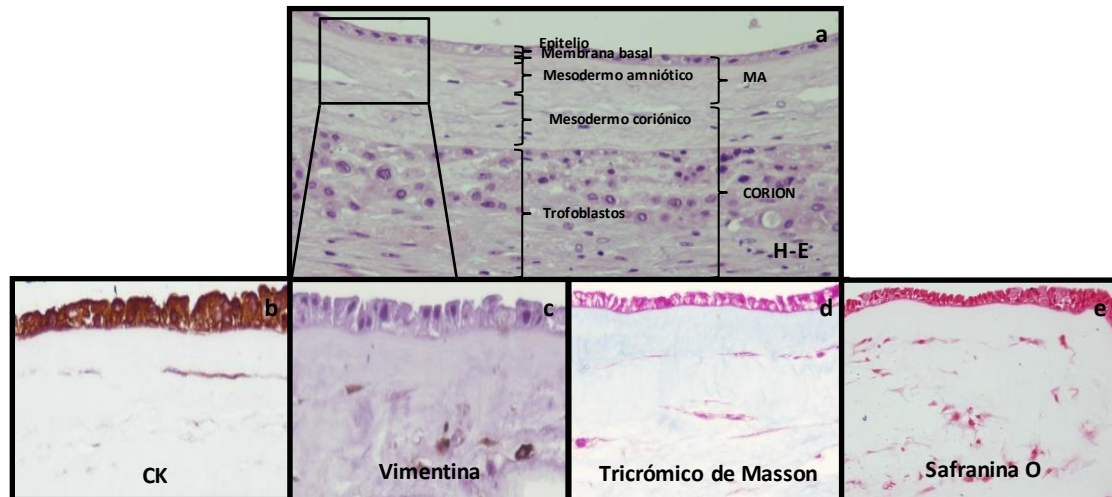


Figura R17: Caracterización histológica de la MA en fresco de la parte señalada en una zona representativa. Análisis histoquímico con la tinción de H-E en la que se detalla la estructura de las membranas fetales (MA y corion) (a). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de CK en las CEA (b) y la expresión de vimentina en las CMEA (c). Análisis histoquímico con la tinción de tricrómico de Masson para teñir las fibras de colágeno (d) y Safranina O para teñir los PG (e). 200X (a) y 400X (b-e).

3.1.3. Caracterización histológica y cuantificación del ADN de la Membrana Amniótica después de su descelularización mediante diferentes tratamientos

La MA descongelada tras su criopreservación (Figura R18a) se trató con diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos para analizar cuál sería el más adecuado para eliminar las CEA y CMEA con dos fines principales: obtener un soporte acelular que evite la posibilidad de respuestas alogénicas y facilitar la adhesión de otras células cultivadas al soporte. El grado de la eliminación de las CEA y CMEA después de cada tratamiento se analizó mediante la tinción de H-E y la cuantificación del ADN.

La H-E demostró que el mejor tratamiento para eliminar estas células fue el de 1% de T/E a 37°C durante 30 min (Figura R18j). Con este tratamiento, se eliminaron todas las células y fragmentos celulares. Además, la membrana basal y la MEC de la MA necesarios porque actúan como soporte para otras células, tales como células de la piel o nerviosas, permanecieron intactos.

Los resultados de los otros tratamientos de T/E, EDTA y dispasa a 37°C durante 30 min (Figura R18b-i y k-l) mostraron que después de los tratamientos, las CEA y CMEA no se eliminaron completamente. Con estos tratamientos, se necesitó el tratamiento mecánico con un rastrillo para eliminar completamente las células, método que dañó a la MA. El tratamiento con acutasa eliminó las CEA pero no las CMEA del estroma de la MA (Figura R18k), mientras que el tratamiento con dispasa durante 1 h eliminó las CEA y CMEA, pero dañó considerablemente la MEC y la membrana basal de la MA (Figura R18m).

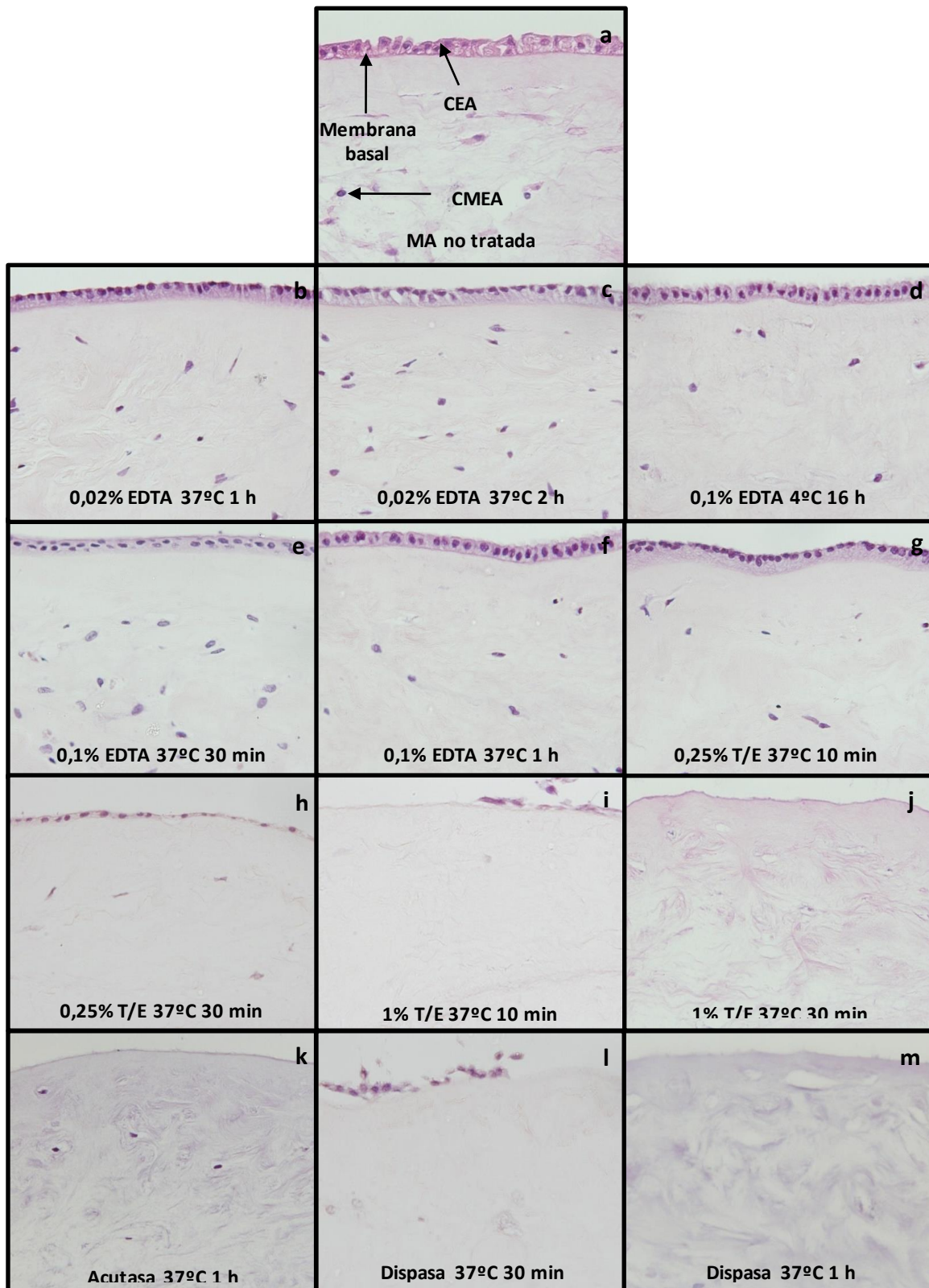


Figura R18: Caracterización histológica de las MA incubadas con los diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos con la tinción de H-E en una zona representativa (n= 5). 400X.

Resultados

De forma paralela se realizó la cuantificación del ADN de la MA incubada con los diferentes tratamientos como medida indirecta de la eliminación de las células (Figura R19). Los datos de dicha cuantificación confirmaron los resultados obtenidos mediante la tinción de H-E (Figura R18) indicando que el mejor tratamiento para eliminar a las células fue el de 1% de T/E a 37°C durante 30 min (DNA residual: $1,38 \pm 0,53$ ng/ μ l) que, como se vió en los estudios histoquímicos, eliminó completamente las CEA y CMEA así como los fragmentos celulares.

El tratamiento con 1% de T/E a 37°C durante 10 min ($14,3 \pm 3,37$ ng/ μ l) fue insuficiente para eliminar todas las células, ya que aunque se vió que las CMEA se eliminaron totalmente, se encontraron algunas zonas con epitelio. Los otros tratamientos, 0,25% de T/E a 37°C durante 10 min ($45,33 \pm 10,35$ ng/ μ l), 0,25% de T/E a 37°C durante 30 min ($19,68 \pm 4,91$ ng/ μ l), 0,02% de EDTA a 37°C durante 1 h ($46,7 \pm 14,73$ ng/ μ l), 0,02% de EDTA a 37°C durante 2 h ($39,7 \pm 2,26$ ng/ μ l), 0,1% de EDTA a 4°C durante 16 h ($54,95 \pm 6,12$ ng/ μ l), 0,1% de EDTA a 37°C durante 30 min ($77,23 \pm 0,38$ ng/ μ l), 0,1% de EDTA a 37°C durante 1 h ($6,8 \pm 2,11$ ng/ μ l), y dispasa a 37°C durante 30 min ($46,7 \pm 14,73$ ng/ μ l) no eliminaron de forma eficaz todos los tipos celulares. El tratamiento más ineficaz para conseguir un soporte descelularizado fue el tratamiento con 0,1% de EDTA a 37°C durante 30 min tras el cual se observó la mayor cantidad de ADN, ya que no eliminó todas las células. El tratamiento con acutasa a 37°C durante 1 h, eliminó las CEA, y en este caso la concentración de ADN restante fue debida a las CMEA del estroma ($10,79 \pm 2,68$ ng/ μ l), como se observó en el estudio histoquímico.

Finalmente, el tratamiento con dispasa a 37°C durante 1 h ($6,53 \pm 4,2$ ng/ μ l) eliminó todas las células, tanto las CEA como las CMEA, al igual que el tratamiento con 1% de T/E a 37°C durante 30 min, pero la diferencia entre los dos tratamientos fue que la dispasa dañó la membrana basal y los componentes de la MEC en mayor grado como se comprobó posteriormente con el estudio histoquímico.

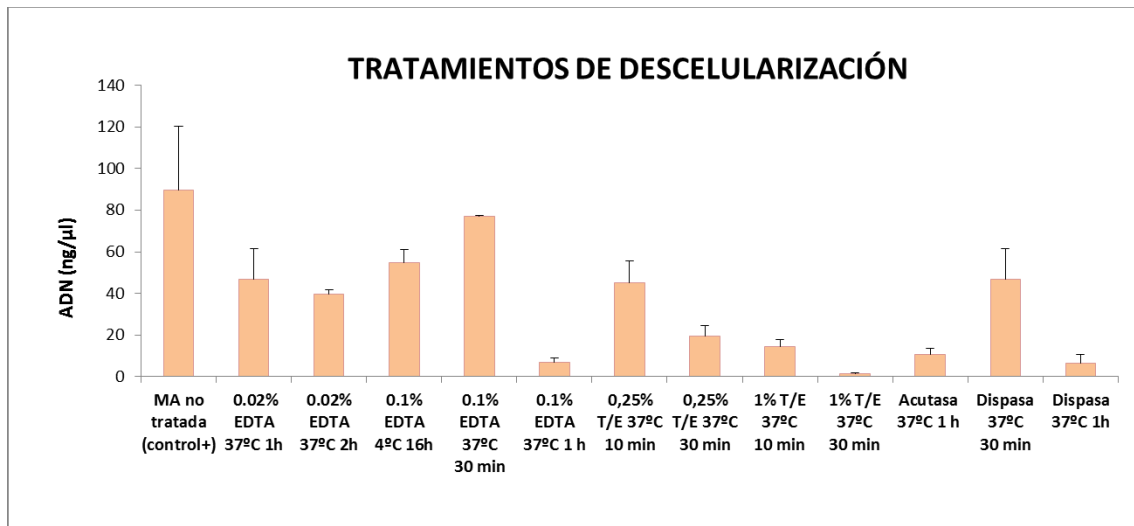


Figura R19: Concentración de ADN obtenido después de incubar a las MA con los diferentes tratamientos químicos y/o enzimáticos (n=5). Se representan las medias y la desviación típica de los valores.

Para utilizar la MA como soporte es conveniente descelularizarla pero que al mismo tiempo conserve su estructura. Por ello, nos centramos en los dos tratamientos que tras los resultados mostrados anteriormente mostraban que eliminaron completamente las células con 1% de T/E a 37°C durante 30 min o dispasa a 37°C durante 1h, con el objetivo de examinar los posibles daños en los otros componentes de la MA, analizando su composición antes y después de los tratamientos mediante análisis histomorfológicos e inmunohistoquímicos.

3.1.3.1. Análisis histomorfológico de los componentes de la matriz extracelular

Mediante la visualización a través del microscopio invertido de contraste de fases de la superficie de la MA mostró que antes del tratamiento existe un epitelio con células poligonales en forma de empalizada (Figura R20a) que después del tratamiento con 1% de T/E a 37°C durante 30 min o dispasa a 37°C durante 1 h fueron eliminadas, dejando un soporte acelular (Figura R20b y c), lo que demostró la eficacia de los tratamientos elegidos. Los estudios histomorfológicos mostraron la estructura de la MA después de descelularizarla. La tinción con tricrómico de Masson mostró que los principales componentes de la MEC de la MA, tales como el colágeno permanecieron después del tratamiento con 1% de T/E a 37°C durante 30 min (Figura R20e) y la tinción de azul alcian y safranina O mostraron como los mucopolisacáridos (Figura 20h) y PG (Figura R20k) respectivamente, también permanecen en la MA después de este tratamiento. Sucedió lo contrario con el tratamiento con dispasa a 37°C durante 1 h que dañó bastante la MEC disminuyendo el colágeno (Figura R20f), los mucopolisacáridos ácidos (Figura R20i) y PG (Figura R20l).

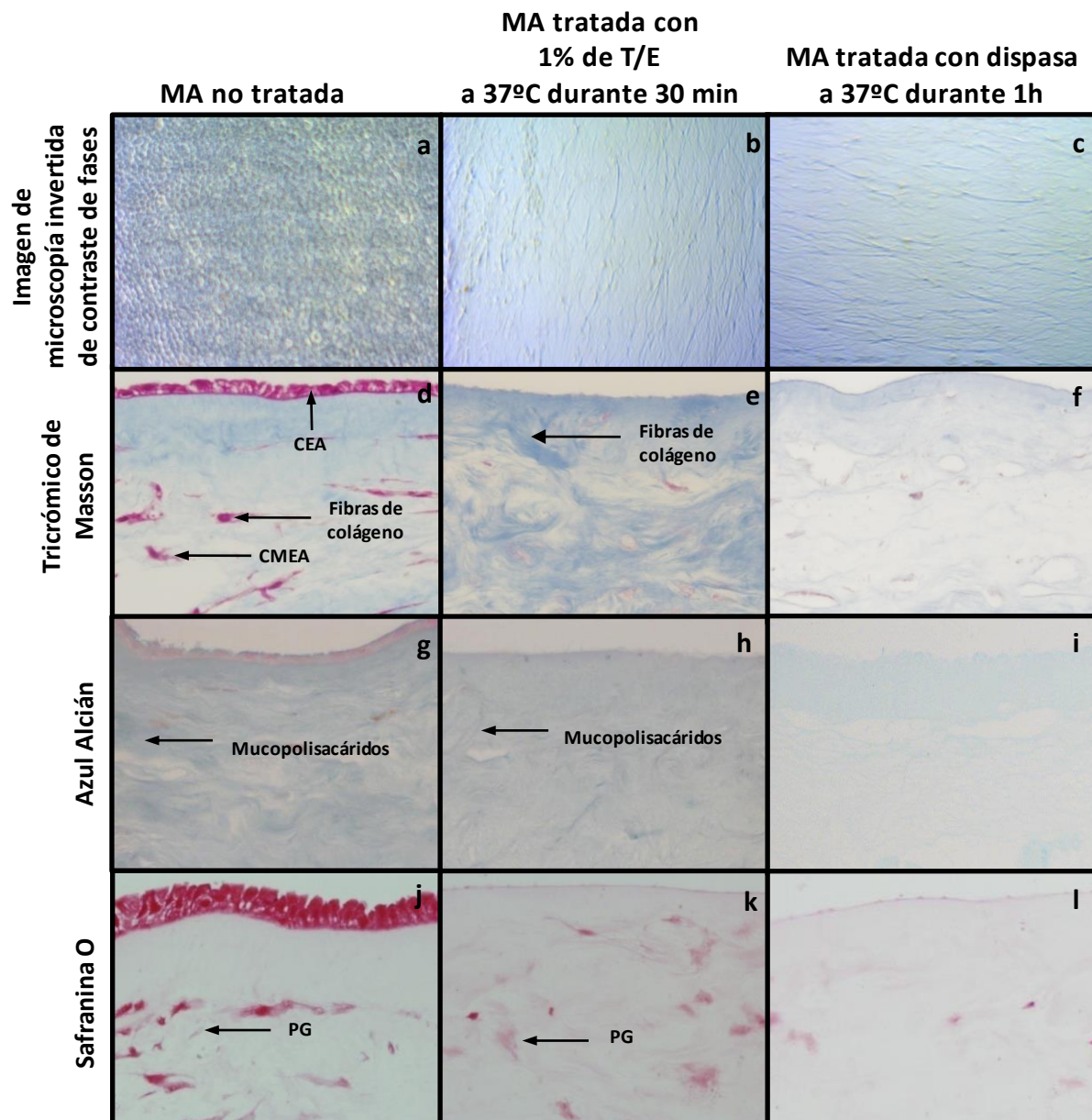


Figura R20: Comparación de la estructura de la MA no tratada con la MA tratada con 1 % de T/E a 37°C durante 30 min y con dispasa a 37°C durante 1 h en una zona representativa. Imagen de microscopía de contraste de fases de las MA no tratadas (a) y de las MA tratadas (b y c). Análisis con la tinción de tricrómico de Masson para observar las fibras de colágeno tanto en las MA no tratadas (d) como en las tratadas (e y f), con la tinción de azul alcían para observar los mucopolisacáridos ácidos en las MA no tratadas (g) así como en las tratadas (h e i) y con la tinción de safranina O para observar los PG tanto en las MA no tratadas (j) como en las tratadas (k y l). 100X (a-c) y 400X (d– l).

3.1.3.2. Análisis inmunohistoquímico de los componentes de la membrana basal

Para determinar de forma más específica si las proteínas de la membrana basal permanecieron después de la descelularización, se realizó el análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia de dos de sus componentes: laminina y

Resultados

fibronectina. Los resultados demostraron que ambas proteínas se expresaron después del tratamiento con 1% de T/E a 37°C durante 30 min (Figura R21b y e) de manera continua a lo largo de la membrana basal al igual que la MA no tratada (Figura R21a y d). Sucedió lo contrario con el tratamiento de la dispa a 37°C durante 1 h, después del cual no se observó la expresión de ninguna de estas proteínas (Figura R21c y f).

Finalmente, para confirmar que los tratamientos de descelularización eliminaron las CMEA, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico para determinar la expresión de vimentina (Figura R21g). La ausencia de expresión de este antígeno después de los tratamientos con 1% de T/E a 37°C durante 30 min y dispa a 37°C durante 1 h demostró que la mayoría de estas CMEA fueron eliminadas (Figura R21h y i).

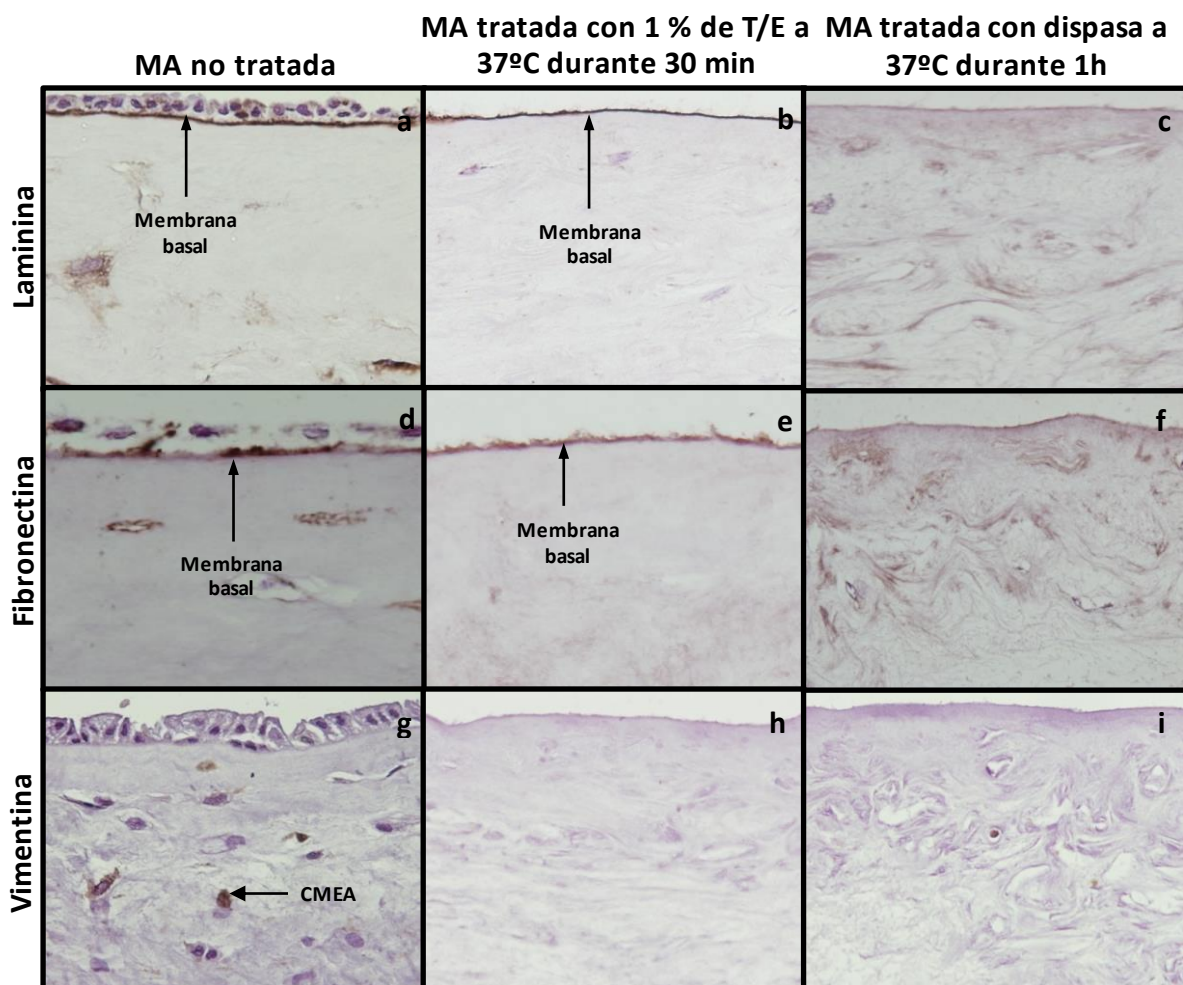


Figura R21: Comparación de la descelularización y de la lámina basal en las MA no tratadas con las MA tratadas con 1% de T/E a 37°C durante 30 min o con dispa a 37°C durante 1 h en una zona representativa. Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de los antígenos laminina y fibronectina tanto en las MA no tratadas (a y d) como en las MA tratadas con 1% de T/E a 37°C durante 30 min (b y e) o con dispa a 37°C durante 1 h (c y f). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de vimentina en la CMEA de las MA no tratadas (g) y en las MA tratadas con ambos tratamientos (h y i). 400 X.

3.2. Preparación del equivalente de piel *in vitro* y caracterización histológica

3.2.1. Selección del lado de la Membrana Amniótica sobre el que cultivar los fibroblastos y los queratinocitos

Una vez determinado el mejor tratamiento para descelularizar la MA para utilizarla como soporte para el cultivo de fibroblastos y queratinocitos, el siguiente paso fue analizar cuál de los dos lados sería el más adecuado para cultivar estas células directamente sobre ella. Esto se determinó cultivando cada tipo celular sobre los dos lados de la MA (estromal y epitelial descelularizado o sin descelularizar).

Para ello, se descongelaron los parches de MA y se colocaron en los dispositivos *Cell Crown*TM con la cara estromal o epitelial hacia arriba, según correspondiese para inmovilizarla. En el caso del lado epitelial descelularizado se trató previamente con 1% de T/E a 37°C durante 30 min. Sobre este dispositivo con la MA se sembraron 1×10^6 fibroblastos o queratinocitos (según experimento) directamente con medio de MF y con el MQ respectivamente.

Tanto los fibroblastos como los queratinocitos sembrados y cultivados sobre el lado estromal y epitelial descelularizado, respectivamente, alcanzaron la confluencia en una semana, adhiriéndose a la MA y proliferando formando una monocapa.

En el caso de los fibroblastos, cuando se examinaron histoquímicamente e inmunohistoquímicamente se observó que se adhirieron y proliferaron mejor por el lado estromal de la MA formando varias capas celulares (2-3 capas) (Figura R22a y b). Sobre todo en la capa superficial se pudo observar como los fibroblastos adoptaron una morfología fibroblástica y expresaron vimentina (Figura R22b). No obstante, las células de las capas más profundas mostraron una forma más redondeada (Figura R22a). Sin embargo, los fibroblastos que crecieron sobre el epitelio de la MA o sobre la membrana basal de la MA descelularizada mostraron una escasa integración con dicho epitelio, de modo que en todos los casos se observaron amplias zonas donde la monocapa celular se encontró desprendida (Figura R22c-f).

FIBROBLASTOS

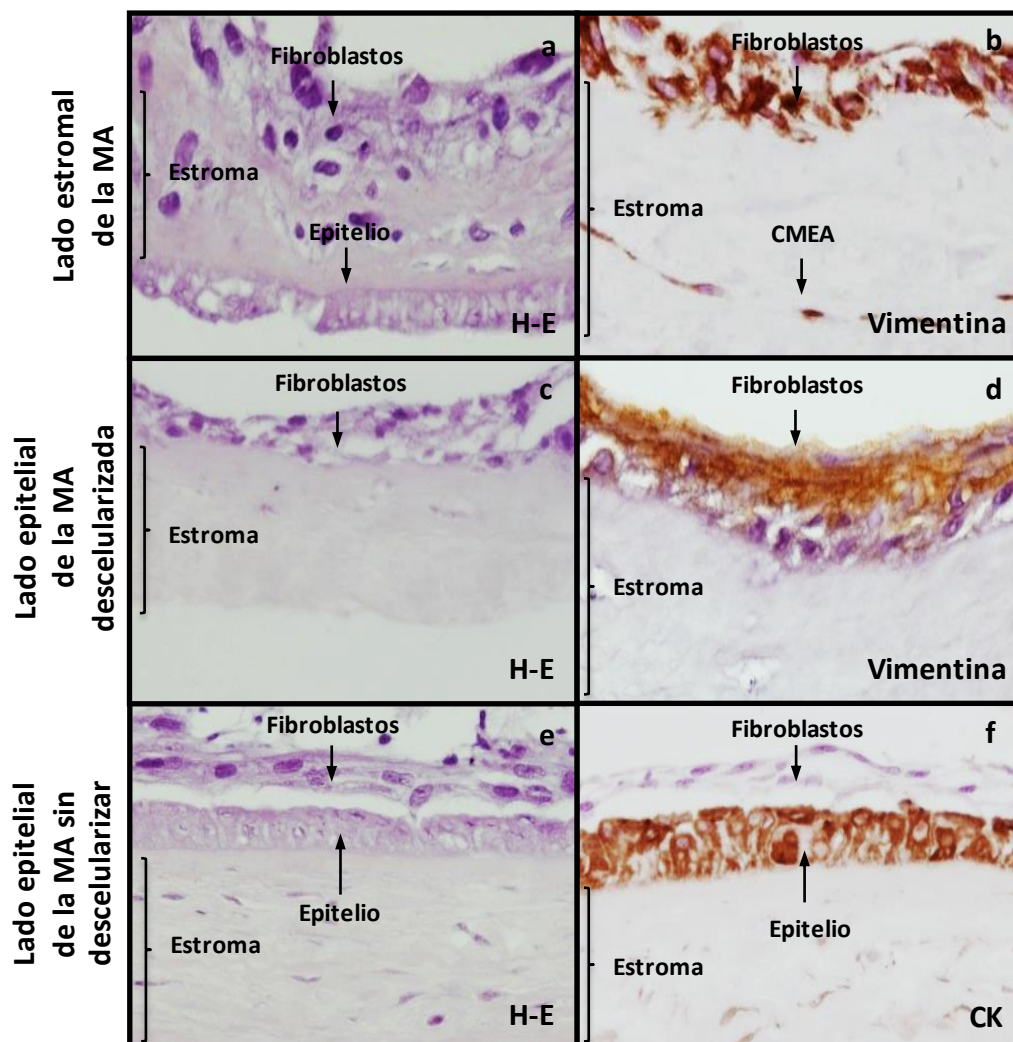


Figura R22: Cultivo de los fibroblastos sobre el lado estromal y sobre el lado epitelial descelularizado como el epitelial sin descelularizar de la MA después de una semana de cultivo en una zona representativa. Análisis histoquímico con H-E de la estructura de la MA y de los fibroblastos que crecieron sobre ella (a, c y e). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de vimentina en los fibroblastos (b y d) y para detectar la expresión de CK en el epitelio de la MA (f). 400X.

En el caso de los queratinocitos, cuando se examinaron histoquímica e inmunohistoquímicamente se observó que aunque se adhirieron por ambos lados de la MA mostrando un crecimiento en monocapa, se adhirieron y proliferaron mejor por el lado epitelial de la MA descelularizada de forma compacta y organizada formando varias capas celulares (2-3 capas) (Figura R23c y d). Los queratinocitos adoptaron una morfología típica de células epiteliales cuboides expresando CK (Figura R23d). También se pudo observar en la superficie como un estrato cornificado que correspondería a los restos aplanados y fusionados de las células muertas (Figura R23d).

Resultados

Tanto por el lado estromal (Figura R23a y b) como epitelial sin descelsularizar (Figura R23e y f), la monocapa de queratinocitos se adhirió pero los queratinocitos se dispusieron de manera desorganizada y a la semana de cultivo se vieron signos de apoptosis pudiéndose observar cómo se empezaban a desprender la monocapa de queratinocitos (Figura R23e y f).

QUERATINOCITOS

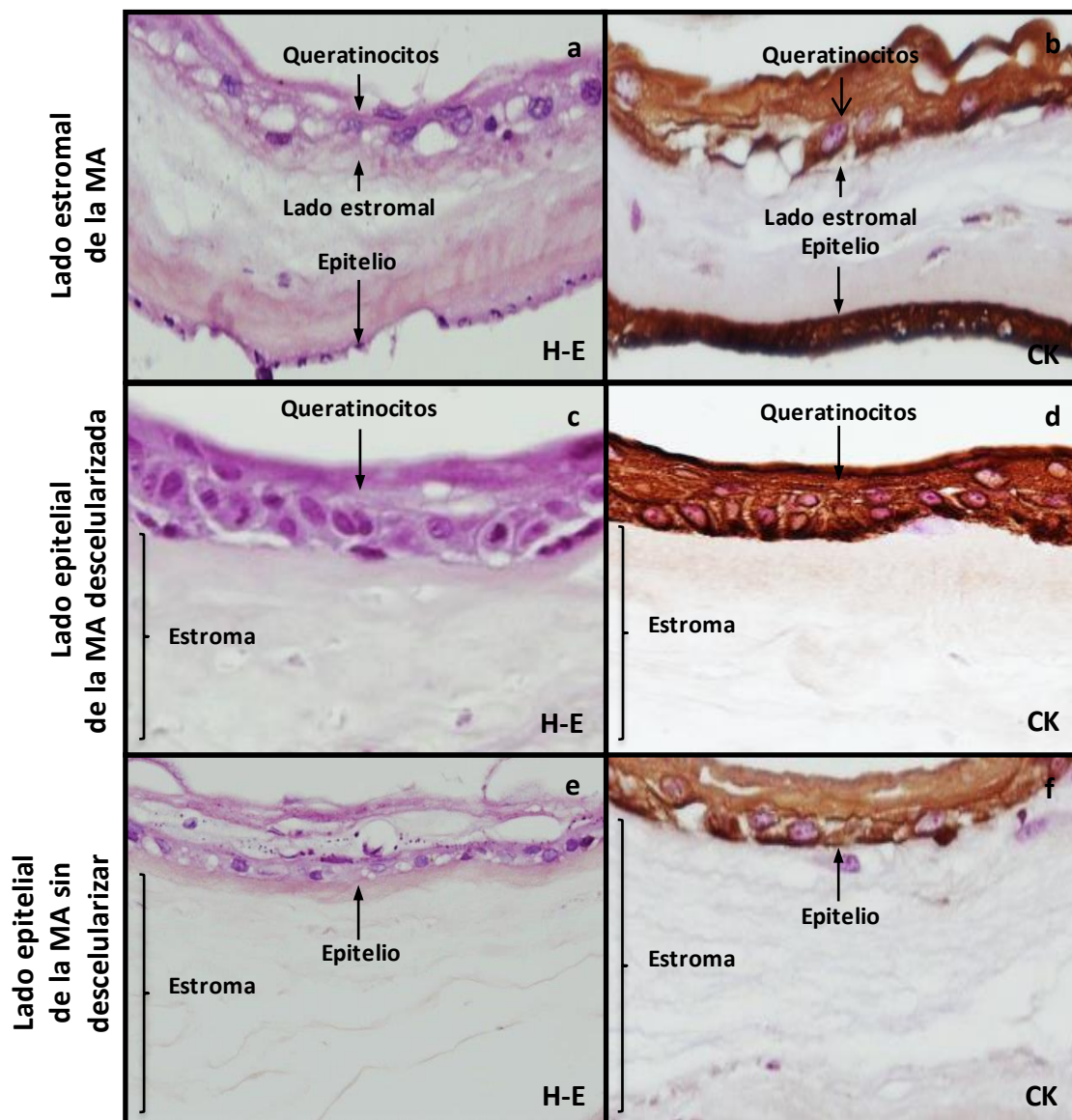


Figura R23: Cultivo de los queratinocitos sobre el lado estromal y sobre el lado epitelial descelsularizado o el epitelial sin descelsularizar de la MA después de una semana de cultivo en una zona representativa. Análisis histoquímico con H-E de la estructura de la MA y de los queratinocitos que crecen sobre ella (a, c y e). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de CK en los queratinocitos (b, d y f). 400X.

3.2.2. Desarrollo de un equivalente de piel *in vitro* con la Membrana Amniótica como soporte

Una vez concluido que el mejor tratamiento para descelularizar la MA fue el de 1% T/E a 37°C durante 30 min y la idoneidad de la MA como soporte sembrando fibroblastos por el lado estromal y queratinocitos por el lado epitelial de la MA descelularizada, procedimos a la síntesis de un equivalente de piel *in vitro*, utilizando estas condiciones.

El equivalente obtenido se cultivó en presencia de MQ, el tiempo suficiente para que las células pudiesen alcanzar la confluencia. Con el uso del método sumergido, es decir, totalmente cubierto del medio de cultivo, pudimos obtener un equivalente de piel en una semana.

Los cultivos primarios de fibroblastos sembrados sobre la MA alcanzaron la confluencia a los 5-6 días. Las células tenían una elevada capacidad proliferativa y mostraron citoplasmas fusiformes con delgadas y largas proyecciones típica morfología de fibroblastos (Figura R24a). Los cultivos primarios de los queratinocitos sembrados sobre la MA al primer día mostraron morfología de huso ancho y corto, y las colonias de células proliferaron y las colonias celulares proliferaron y se vieron a los 3-4 días. Estas células tenían morfología poligonal con núcleos centrados y redondos y se distribuyeron en empalizada alcanzando la confluencia a los 7 días (Figura R24b).

Después de una semana de cultivo sumergido, los equivalentes de piel *in vitro* exhibieron buena morfología con buenas propiedades mecánicas tales como la flexibilidad, haciendo posible su fácil manipulación sin la separación de la epidermis de la dermis.

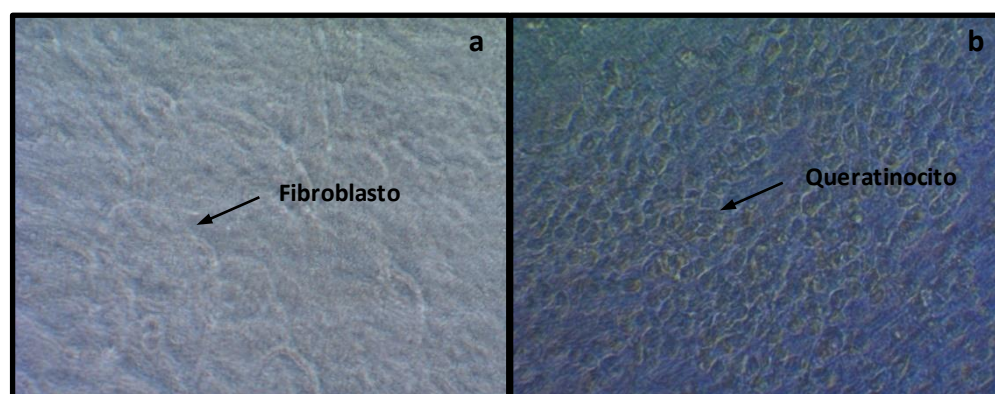


Figura R24: Morfología celular del equivalente de piel *in vitro* después de una semana de cultivo en una zona representativa. Los fibroblastos se encontraron en el lado estromal (a) y los queratinocitos en el lado epitelial (b) de la MA descelularizada. 100X.

Resultados

Estas propiedades se demostraron por análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos del equivalente de piel sintetizado.

La tinción H-E mostró una estructura del equivalente de piel con la presencia en la parte superior de la MA con los queratinocitos formando una especie de epidermis y en la inferior los fibroblastos, formando una especie de dermis (Figura R25a). Los análisis inmunohistoquímicos confirmaron la presencia de CK en la epidermis (Figura R25b) y las células basales expresaron K14 (Figura R25c). No existió un estrato suprabasal como se pudo comprobar por la ausencia de expresión de K10, marcador tardío de diferenciación para los queratinocitos (Figura R25d). Las células que expresaron p63 fueron las células madre epidermales que se encontraron sobre la membrana basal (Figura R25e). Estas células no expresaron Ki67, por tanto, parece que no se encontraban en estado de proliferación (Figura R25f) pudiendo deberse a que se encontraban en un estado quiescente al llegar a la confluencia.

Los fibroblastos se infiltraron en la MA y sintetizaron fibras de colágeno, como se pudo ver mediante la inmunohistoquímica detectando la expresión de vimentina (Figura R25g).

La membrana basal, importante para la adhesión de los queratinocitos a la MA, permaneció intacta como indicó la expresión de laminina observada por inmunofluorescencia (Figura R25h).

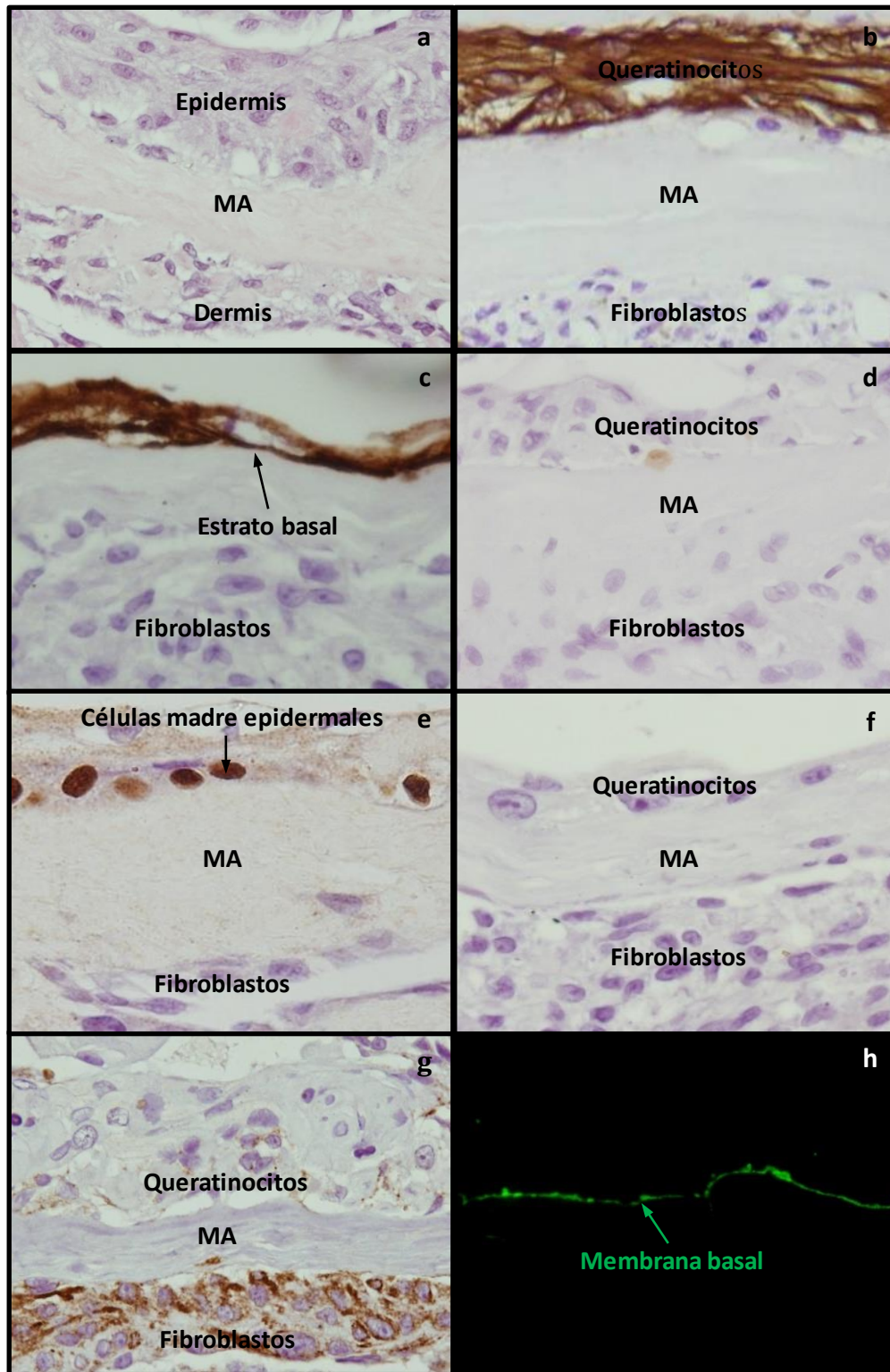


Figura R25: Análisis histológico de un equivalente de piel *in vitro* representativo cultivado durante una semana. Análisis histoquímico con H-E (a). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de CK (b), K14 (c) K10 (d), p63 (e), Ki67 (f) y vimentina (g). Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de laminina (h). 400X (a–g) y 200X (h).

B. INGENIERÍA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO

1. Obtención y caracterización de gelatina de Wharton de los Cordones Umbilicales

Se obtuvieron 22 CU a partir de donantes con una edad media de $37,06 \pm 3,03$ años. El diámetro fue de 1-1,5 cm y la longitud media fue de $17,13 \pm 10,80$ cm (Figura R26a).

El análisis histoquímico con la tinción de H-E nos mostró una capa de células epiteliales en la superficie de los CU (Figura R26d) y en el interior se pudieron ver dos arterias (Figura R26b) y una vena (Figura R26c) en una matriz circundante de tejido conjuntivo mucoso (gelatina de Wharton) (Figura R26e y f).

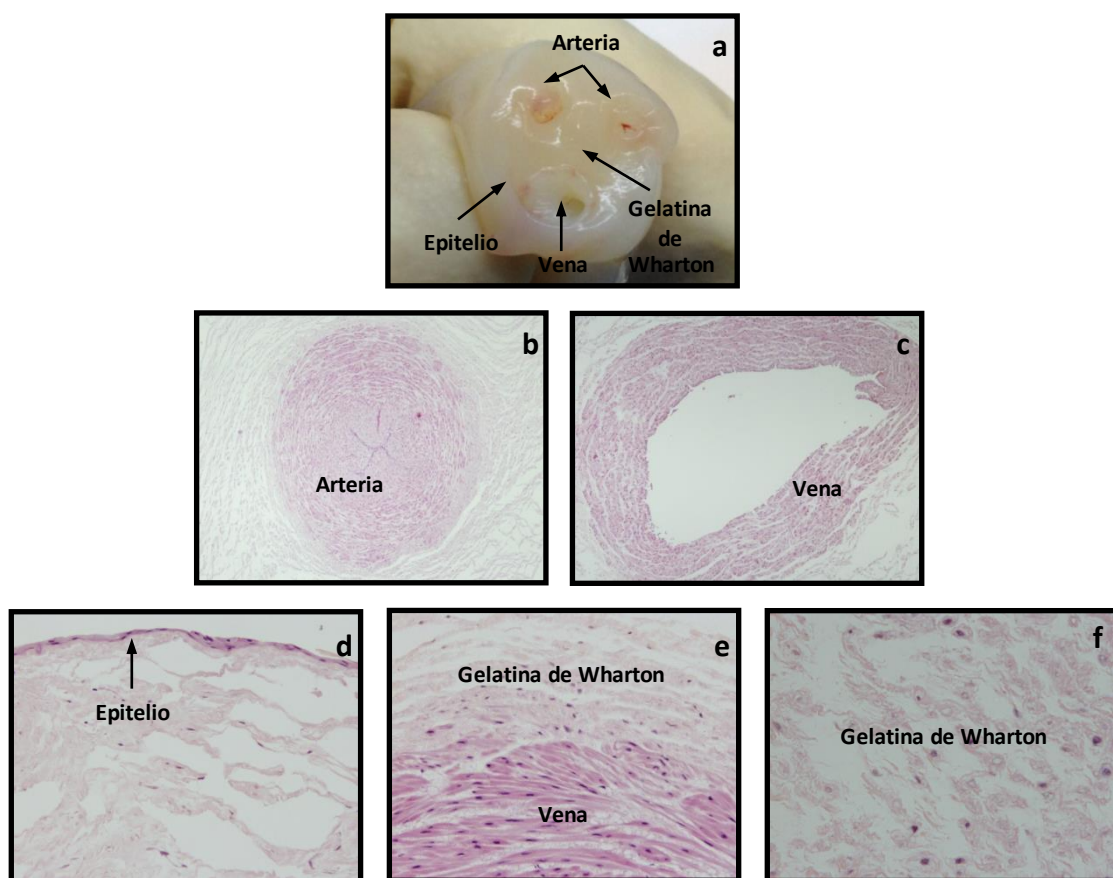


Figura R26: CU. Fotografía de una sección transversal de un CU (a). Análisis histoquímico con la tinción de H-E que muestra las siguientes estructuras: arteria (b) vena (c), epitelio (d), interfase gelatina de Wharton-vena (e) y el estroma de la gelatina de Wharton (f). 40X (b- f).

Resultados

La gelatina de Wharton está constituida por células tipo fibroblasto, las CMMGW, embebidas en una sustancia amorfa rica en GAG (Figura R27a) y PG (Figura R27b). El componente fibrilar más abundante del estroma intercelular dispuestas en haces gruesos ondulados son las fibras de colágeno (Figura R7c), mientras que las fibras elásticas están ausentes (Figura R27d).

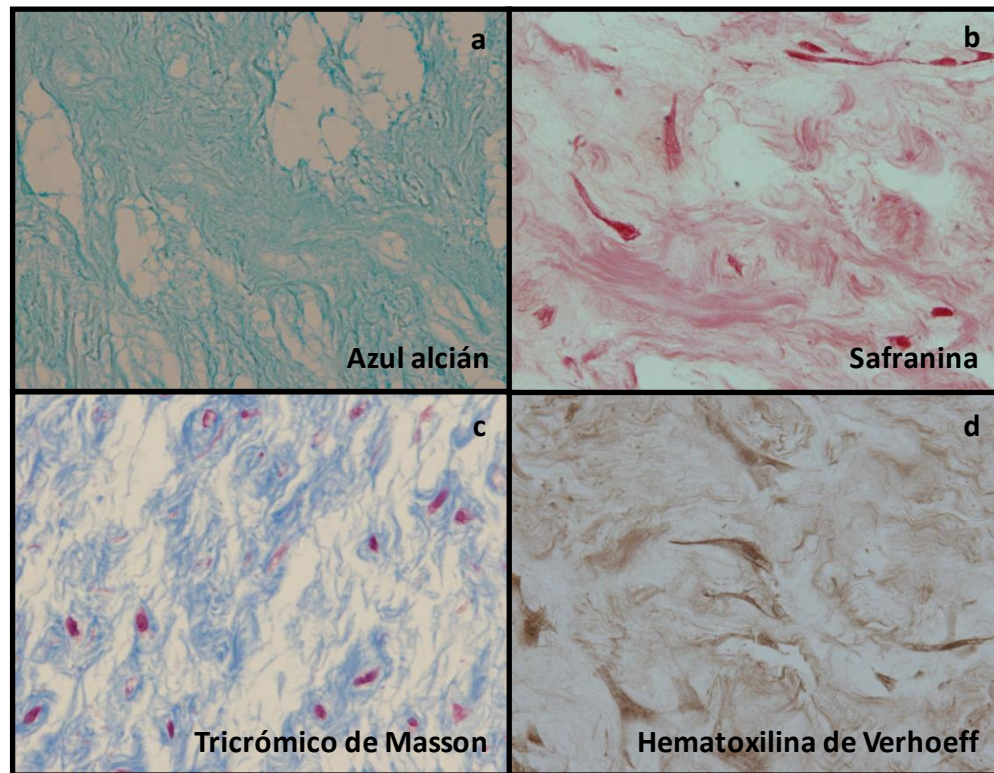


Figura R27: Gelatina de Wharton de CU. Análisis histoquímico con las tinciones de azul alcian para mostrar los GAG (a), safranina O para los PG (b), tricrómico de Masson para las fibras de colágeno (c) y hematoxilina de Verhoeff para las fibras elásticas (d). 400X.

2. Localización, aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW

2.1. Localización de las células en sus correspondientes tejidos

2.1.1. Localización de las CMEA y las CEA en la Membrana Amniótica

El análisis por inmunofluorescencia de la expresión del antígeno vimentina permitió localizar a las CMEA en el estroma mientras que la expresión del antígeno CK permitió localizar a las CEA en el epitelio de la MA (Figura R28).

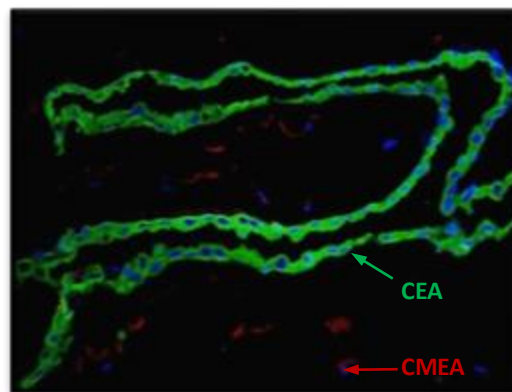


Figura R28: Immunolocalización de las CMEA y de las CEA en la MA en fresco. Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de vimentina en las CMEA y CK en las CEA. 200X.

2.1.2. Localización de las CMMGW en la gelatina de Wharton

El empleo de los anticuerpos que detectan la expresión del antígeno colágeno tipo I (Figura R29a) y fibronectina (Figura R29b) permitió localizar a las CMMGW en la gelatina de Wharton.

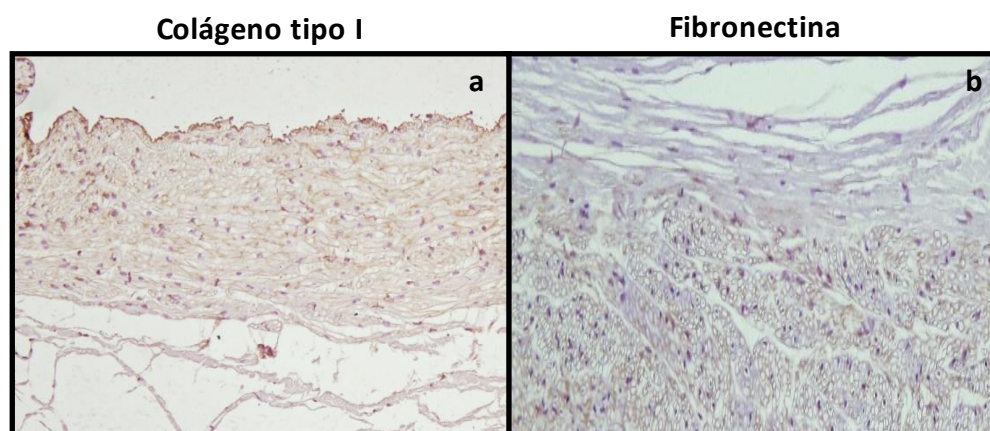


Figura R29: Immunolocalización de las CMMGW en la gelatina de Wharton del CU. Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de colágeno tipo I (a) y fibronectina (b). 100X.

2.2. Aislamiento y caracterización morfológica

Las CMEA y CEA se aislaron de la MA mediante una digestión mecánica seguida por digestiones enzimáticas y las CMMGW se aislaron del CU por el método del explante. En ambos protocolos se valoró la presencia de células con capacidad de adhesión a los frascos y placas de cultivo.

2.2.1. CMEA y CEA

En el caso de las MA, para el aislamiento de las células se utilizaron en fresco (no criopreservadas) para el aislamiento de las células. La primera población de células aisladas mediante la digestión enzimática con colagenasa presentó una morfología en forma de huso con extensiones citoplasmáticas que crecieron de forma individual poseyendo una forma irregular y protusiones celulares prominentes. Éstas se consideraron las CMEA derivadas del mesodermo embrionario (Figura R30a y d).

La segunda población de células aisladas de la MA mediante la digestión enzimática con T/E consistió en células poliédricas de pequeño tamaño que crecieron en poblaciones dispersas en empalizada con la típica forma de las células y unidas mediante contactos intercelulares epiteliales (Figura R30b y e). Éstas se consideraron las CEA derivadas del ectodermo extraembrionario.

2.2.2. CMMGW

Con el método del explante se consiguió aislar una población bastante homogénea de células sin tener que utilizar un tratamiento enzimático que podría dañar a las células. En los espacios entre los explantes se visualizaron las células de la gelatina de Wharton que se desplazaron hacia el exterior de éstos después de 4-5 días, exhibiendo forma plana y morfología poligonal. En ese momento, los trozos de los CU se eliminaron y el medio se reemplazó, quedando las células adheridas a la placa. Después de 10 días de cultivo las células aumentaron de tamaño y mostraron una apariencia similar a los fibroblastos, con forma fusiforme y extensiones citoplasmáticas dispuestas en paralelo, alcanzando el 80% de confluencia (Figura R30c y f). En ese momento, se digirieron con T/E y se subcultivaron en una superficie 2 veces mayor a la inicial, alcanzando un 90% a 95% de confluencia aproximadamente a los 5 días.

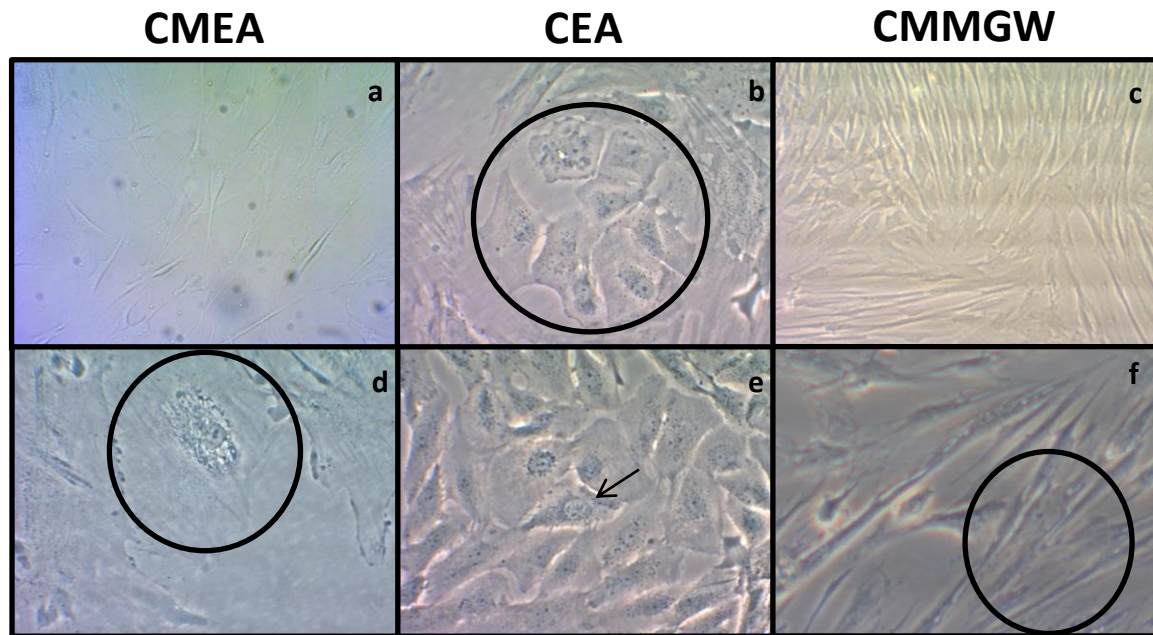


Figura R30: Cultivos *in vitro* de las CMEA y CEA obtenidas a partir de MA y de las CMMGW obtenidas a partir del CU a los 10 días. Imágenes de microscopía invertida de contraste de fases de la morfología fibroblástica de las CMEA (a) y de las CMMGW (c) y de la forma poliédrica de las CEA (b). Detalle de la morfología de una CMEA (d) y de una CMMGW (f). Detalle de las uniones intercelulares que se forman entre las CEA (e). 100X (a-c) y 400X (d-f).

2.3. Caracterización inmunocitoquímica, pureza y rendimiento tras la obtención de las CMEA, CEA y CMMGW

Mediante inmunocitoquímica se identificó que las células aisladas a partir de la MA con colagenasa fueron las CMEA por la expresión vimentina (Figura R31d) y la ausencia de expresión de CK (Figura R31a). Al contrario sucedió con las células aisladas en segundo lugar con T/E que se identificaron como las CEA que expresaron CK (Figura R31b) pero no vimentina (Figura R31e).

Cuando se caracterizaron las CMMGW se observó que éstas al igual que las CMEA son células mesenquimales y expresaron vimentina (Figura R31f) pero no CK (Figura R31c).

La pureza en los tres tipos celulares resultó en más del 95%.

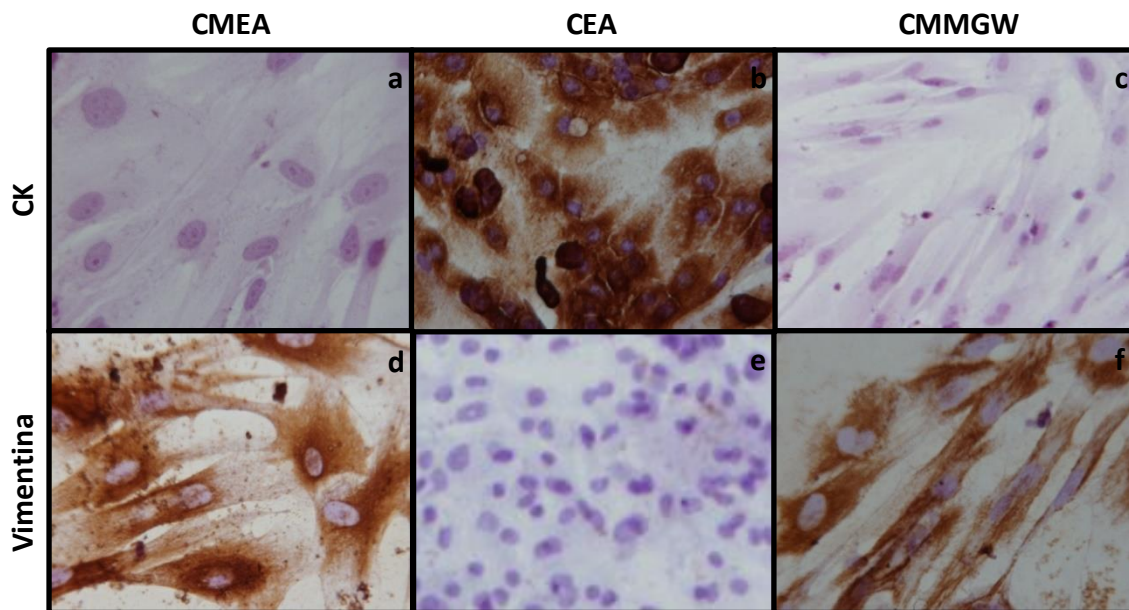


Figura R31: Caracterización inmunocitoquímica y pureza de las CMEA, CEA y CMMGW. Análisis inmunocitoquímico para detectar la expresión CK en las CMEA (a), CEA (b) y CMMGW (c) o vimentina en las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f) tras su obtención. 400X.

Se realizaron estudios cuantitativos de las poblaciones obtenidas, para determinar el rendimiento en función de la masa de las MA procesadas y de la longitud de los CU. Para ello, se procedió al conteo de las células adheridas a los frascos o placas de cultivo tras 24 h en el caso de las CMEA y CEA y tras 48 h en los CU después de eliminar el explante, utilizando el colorante vital azul tripán.

En el caso de las MA se obtuvo un rendimiento de $2 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^6$ CMEA/g de MA y $6 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^6$ CEA/g de tejido y en cuanto a los CU se obtuvo un rendimiento de 5×10^4 CMMGW/cm.

2.4. Potencial de diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW al linaje mesodérmico

Las CMEA, CEA y CMMGW aisladas se cultivaron en condiciones específicas para llevar a cabo los ensayos de diferenciación durante 21 días de cultivo en medio control (DMEM con un 10% de SBF) o en medio de inducción adipogénico, osteogénico o condrogénico, respectivamente.

Diferenciación adipogénica

La diferenciación adipogénica se evaluó mediante la tinción Oil Red O. Las células fueron 3-4 veces más grandes que antes de la inducción, con numerosas células multinucleadas conteniendo en su citoplasma vacuolas lipídicas positivas (Figura R32 recuadro). La positividad para la tinción Oil Red O se caracterizó por la presencia citoplasmática de estas vacuolas adipocíticas en los tres tipos celulares CMEA (Figura R32a), CEA (Figura R32b) y CMMGW (Figura R32c), aunque en el caso de las CEA, aparecieron en menos cantidad, posiblemente por su menor diferenciación. Las células cultivadas con el medio control no mostraron estos depósitos lipídicos (Figura R32d-f).

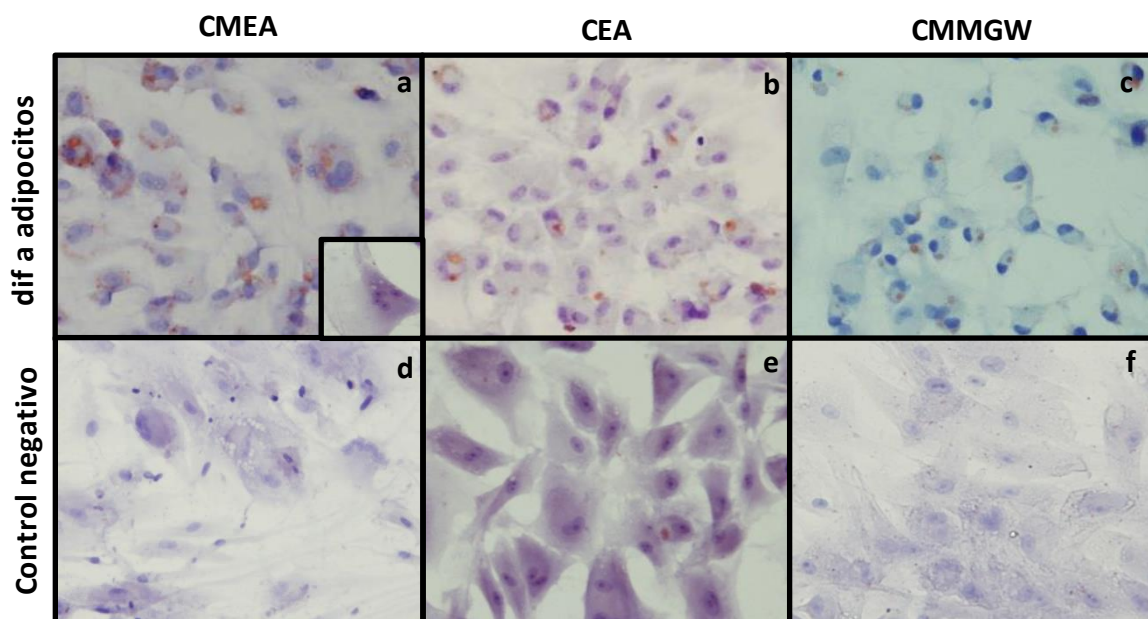


Figura R32: Diferenciación adipogénica de las CMEA, CEA y CMMGW después de 21 días en medio adipogénico. Tinción de Oil Red O para detectar la presencia de gotas lipídicas en las CMEA (recuadro: célula multinucleada) (a), en las CEA (b) y en las CMMGW (c) después de la diferenciación comparadas con las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f) cultivadas en el medio control. 200X (a - c) y 400X (d - f).

Diferenciación osteogénica

El potencial de diferenciación osteogénico tanto de las CMEA como de las CEA y CMMGW se evaluó mediante la tinción de rojo alizarina que tiñó los depósitos de calcio. Las células fueron 2-3 veces más grandes que antes de la inducción. Tanto las CMEA (Figura R33a) como las CEA (Figura R33b) y las CMMGW (Figura R33c) presentaron estos depósitos de calcio sin embargo, se pudo ver que las CEA fueron las células que más se diferenciaron y las CMEA y CMMGW las que menos. Las células con el medio control no mostraron estos depósitos de calcio (Figura R33d-f).

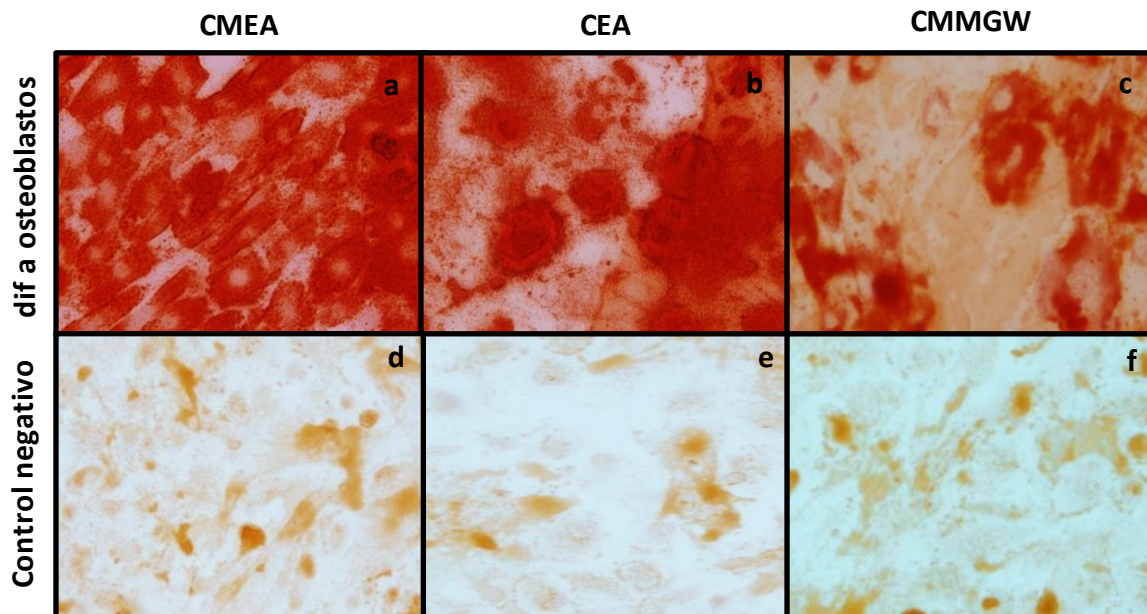


Figura R33: Diferenciación osteogénica de las CMEA, CEA y CMMGW después de 21 días en medio osteogénico. Tinción de rojo alizarina para detectar la presencia de depósitos de calcio en las CMEA (a), en las CEA (b) y en las CMMGW (c) después de la diferenciación comparadas con las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f) cultivadas en el medio control. 200X (a- c) y 400X (d- f).

Diferenciación condrogénica

El potencial de diferenciación condrogénico tanto de las células CMEA como de las CEA y de las CMMGW se evaluó tras la formación de micromasas mediante la tinción de azul de toluidina para identificar los PG sulfatados y mediante inmunohistoquímica para detectar la expresión de colágeno tipo II característico del cartílago articular. Tanto las CMEA (Figura R34a) como las CMMGW (Figura R34c) mostraron capacidad de formación de micromasas más ovaladas, en la que se generó una zona periférica celular y con poca presencia de MEC, y una zona central con mayor cantidad de MEC sintetizada por las células. Sin embargo, las micromasas procedentes de las CEA (Figura R34b) adquirieron una forma redondeada, con la zona periférica con pocas células y la zona central con mayor cantidad de MEC sintetizada. Las micromasas con el medio control no las pudimos analizar porque se deshacían.

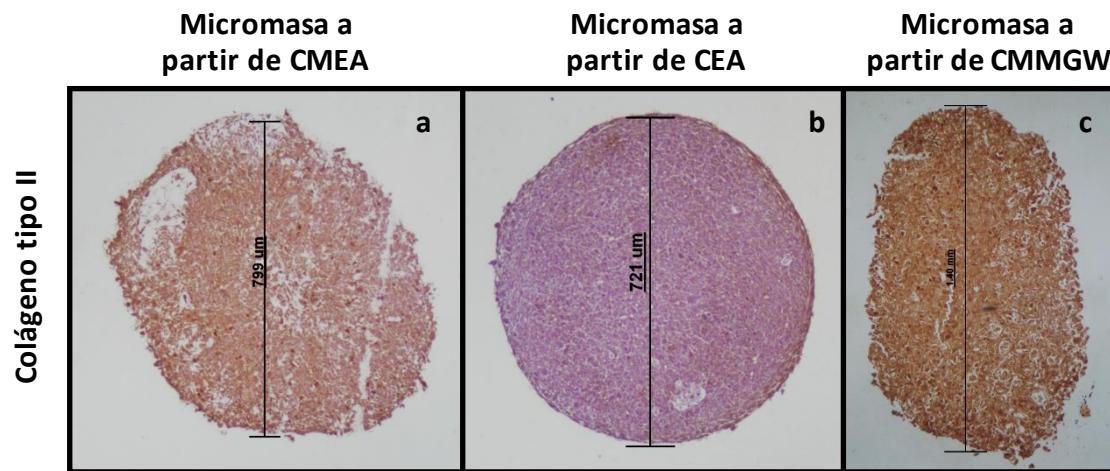


Figura R34: Morfología de una micromasa representativa formada a partir de cada tipo celular. Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de colágeno tipo II en las micromasas formadas a partir de CMEA (a), de CEA (b) y de CMMGW (c). 40X.

Las micromasas procedentes de las CEA (Figura R35b y e) no mostraron tantos PG sulfatados ni colágeno tipo II como las micromasas que procedían de las CMEA (Figura R35a y d) y de las CMMGW (Figura R35c y f).

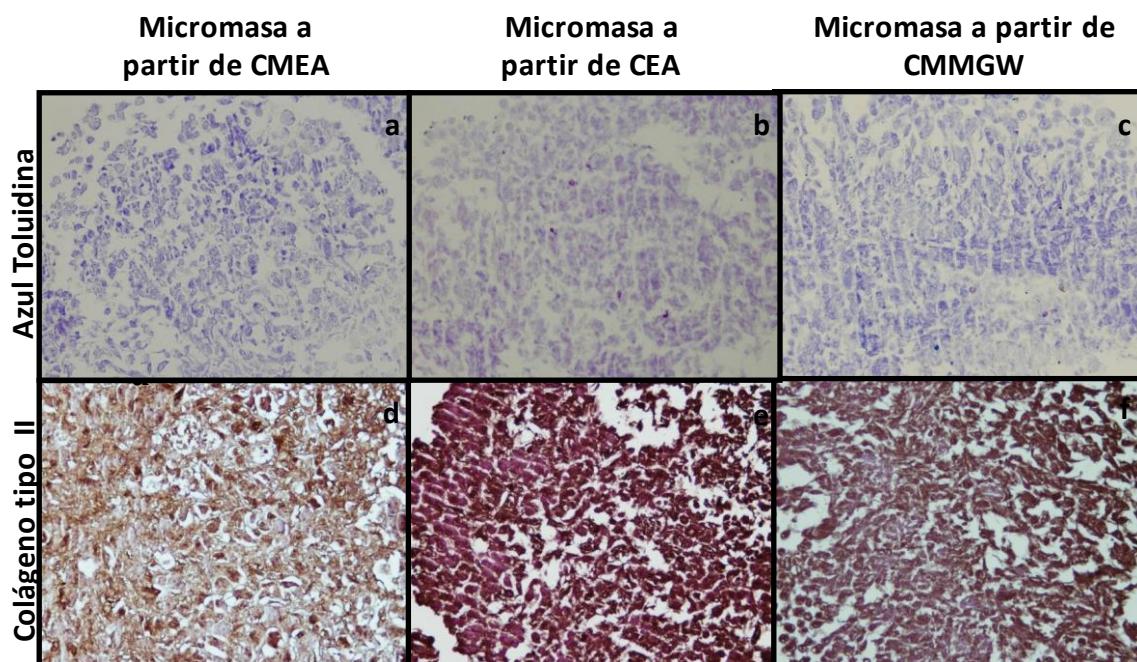


Figura R35: Diferenciación condrogénica de las CMEA, CEA y CMMGW después de 21 días en medio de inducción condrogénico en una micromasa representativa. Tinción de azul de toluidina para detectar la presencia de PG sulfatados en las CMEA (a), en las CEA (b) y en las CMMGW (c). Análisis inmunohistoquímico para detectar la expresión de colágeno tipo II en las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f) en las secciones de las micromasas después de la diferenciación. 400X.

3. Diferenciación de las CMEA, CEA y CMMGW hacia células similares a células nerviosas

Para determinar si las CMEA, CEA y CMMGW se podían diferenciar a células nerviosas, se cultivaron en el medio de inducción neural durante 21 días, y se analizaron tanto morfológica como antigénicamente.

Los cambios morfológicos en los tres tipos celulares se hicieron rápidamente evidentes después de 4 días en cultivo. El citoplasma se retrajo hacia el núcleo formando un anillo contráctil alrededor del cuerpo celular y se generaron extensiones desde el cuerpo celular similares a las encontradas en las neuronas (Figura R36a-c).

Al final de la diferenciación, a los 21 días, los tres tipos celulares se parecieron a células similares a neuronas, con cuerpos retráctiles, largos procesos y la formación de estructuras similares a redes neuronales. La presencia de estructuras granulares similares a los cuerpos de Nissl se observaron en estas células (Figura R36e y f flecha).

En contraste a estos resultados, los controles de la diferenciación neurogénica llevados a cabo en el medio control DMEM con 10% de SBF y 1% de P/E, no presentaron la morfología de neuronas sino que mantuvieron la morfología original (Figura R36 g-i).

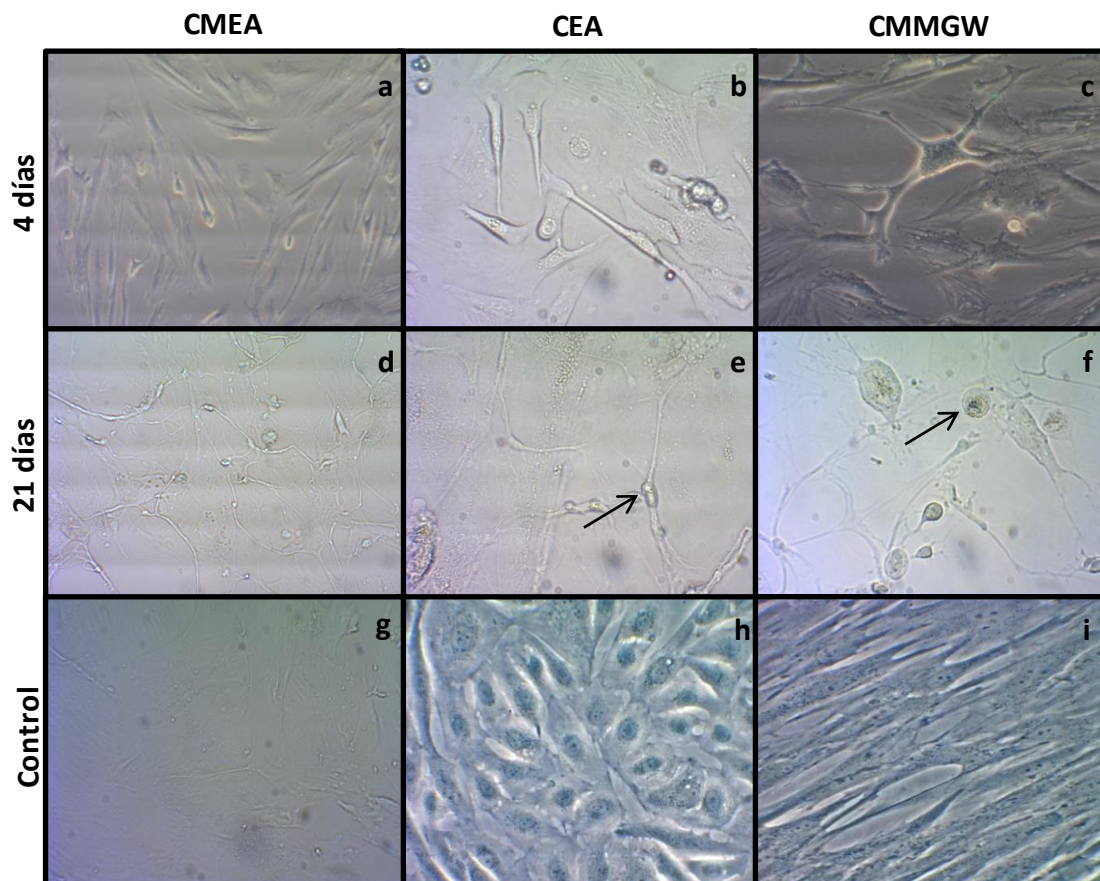


Figura R36: Diferenciación *in vitro* de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas. Imágenes de microscopía invertida de contraste de fases de la morfología de las CMEA (a), CEA (b) y de las CMMGW (c) cultivadas con medio de inducción neural a los 4 días de cultivo. Al final del cultivo (21 días) las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f) desarrollaron extensiones similares a las de las neuronas y células gliales que no se vieron cuando se cultivaron con el medio control (g-i). 400X.

Resultados

Para testar la posible expresión de antígenos de neuronas, células gliales y precursores neuronales y gliales en las células diferenciadas a células similares a células nerviosas, se realizó el análisis por inmunofluorescencia (n=3). Los resultados mostraron que la mayoría de las CMEA, CEA y CMMGW se diferenciaron a células similares a células nerviosas pues expresaron marcadores de estas células después de 21 días de cultivo en el medio de inducción.

*NF

Los 3 tipos celulares obtenidos expresaron NF (marcador de neuronas) cuando las cultivamos en el medio control CMEA=25,58±4,1%, CEA=13,20±7,54% y CMMGW=34,92±6,35% (Figura R37a-c). Después de la inducción las expresiones fueron de CMEA=57,2±11,77%, CEA=82,51±8,54% y CMMGW=74,82±5,03% (Figura R37d-f).

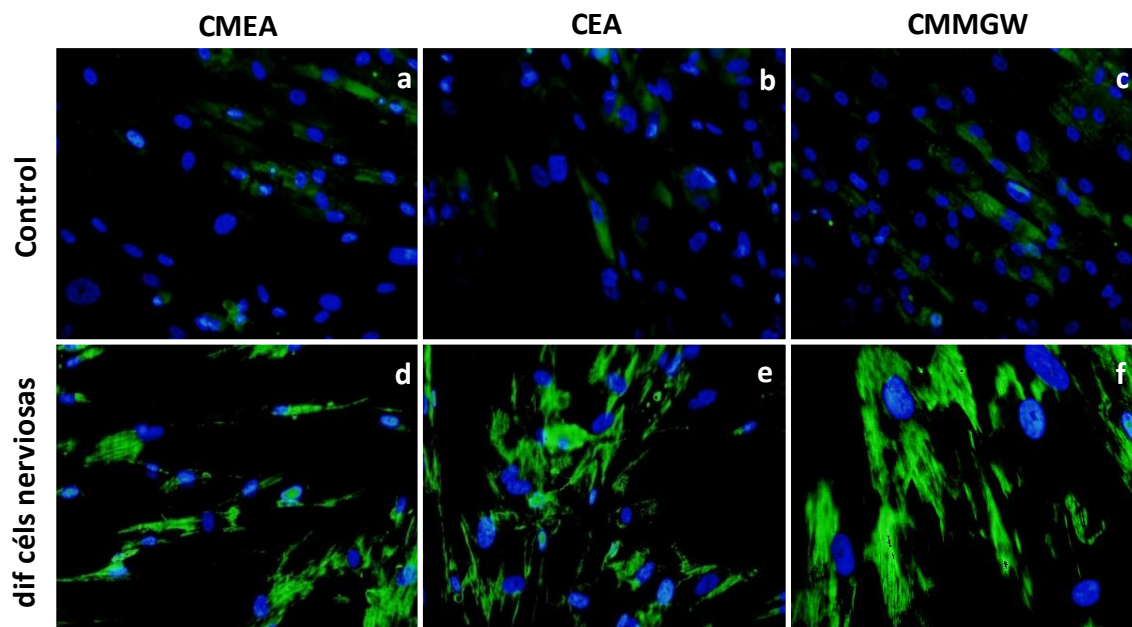


Figura R37: Análisis de la diferenciación *in vitro* de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador NF en una zona representativa. Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de NF en las CMEA (a), CEA (b) y de las CMMGW (c) cultivadas en medio control como después de cultivarlas con el medio de inducción neural durante 21 días de las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f). Núcleos teñidos con DAPI. 200X.

***GFAP**

Los 3 tipos celulares obtenidos expresaron GFAP (marcador de astrocitos) cuando las cultivamos en el medio control CMEA=26,47±5,88%, CEA=18,33±6,30% y CMMGW=35,29±4,12% (Figura R38a-c). Después de la inducción las expresiones fueron de CMEA=55,44±24,94%, CEA =53,66±26,85% y CMMGW=52,24±23,99% (Figura R38d-f).

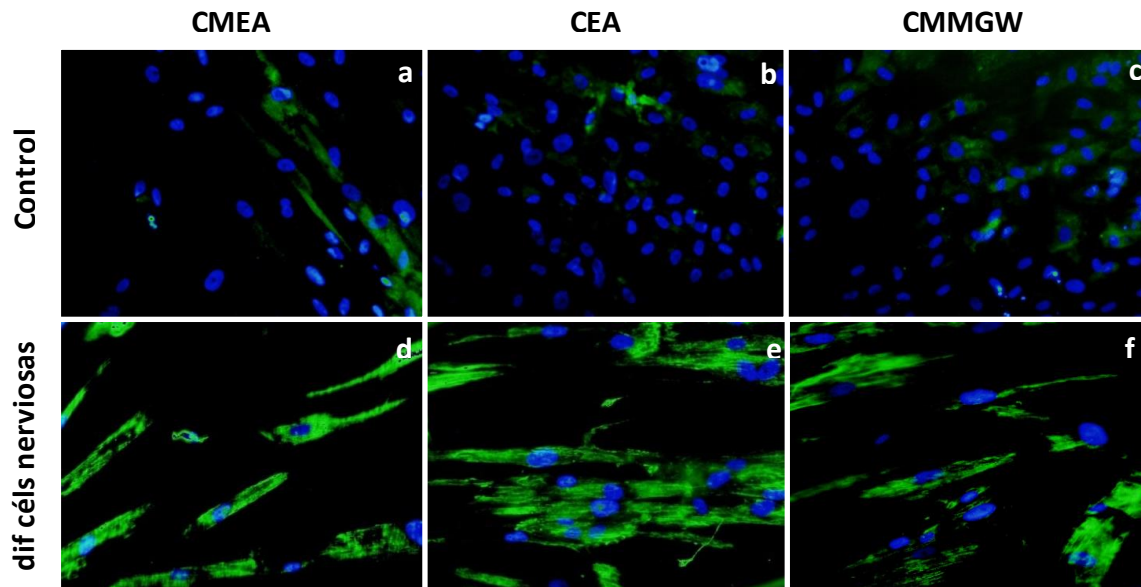


Figura R38: Análisis de la diferenciación *in vitro* de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador GFAP en una zona representativa. Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de GFAP en las CMEA (a), CEA (b) y de las CMMGW (c) cultivadas en medio control como después de cultivarlas con el medio de inducción neural durante 21 días de las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f). Núcleos teñidos con DAPI. 200X.

*** NGFR**

Los 3 tipos celulares obtenidos expresaron NGFR (marcador de neuronas) cuando las cultivamos en el medio control CMEA=25,1±2,3%, CEA=33,34±6,31% y CMMGW=20,98±7,32% (Figura R39a-c). Después de la inducción las expresiones fueron de CMEA=43,28±21,6%, CEA=67,12±19,11% y CMMGW=91,73±1,08% (Figura R39d-f).

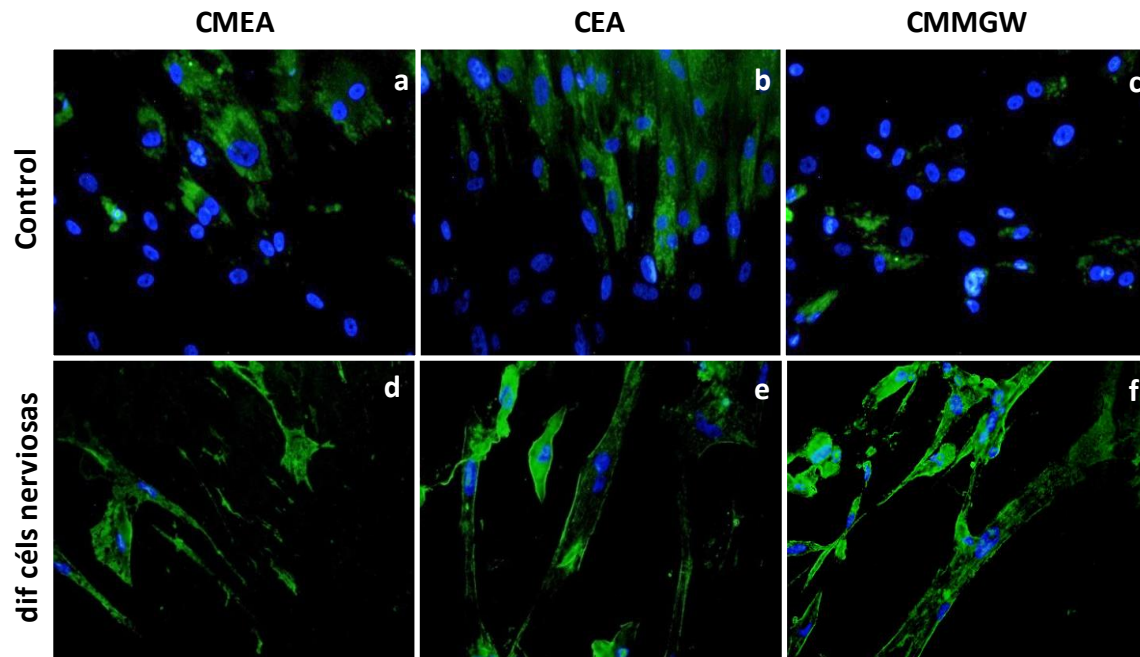


Figura R39: Análisis de la diferenciación *in vitro* de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador NGFR en una zona representativa. Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de NGFR en las CMEA (a), CEA (b) y de las CMMGW (c) cultivadas en medio control como después de cultivarlas con el medio de inducción neural durante 21 días de las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f). Núcleos teñidos con DAPI. 200X.

*** S100**

Los 3 tipos celulares obtenidos expresaron S100 (marcador de células gliales) cuando las cultivamos en el medio control CMEA=34,48±2,71%, CEA=15,38±4,62% y CMMGW=21,22±3,23% (Figura R40a-c). Después de la inducción las expresiones fueron de CMEA=39,53±0,97%, CEA=63,82±1,87% y CMMGW=83,29±3,66% (Figura R40d-f).

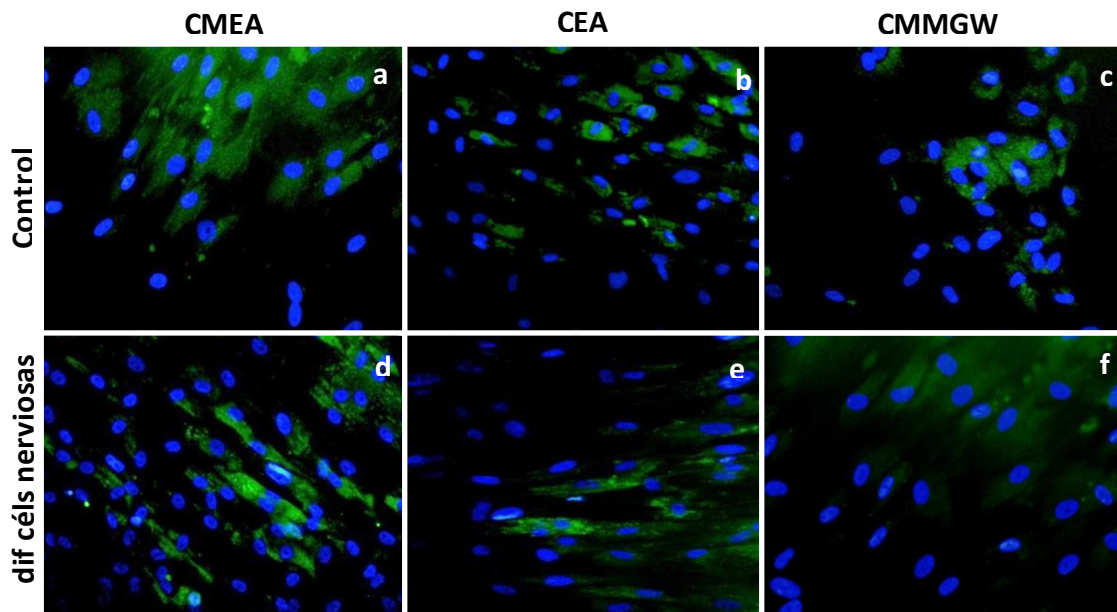


Figura R40: Análisis de la diferenciación *in vitro* de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador S100 en una zona representativa. Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de S100 en las CMEA (a), CEA (b) y de las CMMGW (c) cultivadas en medio control como después de cultivarlas con el medio de inducción neural durante 21 días de las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f). Núcleos teñidos con DAPI. 200X.

*** Vimentina**

Los 3 tipos celulares obtenidos expresaron vimentina cuando las cultivamos en el medio control (marcador de precursores neuronales y gliales) CMEA=76,92±3,07%, CEA=4,47±7,61% y CMMGW=78,04±4,87% (Figura R41a-c). Después de la inducción las expresiones fueron de CMEA=92,39±2,86%, CEA=59,77±5,71% y CMMGW=96,8±0,25% (Figura R41d-f).

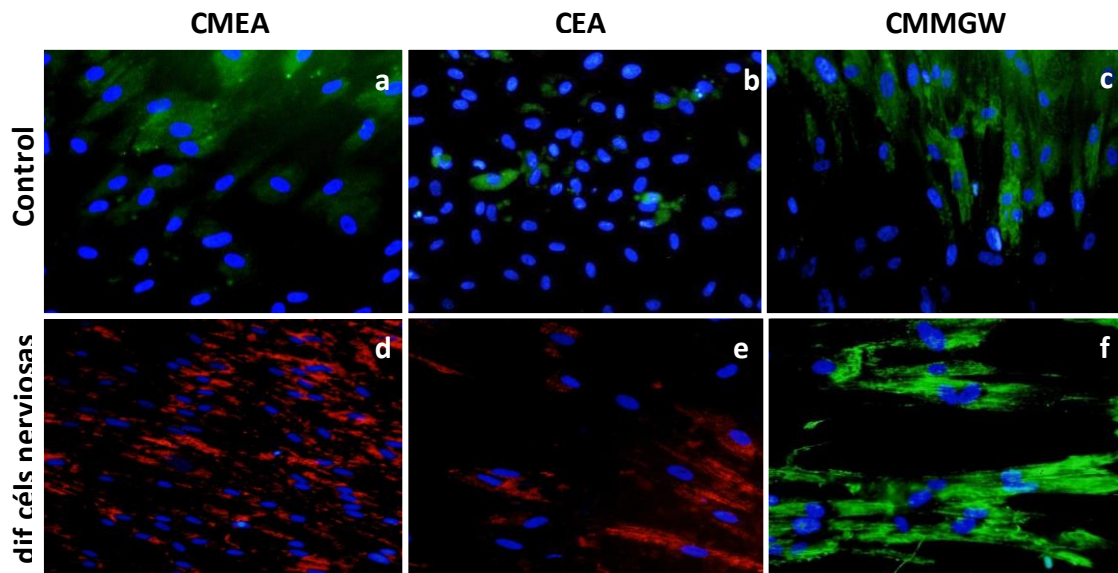


Figura R41: Análisis de la diferenciación *in vitro* de las CMEA, CEA y de las CMMGW hacia células similares a células nerviosas con el marcador vimentina en una zona representativa. Análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de vimentina en las CMEA (a), CEA (b) y de las CMMGW (c) cultivadas en medio control como después de cultivarlas con el medio de inducción neural durante 21 días de las CMEA (d), CEA (e) y CMMGW (f). Núcleos teñidos con DAPI. 200X.

Estadísticamente (prueba ANOVA) existen diferencias significativas entre las células similares a células nerviosas desde los 3 tipos celulares respecto a la expresión de NF ($p < 0,01$), NGFR ($p < 0,01$), S100 ($p < 0,05$) y vimentina ($p < 0,01$), pero no existen diferencias significativas en la expresión de GFAP ($p > 0,05$).

4. Proliferación de las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas

Se utilizó el ensayo colorimétrico MTT para analizar la capacidad proliferativa de las células similares a células nerviosas obtenidas tras el proceso de inducción. Para ello, se cultivaron con el medio de cultivo comercial específico para neuronas, Quantum 286+G5 solamente (cuando lo usamos como control positivo) o añadiendo varias concentraciones del medio condicionado por la MA. Los resultados mostraron que las CMEA diferenciadas a células similares a células nerviosas mostraron gran proliferación, en presencia de todos los medios testados, aunque el mejor medio fué el medio comercial neuronal ($0,2357 \pm 0,0158$ DO); pero sin diferencias significativas ($p > 0,05$; prueba U-Mann Whitney) con el medio condicionado de la MA al 75%. Para las células diferenciadas desde las CEA, la mejor condición para la proliferación fue el medio condicionado de la MA al 75% ($0,1158 \pm 0,0051$ DO, $p > 0,05$) y para las células diferenciadas desde las CMMGW fue el medio condicionado de la MA al 100% ($0,1215 \pm 0,0142$ DO, $p > 0,05$), pero otra vez ambos no presentan diferencias significativas comparado con el medio neural comercial (Figura R42).

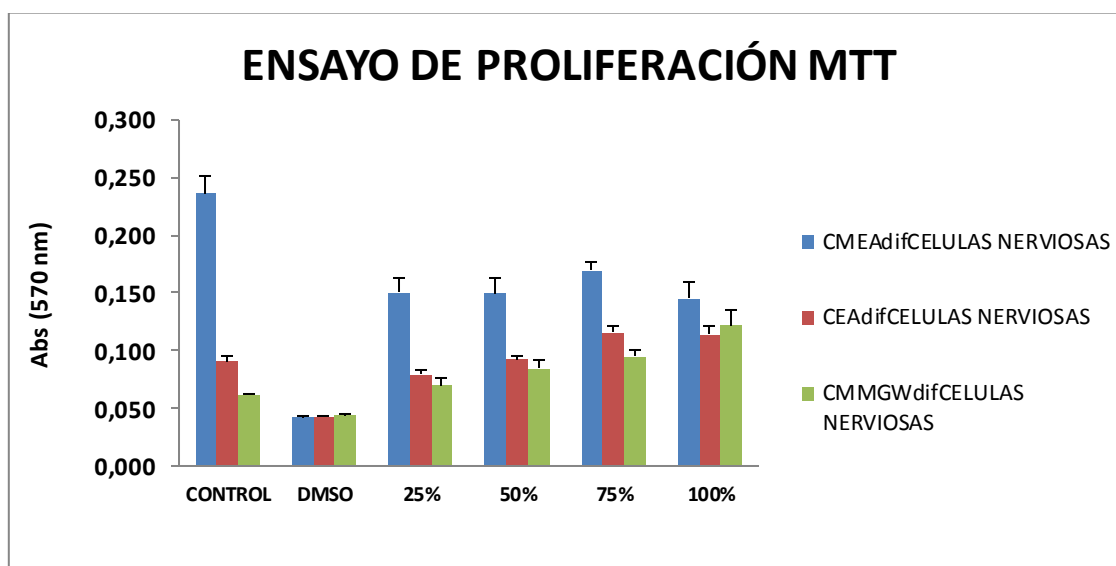


Figura R42. Análisis de la proliferación celular con MTT (n= 5). Se representan las medias y la desviación típica de los valores.

5. Desarrollo de un equivalente de tejido nervioso con la Membrana Amniótica como soporte (modelo *in vitro*)

Para sintetizar el equivalente de tejido nervioso, se descongelaron los parches de MA, se descelularizaron con 1% de T/E a 37°C durante 30 min y se colocaron en los dispositivos *Cell Crown™* con la membrana basal del lado epitelial hacia arriba.

Cuando las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas se sembraron de forma independiente sobre la MA descelularizada (Figura R43a), los tres tipos celulares se adhirieron a la membrana basal de ésta y crecieron

Resultados

sobre ella (Figura R43b-d). En cultivo, las células similares a células nerviosas procedentes de las CMEA (Figura R43b) y CMMGW (Figura R43d) colonizaron más rápidamente a través de sus extensiones la MA que las células diferenciadas procedentes de las CEA (Figura R43c). Las células diferenciadas desde las CEA tienen una morfología más redondeada con pocas extensiones.

6. Análisis histológico del equivalente de tejido nervioso *in vitro*

Las secciones longitudinales de los bloques de parafina correspondientes a cada una de los equivalentes se tiñeron con colorantes propios de tejidos nerviosos, tales como azul de toluidina y la tinción de Bielchowsky. Los resultados demostraron que el soma de las células similares a células nerviosas se localizó sobre la membrana basal y los cuerpos de Nissl se encontraron en los somas de estas células, en cantidades similares en las células diferenciadas procedentes de las CMEA y CEA como de las CMMGW (Figura R43f-h). La tinción de Bielchowsky tiñó los axones de las células nerviosas mostrando que los axones estaban sobre la membrana basal, pero también integrados en el estroma de la MA (Figura R43j-m). Algunos axones se pudieron ver transversalmente (Figura R43j flecha).

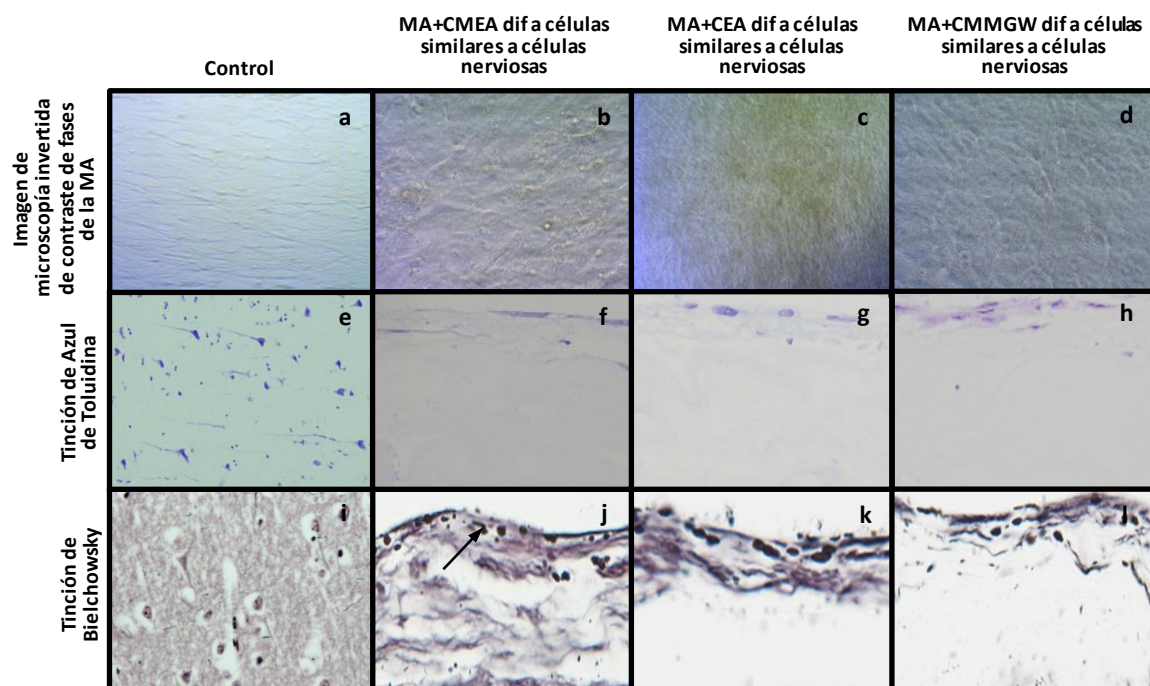


Figura R43. Análisis histológico de las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas sobre la MA descelsularizada en una zona representativa. Imágenes de microscopía invertida de contraste de fases de la MA descelsularizada (a) y de la MA con las células diferenciadas desde las CMEA (b), CEA (c) y desde CMMGW (d). Análisis histoquímico con la tinción de azul de toluidina del tejido control (cerebro; e) y de la MA con las células diferenciadas procedentes de las CMEA (f), CEA (g) y de las CMMGW (h) y con la tinción de Bielchowsky del tejido control (cerebro; i) y de la MA con las células diferenciadas procedentes de las CMEA (j; flecha: axón transversal), CEA (k) y de las CMMGW (l). 200X (a-d) y 400X (e-l).

VI. DISCUSIÓN

La Medicina Regenerativa es un campo relativamente nuevo de la biomedicina basado en la generación de sustitutos biológicos para mejorar la función de los tejidos que abarca tanto la Terapia Celular como la Ingeniería Tisular (Toda et al., 2007). La Ingeniería Tisular es un campo científico interdisciplinar que se basa en el uso combinado de soportes y cultivos celulares (Lohmeyer et al., 2011). Su propósito es reparar o si es posible regenerar las funciones biológicas del tejido dañado (de la Puente et al., 2011) sintetizando un adecuado equivalente del tejido en cuestión (Lohmeyer et al., 2011) a través de tres componentes críticos: 1) células madre o diferenciadas; 2) un soporte biocompatible para el cultivo de dichas células y 3) factores de crecimiento y/o diferenciación (de la Puente et al., 2011; Toda et al., 2007).

En este trabajo nos hemos centrado en analizar el posible uso de la Ingeniería Tisular aplicada a la piel y al sistema nervioso para analizar nuevas vías e intentar lograr regenerar la función de estos tejidos.

A. INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL

La Medicina Regenerativa aplicada a la piel surgió como terapia experimental para el tratamiento de las heridas principalmente a raíz de la necesidad crítica de lograr una rápida cobertura permanente para las quemaduras extensas. Hasta entonces, el tratamiento estándar de las quemaduras severas se basaba en el injerto de piel obtenida de una zona no dañada del cuerpo del propio paciente (autoinjerto). Este sigue siendo el método de elección siempre y cuando el daño no sea demasiado extenso y el paciente disponga de suficiente piel sana. Sin embargo, este procedimiento es lento y da como resultado una piel con un efecto cosmético muy deficiente en el sitio de la quemadura debido a que, para expandir su superficie 3-4 veces, la piel procedente del sitio donante se somete a mallado y estiramiento, además de que se puede infectar el sitio lesionado, existe un elevado gasto quirúrgico, morbilidad adicional y puede haber fallos en los injertos. Por otra parte, este método es difícil de aplicar en pacientes con quemaduras en más del 50% de la superficie corporal por los limitados sitios donantes (Macri y Clark, 2009) y se crean lesiones adicionales (Zhang y Fu, 2008).

Ante este problema, Rheinwald y Green, (1975) empezaron a trabajar en el cultivo de queratinocitos desarrollando láminas de epitelio a partir de éstos como tratamiento alternativo para los pacientes con pérdida de piel. Este procedimiento permitió expandir a los queratinocitos aproximadamente 10.000 veces su número inicial. Así, 2 cm² de piel de un sitio donante es suficiente para cubrir una superficie corporal de 2m², lo que constituye una de las bases fundamentales del interés clínico en los sustitutos epidérmicos (Velásquez et al., 2008). Esto supuso un gran avance en el tratamiento de los grandes quemados, reduciendo la mortalidad desde un 48% a un 14% (Currie et al., 2001). Esta técnica de expansión de queratinocitos *in vitro* propuesta por Rheinwald y Green, (1975) requiere que la lámina de epitelio esté confluyente antes de despegarla, por lo que, la utilización de la dispasa, una proteasa capaz de desprender

la lámina entera del frasco de cultivo, constituyó un importante avance técnico que convirtió en una realidad clínica el injerto de estas láminas (Jorcano, 2009).

Sin embargo, desde una perspectiva clínica, estas láminas de epitelio presentaban dificultades relacionadas con el elevado tiempo de cultivo de los queratinocitos que se requiere, durante el cual los pacientes podrían empeorar; con la elevada fragilidad que los injertos de estas láminas de epitelio poseen en ausencia del componente dérmico; con la pobre tasa de injerto (entre 15 al 70%) (Currie et al., 2001) y con la ultraestructura anormal de la UDE, esencial para la homeostasis, la organogénesis de la piel y su regeneración (Li et al., 2012), que causa la formación de ampollas y genera contracturas (Svensjö et al., 2002; Velásquez et al., 2008). Por ello, se hizo evidente la necesidad de un sistema de reemplazo cutáneo más robusto y que se pareciera más a la estructura de la piel para mejorar la calidad de la epidermis y acelerar la regeneración (Svensjö et al., 2002).

Las técnicas de Ingeniería Tisular que se aplican actualmente en la reparación de la piel dañada en pacientes con diferentes patologías generalmente incluyen la reconstrucción de la piel *in vitro* mediante el aislamiento de los queratinocitos de la epidermis y de los fibroblastos de la dermis y su expansión a partir de técnicas de cultivo específicas incluyendo la construcción de una matriz o soporte para el desarrollo adecuado de estas células. En base a ello, en esta tesis nos planteamos analizar por un lado la búsqueda de nuevos medios para favorecer el cultivo de las células de estos equivalentes en condiciones más seguras y eficaces para su posible aplicación en la clínica, y por otra comprobar dos posibles alternativas como soporte para la obtención de los equivalentes de piel: la matriz de fibrina sintetizada con plasma y el uso de la MA.

1. Obtención del medio de cultivo adecuado para la expansión de los cultivos primarios de las células y de los equivalentes de piel

Las células de los equivalentes de piel se obtuvieron a partir de pequeñas biopsias de piel, utilizando al igual que otros grupos (Llames et al., 2004; Arvelo et al., 2004) la colagenasa para optimizar la obtención de fibroblastos y posteriormente una digestión con T/E para aislar los queratinocitos. La última suspensión celular obtenida normalmente contenía aún cierta cantidad de fibroblastos dérmicos, sin embargo, éstos no nos entorpecieron el cultivo de los queratinocitos. Este método permitió la obtención de queratinocitos y fibroblastos autólogos que son necesarios para evitar el rechazo inmune una vez injertado el equivalente de piel. Aunque existen estudios que comprobaron que los fibroblastos alogénicos en las úlceras venosas no mostraron evidencias de rechazo inmunológico en los pacientes, debido seguramente a que las células presentadoras de antígenos como las células de Langerhans se pierden gradualmente durante los cultivos *in vitro* de los queratinocitos y fibroblastos (Wong et al., 2007), estudios recientes demuestran, sin embargo, el beneficio de los fibroblastos

autólogos en la reparación de las heridas en términos de funcionalidad y resultados estéticos (Llames et al., 2006; Svensjö et al., 2002).

Nuestros resultados mostraron que la edad de los donantes de las biopsias de piel empleadas como fuente de células es un parámetro que influye mucho en la extracción y en la capacidad de proliferación de las células obtenidas, ya que a partir de las biopsias procedentes de donantes más jóvenes pudimos extraer un mayor número de células que se expandieron a una mayor velocidad que a partir de las muestras procedentes de donantes que tenían más edad. Estos resultados fueron similares a los ya observados por Llames et al., (2004). Se sabe que la vida media de los queratinocitos declina con la edad sugiriendo diferencias intrínsecas en el potencial de crecimiento de las células madre y la proporción de las células diferenciadas terminalmente entre los pacientes más jóvenes y los más mayores (Papini et al., 2003).

Nuestro primer objetivo fue obtener el medio de cultivo más adecuado para el cultivo de estas células y que al mismo tiempo fuese seguro para su posible aplicación en clínica. Hasta la fecha, el cultivo de queratinocitos se realizaba con un medio que llevaba varios factores de crecimiento entre ellos la toxina colérica, sin embargo, nosotros quisimos estudiar su posible eliminación durante todo el proceso del cultivo debido a que es una toxina obtenida de una bacteria y por tanto, no aconsejable para su aplicación en humanos. Para ello, comparamos la proliferación de los queratinocitos en el MQ en presencia o ausencia de la toxina y observamos que aunque a los 4 días los queratinocitos proliferaban mejor con el MQ en presencia de toxina, al cabo de 10 días el MQ sin toxina fue con el que mejor resultados obtuvimos, lo que indica que la toxina se puede eliminar del medio de cultivo sin que los queratinocitos pierdan la capacidad de proliferar. Nuestros resultados de los cultivos primarios *in vitro* se correlacionan con los que había observado en el año 1981 Kuroki *in vivo*, cuando utilizó la toxina colérica en el dorso de la piel de los ratones para comprobar si al igual que *in vitro* daba lugar a un aumento de la proliferación de los queratinocitos. Inicialmente, al igual que en nuestros experimentos, se produjo una estimulación mitótica de los queratinocitos basales de la epidermis que mostraron marcados picos a las 24 y 48 h después de la inyección produciendo hiperplasia, incremento progresivo del grosor de la epidermis desde las 32 h siendo 4-6 veces mayor a los 4 días y el posterior decrecimiento adquiriendo el grosor normal a los 7 días (Kuroki, 1981).

Actualmente para el uso en clínica de los equivalentes de piel es necesario eliminar no sólo la toxina colérica, sino otros elementos de origen animal como el SBF y las células alimentadoras 3T3, ya que la persistencia de estas células de origen murino y residuos de proteínas animales desde el SBF usado en el sistema de cultivo podría causar rechazo del injerto tardío debido a la respuesta inmune (Mazlyzam et al., 2007). Por ello, en nuestro trabajo quisimos evaluar también la obtención y el cultivo de los cultivos primarios de los queratinocitos con dos medios de cultivo comerciales específicos para estas células sin estos componentes (07 y 57 *EpiGRO*TM). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que con ambos medios comerciales obtuvimos una

menor tasa de proliferación que al utilizar el MQ sin toxina pero en presencia de SBF y 3T3. En un reciente trabajo de Sabapathy et al., (2014) propusieron usar como alternativa del SBF, lisado de plaquetas humanas en sus cultivos de CMMGW. Así Alexaline et al., (2015) lo usaron posteriormente en su cultivo primario de fibroblastos para sintetizar su equivalente de piel basado en plasma, aunque los cultivos primarios y secundarios de los queratinocitos los realizaron con el mismo medio que nosotros (MQ sin toxina). Además, utilizaron los fibroblastos humanos obtenidos de la biopsia como células alimentadoras en lugar de células 3T3 que los irradiaron y con SBF, requiriendo 20-24 días para obtener su equivalente.

Por ello, decidimos trabajar con el MQ sin toxina colérica, tanto para los cultivos primarios como secundarios, obteniendo los mismos resultados en cuanto a rendimiento celular se refiere que otros investigadores que la incluían en el medio (Llames et al., 2004; Pellegrini et al., 1999). Además, tras la obtención de los queratinocitos de la biopsia y cultivo primario sobre las células 3T3, obtuvimos una monocapa de células que expresaron CK tras 5 días de cultivo al igual que en otros trabajos que sí que usaron la toxina colérica para realizar dicho cultivo primario (Pajoum et al., 2009).

Una vez obtenidos los queratinocitos y los fibroblastos y el medio de cultivo más adecuados para los queratinocitos, el siguiente paso fue la obtención del soporte del equivalente de piel.

2. Soporte para la proliferación de las células en los equivalentes de piel

Convencionalmente, los equivalentes de piel se construyen en dos pasos: primero se amplifican las células, tanto los queratinocitos como los fibroblastos, en un soporte 2D como una placa o frasco de cultivo y se realizan subcultivos. Estas células madre se diferencian debido a las repetidas digestiones enzimáticas, por lo que decrece su actividad proliferativa (Groeber et al., 2011). Además, las interacciones entre las células y entre las células y la MEC son responsables del control de la acción celular y de la expansión celular en monocapa que los soportes 2D no pueden hacer frente debido a la relativa complejidad del microambiente *in vivo* (Groeber et al., 2012). Se requiere por tanto, un soporte 3D, que proporcione este microambiente. El cultivo en un sólo paso en soportes 3D amplifica un gran número de células madre para la construcción de equivalente de piel, acortando los tiempos de la construcción y evitando el posible daño a las células debido a las repetidas digestiones, mejorando la adhesión y actividad proliferativa de las células madre, proporcionando una estrategia y un camino para trasladarlo a la clínica (Taghiabadi et al., 2015a; Ji et al., 2011).

2.1. Equivalente de piel basado en la utilización de plasma humano como soporte

Una de las alternativas que se han seguido es la síntesis de un equivalente de piel que incluya el cultivo de los queratinocitos epidérmicos sobre el componente dérmico, basado este último en la creación de una estructura 3D o matriz en la que se encuentren incluidos los fibroblastos (Llames et al., 2004).

Los primeros ensayos clínicos con equivalentes de piel se llevaron a cabo usando matrices de colágeno. La razón se debe a que los fibroblastos que proliferan producen colágeno, que es el principal componente de la MEC de la piel en el estadio final de la curación de las heridas (Hojo et al., 2003). Tanto el colágeno como la fibrina son estructuras en forma de fibrillas naturales que pueden encapsular a las células y a los factores de crecimiento. Como soporte, ambos presentan similares efectos en la proliferación celular y viabilidad. Cuando se refiere a la curación de las heridas, la fibrina presenta más ventajas porque de forma natural promueve la angiogénesis (Feng et al., 2013); las moléculas de la MEC provisional tales como la fibronectina y ciertos productos de degradación de la fibrina estimulan la expresión de integrina $\alpha 5 \beta 3$ en las células endoteliales induciendo la infiltración celular y la formación de capilares en el coágulo que en los soportes de colágeno no sucede (Whelan et al., 2014).

Existen principalmente dos fuentes de fibrina humana: la fibrina de los pegamentos tisulares comerciales y la fibrina obtenida a partir del plasma. Actualmente, la primera es la fuente de fibrina comúnmente usada.

En un principio Ronfard et al., (1991) y Pellegrini et al., (1999) desarrollaron la técnica de cultivar láminas de queratinocitos autólogos del mismo modo que Rheinwald y Green, (1975) pero sobre el pegamento tisular comercial de fibrina *in vitro* manteniendo la matriz de fibrina durante 15 días, probablemente por el uso de aprotinina que evita su destrucción. Los beneficios se hicieron evidentes en los modelos animales de ratón cuando se pulverizó el lecho de la herida con el pegamento tisular comercial de fibrina antes de la deposición de la lámina de queratinocitos comparado con el grupo control en el cual no se utilizó, observando una semana después del trasplante, que el porcentaje de injerto fue superior. Por lo tanto, esta técnica facilitó la manipulación de las láminas de queratinocitos que hasta ahora eran muy frágiles (Kaiser et al., 1994) aumentando la tasa de injerto en un 20% (Currie et al., 2001). El problema derivado del empleo de los pegamentos tisulares comerciales es la necesidad de emplear múltiples unidades de crioprecipitados de fibrinógeno y fibronectina de donantes combinados con varios factores para obtenerlos.

El uso de plasma como fuente de fibrina en lugar de fibrina derivada de los pegamentos tisulares comerciales, representa una gran ventaja ya que el plasma solamente requiere la adición de calcio para coagular y conseguir la matriz de fibrina, mientras que con fibrina derivada de la otra fuente es más laboriosa, consume más tiempo y es menos económica (Currie et al., 2001). Por todas estas razones, en el

trabajo presentado en esta tesis, escogimos utilizar el plasma humano para obtener un soporte y sintetizar el equivalente de piel.

Para ello, usamos plasma sin la necesidad de concentrarlo, simplemente lo obtuvimos por fraccionamiento directo de la sangre completa, siendo fácil de procesar y pudiendo ser autólogo eliminando el riesgo de transmisión viral. El bajo volumen de plasma necesario para la síntesis de la matriz de fibrina hace que se puedan preparar grandes cantidades de equivalentes de piel a partir de un solo paciente o donante.

Otro factor importante en la formación de la matriz es que esté formado por una red de poros interconectados, que permitan que las células puedan migrar, multiplicar y proliferar a través del soporte, y en sentido el fibrinógeno es el factor más importante en cuanto a la estructura porosa. Existen estudios para determinar la mejor formulación de las matrices de fibrina a partir de fibrina obtenida de los pegamentos tisulares comerciales, que presenta una concentración de fibrinógeno entre 60-115 mg/mL, dando lugar a la elevada fuerza tensil y fuerte adhesión (Reinertsen et al., 2014), propiedades que no son esenciales para su uso como soporte. Para que los queratinocitos y fibroblastos presenten una mejor proliferación, Sese et al., (2011) determinaron que las matrices de fibrina sintetizadas a partir de los pegamentos tisulares comerciales con un rango de concentración de fibrinógeno (5-34 mg/mL) y una concentración muy baja de trombina de 1U/mL producen una proliferación celular óptima para ambos tipos celulares cuando se cocultivan.

Las modificaciones en las concentraciones de fibrinógeno y trombina, además de afectar a la migración y a la morfología de las células, afectan a la cinética de liberación de los factores de crecimiento desde las matrices de fibrina que están particularmente influenciada por la cantidad de entrecruzamientos, la densidad de la matriz, la composición y la degradación. Incrementando el fibrinógeno y trombina se incrementa la reticulación y decrece la degradación y la porosidad. Con respecto a la migración, en las matrices con elevada concentración de fibrinógeno, la migración de las células es menor, mientras que en las matrices con concentraciones menores la migración es mayor. En cuanto a la morfología de las células, ésta se altera también por la concentración de la fibrina; en matrices con baja concentración de fibrinógeno, los tipos celulares adherentes se muestran muy alargados y estirados (se asocia con una proliferación robusta) mientras que con elevadas concentraciones (50 mg/ml) aparecen redondeadas. El sembrar un óptimo número de células para la proliferación y supervivencia dentro de la matriz de fibrina también varía alrededor de 3×10^5 - 1×10^6 células/ml de fibrina. También si la densidad de la matriz se incrementa se inhibe la morfogénesis capilar *in vivo* y la liberación de los factores de crecimiento decrece (Whelan et al., 2014).

En nuestros experimentos, la concentración de fibrinógeno osciló entre 2-3,5 mg/mL, asegurando una buena incorporación, adherencia, y proliferación de los fibroblastos, que afecta a la migración, proliferación y diferenciación de los queratinocitos, como demostró de la Puente et al., (2011) utilizando la concentración

fisiológica de fibrinógeno en torno a 2 mg/ml (1-5 mg/ml). Esta concentración utilizada es un poco menor a la recomendada cuando se usan los pegamentos tisulares comerciales como fuente de fibrina, pudiendo deberse a los otros componentes presentes en los pegamentos.

Otros elementos clave en nuestra matriz fueron la adicción de CaCl_2 y ácido tranexámico, sustituyendo a las proteínas de origen animal, trombina y aprotinina empleadas en otros trabajos que conllevan el riesgo de transmitir enfermedades. La recogida de la sangre total se suele realizar en presencia de citrato sódico que secuestra el calcio presente en la sangre e impide la coagulación. La trombina bovina que inicia la coagulación la sustituimos al activar la protrombina endógena mediante la adicción de CaCl_2 . Por otro parte, la plasmina, la principal enzima fibrinolítica que deriva del plasminógeno y que puede ser activada por serin proteasas, tanto por el activador tisular del plasminógeno (tPA) como por el activador uroquinasa del plasminógeno (uPA) procedentes de los queratinocitos (Martin, 1997), la pudimos inhibir con un antifibrinolítico sintético, el ácido tranexámico, que es un inhibidor del tPA y por ello, es más específico que la aprotinina usada por otros investigadores, que es un inhibidor inespecífico de las serin proteasas pero no tiene ninguna acción específica sobre el tPA. Este ácido tranexámico retrasa significativamente la degradación hasta los 10-15 días (Whelan et al., 2014) evitando la pérdida de las propiedades mecánicas hasta el trasplante (Taghiabadi et al., 2015a).

El plasma no solo aporta las proteínas estructurales de la matriz (creando un soporte 3D de fibrina) sino que también contiene algunas moléculas que ayudan a la adhesión celular, tales como fibronectina (necesarias para que los fibroblastos puedan fijarse a la matriz e iniciar sus funciones fisiológicas), es un reservorio para factores de crecimiento, plaquetas, citoquinas y enzimas, que pueden promover la proliferación de los fibroblastos y queratinocitos, incluso la adipogénesis (Kober et al., 2015) y estimular y acelerar la curación del tejido. Además de poseer un gran potencial como sistema de liberación de las células cultivadas y factores de crecimiento.

En nuestros experimentos, además de utilizar el plasma como fuente de fibrina elegimos realizar los cultivos secundarios de forma sumergida, pudiendo observar que a los 11-14 días ya poseíamos un equivalente de piel similar al que obtuvieron otros investigadores que utilizaron la interfase aire-líquido (Ramió-Lluch et al., 2017; Llames et al., 2004; Arvelo et al., 2004; Meana et al., 1998). De esta manera, mediante el cultivo sumergido las células proliferativas (holoclonos) se pueden mantener como tales (Cerqueira et al., 2012; Pellegrini et al., 1999) a diferencia de los equivalentes de piel cultivados utilizando el método interfase aire-líquido (Pajoum et al., 2009; Lee et al., 2003). El medio usado para tal fin fue el MQ porque se sabe que los fibroblastos cultivados en el MF sin los suplementos usados en el MQ, raramente forma una lámina fibrosa (Lee et al., 2006). Con referencia a las mejoras del cultivo de los fibroblastos con el MQ, el EGF estimula el crecimiento y síntesis de las otras proteínas que no son colágeno; la insulina y la hidrocortisona estimula el crecimiento y formación de

colágeno en los fibroblastos cultivados; la transferrina estimula la proliferación celular y acumulación de PG y la triiodotironina estimula la síntesis de PG (Lee et al., 2006). Los fibroblastos así cultivados empezaron a migrar y proliferar en la matriz de fibrina a los 2-3 días (Taghiabadi et al., 2015a), alcanzaron la confluencia a los 5-6 días y expresaron el antígeno vimentina, marcador de células mesenquimales (Kober et al., 2015; Pajoum et al., 2009).

Con este equivalente de piel *in vitro* sintetizado con fibrina obtenida del plasma y fibroblastos como dermis se proporcionaron todos los factores de crecimiento necesarios para el mantenimiento de los queratinocitos, consiguiendo eliminar las células alimentadoras de ratón 3T3 alogénicas de los cultivos secundarios que pudieran contaminar el injerto (Llames et al., 2004) y cultivar así directamente los queratinocitos sobre la matriz de fibrina.

Los estudios histológicos del equivalente de piel obtenido *in vitro* en las condiciones señaladas anteriormente mostraron una epidermis constituida solamente por el estrato basal. Esta epidermis se encontraba sobre una dermis de fibroblastos que aún no sintetizaron muchas fibras de colágeno, tampoco se vieron vasos sanguíneos, fibras elásticas ni melanocitos maduros. En cuanto a la membrana basal pudimos observar una ligera expresión del antígeno laminina, componente de dicha membrana. Estos resultados son similares a los modelos *in vitro* de Peña et al., (2010) y Mazlyzam et al., (2007).

Una vez obtuvimos y analizamos el equivalente de piel *in vitro* utilizando la fibrina obtenida a partir de plasma como soporte, el siguiente paso fue estudiar su posible aplicación para la regeneración de la piel en un modelo *in vivo* utilizando ratones atímicos.

Para ello, el primer paso fue separar el equivalente de piel del frasco de cultivo donde lo cultivamos. Normalmente, la utilización de otros métodos, como la obtención de láminas de epitelio, implica el uso de enzimas para despegar las células de la superficie de la placa de cultivo. La enzima que generalmente se utiliza es la dispasa, que provoca la alteración de las proteínas de la membrana basal (Lam et al., 2002), lo que conlleva posteriormente a una pobre tasa de prendimiento de los injertos (Mazlyzam et al., 2007), además de provocar la disminución de aproximadamente un 15% el potencial de clonogenicidad después de 24 h y pérdida de más del 60% de la habilidad para formar colonias después de 36 h (Pellegrini et al., 1999). La termolisina es otra enzima que escinde la UDE de la piel sin perturbar a los desmosomas de forma más rápida que la dispasa. La rapidez es crucial cuando se tienen muchas láminas para despegar. Ambas enzimas presentan similares resultados en términos de evolución del injerto después del trasplante y la cinética de reaparición de la membrana basal (Germain et al., 1995).

En nuestros experimentos, al tener un equivalente de piel compuesto tanto por queratinocitos como por fibroblastos no necesitamos de ningún enzima para despegarlo, sino que todo el equivalente se puede separar del frasco de cultivo de

forma manual. Esto es ventajoso porque no se dañan los componentes de la membrana basal, aumentando de esta forma el porcentaje de injerto en la superficie total del área dañada y la membrana basal se sintetiza a los 21 días después del trasplante (Currie et al., 2001). Esta técnica facilita el proceso ya que los equivalentes de piel que obtuvimos se pueden manipular y extraer fácilmente del frasco de cultivo y trasplantarlos manteniendo su integridad.

Antes del trasplante en los ratones del equivalente de piel obtenido, tuvimos en cuenta que actualmente sólo se obtienen buenos resultados en la aplicación de los equivalentes de piel cuando estos tienen menos de 2 mm de grosor (Kober et al., 2015). Cuando se aplican equivalentes más gruesos requieren una red capilar que libere oxígeno y nutrientes al tejido (Kober et al., 2015). En base a estos antecedentes, intentamos que todos los equivalentes de piel *in vitro* empleados tuviesen un grosor de alrededor de 2 mm, haciendo los cálculos oportunos dependiendo de las concentraciones de fibrinógeno de los plasmas.

Otro factor importante para el éxito del trasplante del equivalente de piel *in vivo*, es que el equivalente obtenido *in vitro* sea válido para su manejo quirúrgico mostrando buena flexibilidad y consistencia, pudiéndose manipular fácilmente para el posterior injerto, algo que logramos con nuestro equivalente de piel. Además, al contrario que la expansión de los queratinocitos de Rheinwald y Green, (1975), las matrices de fibrina pueden trasplantarse como cultivos subconfluentes (Pellegrini et al., 1999) reduciéndose así los tiempos de cultivo, importante en casos de necesidad inmediata. Presentan también la ventaja de proporcionar células que no sufren cambios fenotípicos asociados a la inhibición por contacto y por lo tanto, no deberían tener disminuido el potencial adhesivo ni proliferativo (Currie et al., 2001), pudiendo seguir proliferando una vez realizado el injerto hasta diferenciarse en los diferentes estratos de la piel. Además, los queratinocitos cultivados sobre las matrices de fibrina mantienen inalterado el potencial de clonogenicidad del estrato basal y de las células progenitoras durante al menos 72 h porque la adhesión a la fibrina protege este potencial durante el trasplante y manipulación (Pellegrini et al., 1999).

El siguiente paso fue preparar a los ratones para el injerto del equivalente de piel, para lo cual les creamos una herida crónica. Cuando las heridas son de pequeñas dimensiones o de forma redondeada, la curación ocurre en menos de un mes y en las heridas muy grandes se compromete la supervivencia de los animales (Mehanna et al., 2015). Para ello, al igual que en modelos similares utilizados por otros investigadores, se realizaron escisiones de espesor completo, con forma cuadrada y de un tamaño de 1x1 cm² (Sabapathy et al., 2014). Además, la contracción de la herida es una de las limitaciones más significativas cuando utilizamos como modelos de heridas humanas animales de piel floja como los ratones, por lo que teniendo esto en cuenta, extendimos la escisión hasta incluir la lámina de músculo del panículo carnoso. Este método propuesto por Karypidis et al., (2011) alivia la contracción de la piel.

Tras realizar las escisiones, se colocaron sobre la herida los equivalentes de piel del mismo tamaño, y se decidió protegerlo durante los primeros días con la piel del propio animal desvitalizada para evitar la aplicación de apósitos que pudiesen comprimir la zona trasplantada como ser los film transparente (Minamimura et al., 2014; Yang et al., 2006) o las gasas con vaselina (Pellegrini et al., 1999).

Se realizaron dos grupos experimentales, en los que se analizaron los resultados del trasplante a los 21 días o a los 4 meses.

Desde el punto de vista macroscópico, tanto a los 21 días como a los 4 meses los injertos prendieron en el lecho de la herida con una supervivencia del 100%, sin sufrir rechazo. A los 21 días, el aspecto exterior de la zona injertada fue el de una piel algo enrojecida y un poco más adelgazada que la piel de alrededor, con cierta retracción. Sin embargo, a los 4 meses ya no se distinguía el lugar donde se había realizado el injerto ni los bordes retraídos. Por tanto, a los 21 días, las heridas ya se habían curado y a los 4 meses se habían integrado perfectamente en el ratón.

Mediante el análisis histológico del equivalente de piel injertado a los 21 días del trasplante, pudimos observar su completa integración en la piel del ratón. Observamos la existencia de un estrato córneo completo imprescindible para que la piel realice su importante función de barrera frente al medio externo, indicando el desarrollo de un ciclo completo de diferenciación de los queratinocitos, que Potten y Booth, (2002) estimaron en 21 días. Este modelo de piel reconstruyó la estructura normal de la epidermis aunque sin la presencia de anejos epidérmicos. Pudimos diferenciar el estrato basal y los estratos suprabasales, como el estrato espinoso y córneo, indicando la diferenciación terminal de los queratinocitos (Llames et al., 2004). Con la tinción del tricrómico de Masson observamos que la matriz de fibrina aún no había sido substituida del todo por una matriz de colágeno constituida por las fibras de colágeno. Estas fibras de colágeno sintetizadas por los fibroblastos de la dermis, eran todavía relativamente delgadas y se encontraban orientadas en paralelo a la superficie de la piel indicando la incorrecta maduración de la herida (Mehanna et al., 2015; Berthod et al., 2001).

Por tanto, con la matriz de fibrina se obtiene una excelente adhesión al lecho de la herida y un soporte para la proliferación de los queratinocitos, además de solucionar el problema de la vascularización (Lohmeyer et al., 2011) viendo pequeños vasos sanguíneos en las tinciones histológicas a los 21 días del trasplante. Hojo et al., (2003) describieron la emergencia de células endoteliales vasculares en el trasplante después de 3 días, además la infiltración de células inflamatorias fueron bajas cuando lo compararon con la matriz de colágeno. Aunque se ha visto que tanto el soporte de colágeno como el de fibrina proporcionan similares ambientes en los cuales los queratinocitos y fibroblastos pueden proliferar *in vitro*, la concentración de VEGF en el medio de cultivo de la matriz de fibrina es significativamente mayor que en el medio de cultivo del soporte de colágeno (Whelan et al., 2014). Este incremento de VEGF no se debe al mayor número de células, sino a los productos de degradación de la fibrina,

componentes clave del coágulo, que intrínsecamente estimulan la actividad angiogénica induciendo la secreción de este factor por las células (Whelan et al., 2014). Esto es importante ya que la angiogénesis proporciona factores tróficos e incluso ayuda a la regeneración del sistema nervioso de la piel (Hojo et al., 2003).

No pudimos observar fibras elásticas, encargadas de dotar a la piel de flexibilidad. Pouliot et al., (2002) sí que las observaron a los 21 días mediante inmunohistoquímica detectando la expresión de la elastina en su equivalente de piel, que consistió en una matriz de colágeno sintetizado a partir de los propios fibroblastos durante 35 días sobre la que sembraron los queratinocitos. Esto podría ser debido a que con las técnicas de inmunohistoquímica la sensibilidad es mayor que con la tinción histoquímica (hematoxilina de Verhoeff) usada en nuestro caso. Sin embargo, cuando se trasplantan solamente láminas de epitelio tampoco se observan estas fibras elásticas a los 21 días ya que la expresión de elastina puede llevar hasta 4-5 años (Jones et al., 2002).

Un resultado interesante fue que detectamos la presencia de melanocitos maduros a los 21 días, pudiendo ver la presencia de melanina en todos los estratos de la epidermis. Estos melanocitos son probablemente de origen humano ya que se detectaron utilizando anticuerpos que reconocen de forma específica a las células humanas y no a las de ratón. Los melanocitos humanos se encuentran principalmente en el estrato basal de la epidermis y en los folículos pilosos. Sin embargo, en la piel de los ratones, los melanocitos residen principalmente en los folículos pilosos, no estando presentes típicamente en la epidermis (Zabierowski et al., 2011). En estos animales, la mayoría de los melanocitos desaparecen de la epidermis durante la vida postnatal, mientras en la piel de los humanos, permanecen en la epidermis a lo largo de toda la vida (Li et al., 2010). Existen tres posibles hipótesis para explicar la presencia de los melanocitos humanos en el ratón injertado. La primera es que ya estaban presentes en el equivalente de piel antes de ser injertado en el ratón; la segunda es que una vez realizado el injerto algunas células madre indiferenciadas humana se diferenciaron a melanocitos (Graham, 2009); y la tercera hipótesis es que proceden del ratón. La primera y la tercera las descartamos ya que en nuestros equivalentes de piel no detectamos melanocitos maduros y los ratones son albinos es decir, no tienen melanocitos que sintetizan melanina al poseer la enzima tirosinasa mutada. Por tanto, nos decantamos por la segunda. Varias investigaciones han demostrado la existencia de células precursoras derivadas de la piel (SKP) que son células madre multipotentes de la cresta neural localizadas en la dermis que se pueden diferenciar a células de Schwann y neuronas (Kumar et al., 2016), pero también a melanocitos, identificándolos en la epidermis a lo largo de la membrana basal en la misma localización que los melanocitos en la piel humana (Cichorek et al., 2014). Además, las células de Schwann asociadas a terminaciones nerviosas son una fuente de melanocitos (Adameyko et al., 2009) que tienen la habilidad de desdiferenciarse a un estado precursor y luego adquirir características melanocíticas o transdiferenciarse en

melanocitos (Van Raamsdonk y Deo, 2013; Graham, 2009). También existen células madre procedentes de la dermis similares a las SKP, que expresan marcadores de células madre de la cresta neural y de CME y son multipotentes pudiéndose diferenciar a melanocitos. Usando un modelo de equivalente de piel, las células madre dérmicas se diferenciaron en melanocitos maduros dentro de la dermis. Estos melanocitos migraron a la lámina basal de la epidermis en donde maduraron. Sin embargo, estas células madre dérmicas difieren de las SKP en el marcador de la cresta neural NGFRp75, que se expresa altamente en las células madre dérmicas pero levemente en las SKP (Toma et al., 2005). Todavía no está claro si las células madre dérmicas se diferencian primero a melanocitos y luego migran a la epidermis o si migran primero y luego completan su diferenciación a melanocitos aunque existen datos que sugieren que la diferenciación se completa en la epidermis al entrar en contacto físico con los queratinocitos (Li et al., 2010).

Un injerto permanente depende de la formación de una completa membrana basal. Nuestros resultados confirmaron la formación de ésta a los 21 días. Esta estructura proporciona una adhesión física de la epidermis al lecho de la herida y mantiene la integridad estructural y propiedades mecánicas de la piel regenerada (Mazlyzam et al., 2007). Estudios ultraestructurales con TEM confirman nuestros resultados revelando existencia de interacciones entre los queratinocitos de la epidermis y los fibroblastos de la dermis a los 21 días, siendo la membrana basal continua y bien estructurada formada por hemidesmosomas, lámina lucida, lámina densa y fibrillas de anclaje (Peña et al., 2010; Pouliot et al., 2002). Estudios más detallados realizados por Germain et al., (1995) descubrieron que los primeros componentes en aparecer son la laminina y el colágeno tipo VII a los dos días después del injerto. La presencia de laminina en la fase temprana post-injerto es diferente a los resultados obtenidos en otros modelos de curación de las heridas. Durante la reepitelización de las heridas debido a la migración de los queratinocitos residuales, la laminina y el colágeno tipo IV y VII no se detectaron bajo los queratinocitos hasta que la lámina basal se completó (Germain et al., 1995). En esos modelos, la migración de los queratinocitos sobre la matriz provisional de la herida es esencial para el proceso de reepitelización y la completa membrana basal podría interferir con la migración. Sin embargo, en el modelo de Germain et al., (1995), los queratinocitos fueron depositados en toda la herida. Esto supera la necesidad de que los queratinocitos migren y conduce fácilmente a la formación de una membrana basal definitiva. Una completa membrana basal con una lámina densa bien organizada y fibrillas de anclaje fue visualizada como muy temprano a los 21 días post-injerto. Sin embargo, otros investigadores (Aihara, 1989) describieron que es necesario 6 semanas para obtener la membrana basal continua y que esto se puede atribuir al uso de dispasa para despegar la lámina de epitelio.

El análisis del injerto a los 4 meses del trasplante, demostró que la epidermis era más delgada que a los 21 días, adquiriendo el fenotipo de la piel del ratón con dos

estratos, uno basal y otro suprabasal (Groeber et al., 2012). En el trabajo de Llamas et al., (2004) que también realizaron estudios histológicos de un equivalente de piel basado en una matriz de fibrina a los 4 meses, mostraron diferencias en el grosor, siendo mayor pudiendo deberse a que las heridas y los injertos fueron de 3x3 cm² en lugar de 1x1 cm² y no pasó el tiempo suficiente para lograr integrarse totalmente. En otros trabajos con matrices de fibrina se confirmaron nuestros resultados (Pellegrini et al., 1999). En otros equivalentes como los sintetizados con colágeno, los análisis histológicos revelaron que la epidermis recién generada era más gruesa después de 4 días del injerto pero similar en grosor a la piel del ratón tras 21 días (Pouliot et al., 2002).

La MEC a los 4 meses contenía gran cantidad de fibras de colágeno y la formación de pequeños vasos sanguíneos. Las fibras de colágeno mostraron una distribución en dos capas con fibras finas en la región subepidérmica y más gruesas en la dermis profunda simulando la piel normal. Estos hallazgos podrían ser atribuidos al incremento del número de macrófagos. Tales macrófagos se cree que controlan la síntesis de colágeno mediante los factores de crecimiento que secretan. Además son los responsables del mejor remodelado de la dermis a través de la reabsorción de las fibrillas de colágeno delgadas depositadas al principio (tipo III) para reemplazarlas más tarde por fibrillas más gruesas (tipo I) alineadas con las líneas de tensión, indicando la maduración de la herida (Mehanna et al., 2015).

Sin embargo, al igual que a los 21 días no pudimos observar fibras elásticas más gruesas con la tinción histoquímica, pero si las observamos con MEB al igual que otros investigadores (Pellegrini et al., 1999) con un modelo similar las detectaron a nivel ultraestructural mediante TEM, en donde la persistencia de la alodermis fue demostrada por el hallazgo de estas fibras elásticas residuales a los 4 y 8 meses, pero que casi no se pudieron detectar a los 12 meses después del injerto en el ratón sugiriendo la completa remodelación de la dermis donante. Por otra parte, a diferencia que en el injerto estudiado a los 21 días, a los 4 meses vimos que la membrana basal se integró completamente en el ratón, siendo sintetizada posiblemente por los queratinocitos y fibroblastos murinos, demostrado por ausencia de expresión de la laminina humana.

La piel seguía teniendo melanocitos y la expresión del antígeno S100 identificó incluso fibras nerviosas en la unión dermis-hipodermis. Como anteriormente comentamos, la dermis de la piel contiene precursores de la cresta neural que se diferencian en tipos celulares de la cresta neural *in vitro* cuando se suplementan con el apropiado medio, incluyendo neuronas periféricas y células de Schwann, cambiando su morfología hacia células bipolares, S100 positivas que coexpresan GFAP y p75NTR (fenotipo similar de células de Schwann) (Walsh et al., 2010). Pellegrini et al., (1999) usando TEM también detectaron melanocitos maduros con procesos dendríticos bien desarrollados entre los queratinocitos basales a los 4 meses del injerto de una lámina de epitelio sobre pegamento tisular comercial de fibrina. La presencia de numerosos

melanosomas maduros dentro del estrato basal y, aunque menos extendidos, en la primera capa celular del estrato suprabasal indican la reconstitución de la unidad epidérmica de melanina. Sin embargo, no han demostrado el origen de éstos.

Para estudiar en detalle la superficie de los equivalentes de piel trasplantados tras 4 meses, usamos MEB confirmando nuestros anteriores resultados al observar la superficie de la epidermis formada por células de forma poligonal con algunos pelos, anejos que no observamos a los 21 días, al menos con los estudios histológicos, y los fibroblastos sintetizando fibras de colágeno y elásticas (que con la tinción histoquímica no detectamos) de la MEC al igual que en la piel humana y del ratón. También observamos la presencia de células sanguíneas como ya nos indicaba la tinción del tricrómico de Masson que los equivalentes contenían vasos sanguíneos indicando que el injerto estaba vascularizado. Estos resultados son similares a los del trabajo de Mazlyzam et al., (2007).

En resumen, dado las necesidades médicas de una cobertura permanente para quemados, desarrollamos un equivalente de piel basado en una matriz de fibrina obtenida del plasma humano. Nuestro proceso de cultivo secundario sin necesidad de células alimentadoras, ni de toxina colérica y con cultivo sumergido, permitió la producción de un equivalente de piel que una vez trasplantado, dio como resultado una piel bien regenerada con una apariencia macroscópica saludable, y que microscópicamente presentaba las características normales de la piel, con la aparición de melanocitos en la epidermis además de presentar vasos sanguíneos, folículos pilosos y nervios en la dermis, mejorando así los equivalentes de piel actuales.

2.2. Equivalente de piel basado en la utilización de la Membrana Amniótica como soporte

Aunque son muchos los biomateriales que se han testado para la regeneración de la piel, incluida la fibrina obtenida a partir del plasma analizado anteriormente como soporte para construir una matriz 3D que contenga a los fibroblastos, todavía es necesario mejorar la integración del biomaterial con el lecho de la herida adyacente (Emans et al., 2010). Por ello, y en la búsqueda de nuevos soportes, algunos grupos han enfocado su investigación en la utilización de la MA como posible soporte para la Ingeniería Tisular aplicada a piel (Niknejad et al., 2008; Wilshaw et al., 2006).

La fácil obtención y disponibilidad de la MA, el bajo coste de la preparación y que puede ser esterilizada y preservada a bajo costo durante largos períodos de tiempo sin cambios arquitectónicos obvios han sido decisivos a la hora de decidimos a investigarla como un posible soporte para el cultivo de fibroblastos y queratinocitos.

Entre las propiedades de la MA más importantes para la Ingeniería Tisular (Niknejad et al., 2008; Kesting et al., 2008) se incluyen la protección de las heridas (Taghiabadi et al., 2015b); alivio del dolor; reducción de la inflamación, fibrosis y de la cicatrización; propiedades antimicrobianas y antivirales; baja inmunogenicidad (Yang

et al., 2009); y buenas propiedades mecánicas (Niknejad et al., 2008). Además de la buena adherencia a las heridas, manteniendo un entorno húmedo para promover la curación, la MA puede producir muchos factores de crecimiento y proporcionar un nuevo sustrato adecuado para la reepitelización (Wilshaw et al., 2006).

Existe cierto debate sobre si es mejor que para utilizar la MA en Ingeniería Tisular como soporte, la MA se mantenga intacta o se descelularice. Algunos investigadores han descrito los potenciales beneficios del uso de la MA intacta cuando se usa como soporte. Por ejemplo, se ha visto que las CEA pueden producir neurotransmisores, neuropéptidos y factores neurotróficos (Touhami et al., 2002) o factores de crecimiento esenciales para las células madre epidérmicas (Barthel y Aberdam, 2005). En contraste, otros grupos han demostrado que la MA desepitelizada puede promover mejor la adhesión celular, proliferación celular y diferenciación, así como un crecimiento celular más uniforme comparado con la MA intacta (Koizumi et al., 2006; Koizumi et al., 2000). La eliminación completa del epitelio antes de sembrar los queratinocitos incrementa su porcentaje de confluencia y facilita la migración de éstos (Yang et al., 2009) y de otras células, tales como células limbales (Shortt et al., 2009; Hopkinson et al., 2008) y neuronas (Davis et al., 1987). Sin embargo, queda por comprobar que sucede con los fibroblastos.

Por tanto, en nuestro modelo de utilización de la MA como soporte, el primer paso para su preparación fue su completa descelularización (no solamente desepitelización) y así poder determinar por cuál de los lados de la MA, tanto intacta como descelularizada, los queratinocitos y fibroblastos crecerían mejor para crear el equivalente de piel.

Se han usado varios tratamientos de descelularización de la MA con diferentes grados de éxito (Eves et al., 2005), pues cada método muestra diferentes efectos tanto en la eliminación de las células como en la estructura y propiedades biológicas. Aunque la completa eliminación de las células de la MA parece que es necesario para usar como un soporte, es también vital que la MEC permanezca intacta para la repoblación celular porque contiene componentes esenciales para la adhesión, proliferación celular y remodelación del tejido (Liang et al., 2009). La MA descelularizada mediante un tratamiento adecuado, no solamente mantiene la estructura de la membrana basal y de la MEC sino que también retiene varios factores de crecimiento. La laminina de la membrana basal participa en la construcción de los hemidesmosomas, encargados de la adhesión y anclaje de las células (Ji et al., 2011). Por último, el proceso de descelularización debe eliminar las principales fuentes de respuesta inmunogénica incluyendo los componentes celulares, antígenos de membrana, y proteínas solubles, bloqueando así el inicio de la respuesta inmune (Wilshaw et al., 2006).

Los métodos comúnmente usados para la descelularización de la MA son la digestión enzimática con tripsina y dispasa (Lim et al., 2009), el tratamiento químico con detergentes como EDTA y desnaturalizantes de proteínas (Riau et al., 2010) o una

combinación enzimática-química como T/E, pudiendo estar seguidos todos ellos por un tratamiento mecánico (Riau et al., 2010; Hopkinson et al., 2008). Algunos de estos métodos son complejos para su uso práctico y otros fallan porque o no eliminan todas las células (siendo necesario el raspado mecánico) o no solamente eliminan las células sino que también destruyen los componentes de la MEC (Wilshaw et al., 2006), de la membrana basal (Eves et al., 2005) y eliminan varios factores de crecimiento (Hopkinson et al., 2008) siendo necesarios repetidos lavados para eliminar completamente los agentes reactivos y evitar así la toxicidad residual.

Por todo ello, en nuestro estudio, uno de los objetivos fue analizar cuál de los tratamientos descritos en la literatura era el más eficaz para eliminar no solamente las CEA sino también las CMEA (Yang et al., 2009; Lim et al., 2009; Kim et al., 2009; Hopkinson et al., 2008; de Melo et al., 2007) de la MA sin dañar el resto de componentes. Tras el análisis de los resultados obtenidos pudimos establecer que la digestión con 1% de T/E a 37°C durante 30 min eliminó completamente no sólo las CEA sino también las CMEA. Este método además preservó intactos los componentes de la MEC y membrana basal como se demostró con las tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas que detectaron la presencia de laminina, fibras de colágeno, mucopolisacáridos y PG y excluyó además, la necesidad del raspado mecánico utilizado por otros grupos que dañarían todos estos componentes (Riau et al., 2010).

En los otros tratamientos que analizamos, el uso de 1% de T/E a 37°C durante 10 min, los de 0,25% de T/E o los de EDTA no eliminaron completamente el epitelio dejándolo intacto en algunas partes al igual que le sucedió a de Melo et al., (2007). En este caso sería necesario el uso de raspado mecánico para la completa eliminación de las CEA, y no se llegaría a eliminar a las CMEA. Se describió que usando el raspado mecánico se pueden llegar a eliminar el 90-100% de las CEA sin romper la membrana basal (Grueterich et al., 2002). Sin embargo, Hopkinson et al., (2008) demostraron que la utilización del raspado mecánico compromete la integridad de la membrana basal, dejando expuesta a la matriz de colágeno (Koizumi et al., 2000).

Aunque en la bibliografía no existe ningún trabajo que haya utilizado la solución comercial acutasa para descelularizar la MA, nosotros quisimos evaluarla para este fin, ya que sirve para disgregar las células de los frascos de cultivo. Con este tratamiento solamente conseguimos eliminar las CEA, pero no las CMEA, a pesar de que los enzimas colagenolíticos que contiene degradarían el colágeno, liberando estas células. Tal vez, nuestros resultados hayan sido por las bajas concentraciones de estas enzimas en la solución comercial que tiene como fin ser usada para mejorar la viabilidad de las células con respecto a la T/E.

Al contrario que los anteriores, el uso de la dispasa eliminó completamente las CEA, pero también la membrana basal resultó dañada, especialmente la lámina densa como demostró Hopkinson et al., (2008) mediante TEM e inmunohistoquímicamente. Además, observamos que la dispasa digirió específicamente la MEC subyacente, con el fin de liberar las CMEA (Hopkinson et al., 2008). En algunos casos además utilizaron el

raspado mecánico (Lim et al., 2009) a diferencia de nosotros que no nos hizo falta al aumentar el tiempo de incubación lo necesario para eliminar las células sin dañar la MEC. Sin embargo, estudios con TEM sí que confirmaron la rotura de la ultraestructura de la MA, empezando con la alteración de la membrana basal y continuando con la pérdida de colágeno estromal y la composición molecular (Hopkinson et al., 2008), afectando al crecimiento celular de los explantes cultivados (Lim et al., 2009).

A pesar de esto, existen grupos que han descrito el éxito clínico usando la dispa. Li et al., (2006) y Yam et al., (2002) al investigar el crecimiento de los explantes de células epiteliales limbales sobre la MA descelularizada, mostraron que la membrana basal se desmonta antes de secretar los componentes de la nueva membrana basal. Esto sugiere que la membrana basal intacta no es de crítica importancia en la expansión de las células epiteliales sobre la MA, explicando el éxito en la reconstrucción de la superficie ocular incluso con la completa eliminación de la membrana basal.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante los estudios histológicos como una medida indirecta de la presencia de células, también medimos el contenido del ADN residual después de realizar los diferentes tratamientos. Nuestros resultados confirmaron que el tratamiento con 1% de T/E a 37°C durante 30 min fue el más efectivo porque es el que presentaba el contenido más bajo de ADN residual. Este análisis también fue utilizado por Ji et al., (2011) antes y después de la descelularización mediante tres ciclos de congelación y descongelación en N₂L y posterior tratamiento con DNAsa, y por Wilshaw et al., (2006) que también midieron el contenido de ADN antes y después del uso de SDS.

Una vez determinado el tratamiento más efectivo de descelularización de la MA y con el objetivo final de evaluar su uso potencial como soporte para obtener un equivalente de piel, el siguiente paso fue determinar el lado de dicha MA (intacta o descelularizada) por el cual crecerían mejor los queratinocitos y fibroblastos. Este análisis se basó en estudios previos en nuestro laboratorio en los cuales demostramos que los condrocitos (Díaz-Prado et al., 2009b) y las células madre limbales y corneales (Rendal-Vázquez et al., 2012) pueden proliferar rápidamente sobre la MA humana. En el caso de los condrocitos el lado coriónico de la MA fue el más apropiado, para que no se desdiferencien hacia fibroblastos en los cultivos *in vitro* durante un tiempo prolongado necesario para obtener la cantidad suficiente de condrocitos para el implante (Díaz-Prado et al., 2009b), mientras que en el caso de las células madre epiteliales limbales humanas, el lado epitelial de la MA intacta fue el más apropiado para mantener su capacidad de células madre (Rendal-Vázquez et al., 2012).

Por ello, se llevaron a cabo experimentos para discriminar cuál de los lados epitelial o estromal de la MA tanto intacta como descelularizada sería el más apropiado para la adhesión y proliferación de los queratinocitos y de los fibroblastos. Tanto los queratinocitos como los fibroblastos, cuando los sembramos por el lado epitelial de la MA intacta, formaron una monocapa que se desprendió del epitelio de la

MA, sugiriendo una posible competición entre los queratinocitos o fibroblastos con las CEA. Cuando se descelularizó la MA, los queratinocitos se adhirieron por ambos lados de la MA tanto epitelial como estromal, sin embargo, se dispusieron de forma más ordenada por el lado epitelial de la MA descelularizada. No obstante, observamos que los fibroblastos crecieron mejor sobre el lado estromal de la MA tanto intacta como descelularizada como veremos más adelante, llegando incluso a penetrar y propagarse en el estroma de la MA.

Usando inmunohistoquímica, demostramos que los queratinocitos cultivados sobre ambos lados de la MA descelularizada o intacta expresaron el antígeno CK pero no vimentina y que los fibroblastos sembrados en el lado estromal expresaron vimentina. Esto confirmó que los queratinocitos no sufrieron una transición epitelial-mesenquimal y no se diferenciaron en fibroblastos manteniendo su fenotipo.

Una vez determinamos el tratamiento más efectivo para la descelularización de la MA y el lado por el que mejor crecen los queratinocitos y fibroblastos, nuestro siguiente objetivo fue evaluar su uso como soporte para sintetizar un equivalente de piel *in vitro*, sembrando los fibroblastos por el lado estromal y los queratinocitos sobre el epitelial de la MA descelularizada. Nuestro equivalente de piel *in vitro* fue cultivado usando el método sumergido y después de solamente 7 días lo tuvimos a punto. Este método reduce considerablemente el tiempo de cultivo de otros investigadores que usaron el método interfase aire-líquido (Yang et al., 2009) que necesitan más días para conseguir la diferenciación de la epidermis. Los estudios de otros grupos en el modelo animal mostraron que en los cultivos en interfase aire-líquido se produce la degeneración del epitelio una vez injertado, algo que no sucede usando el método sumergido (Peña et al., 2010), en donde una vez injertado producen una estructura en la que los queratinocitos proliferan dando una apariencia estratificada.

Los resultados de las tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas mostraron que la estructura de los equivalentes de piel se organizó en varias capas de queratinocitos y una matriz poblada con fibroblastos. La expresión de CK y K14 y la ausencia de K10 indicaron la formación de una lámina en la epidermis con queratinocitos que retuvieron la capacidad proliferativa sin sufrir una diferenciación terminal. Algunos queratinocitos fueron positivos para p63 indicando que se trataban de células madre epidérmicas (Kim et al., 2004). La expresión de p63 se incrementa durante la curación de las heridas tanto en el estrato basal como suprabasal de la piel normal. La localización de las células p63 positivas se asocia con los epitelios proliferativos, como el estrato basal de la epidermis así como la envuelta exterior de la raíz de los folículos pilosos, estando ausente en las células dérmicas (Parsa et al., 1999). Es posible que p63 juegue un papel en el mantenimiento del potencial proliferativo de los queratinocitos y prevenga la diferenciación terminal (Coolen et al., 2007). Todas las células Ki67 positivas contienen p63, pero sólo algunas p63 son ki67 positivas (Parsa et al., 1999). Ki67 es un antígeno nuclear (concentrado en el nucléolo) asociado a la proliferación celular, por tanto, marca a los queratinocitos que se están

multiplicando en la epidermis humana (Parsa et al., 1999). Sin embargo, en nuestro equivalente de piel no observamos expresión de este marcador de proliferación celular. Peña et al., (2010) también obtuvieron un resultado negativo en su equivalente de mucosa oral basado en plasma, ofreciendo la explicación de que cuando el epitelio llega a la confluencia, la actividad proliferativa se reduce. Otra explicación es que al final de la fase G1 del ciclo celular y el comienzo de la fase S, la cantidad del antígeno Ki67 es mínima, por lo que daría un resultado negativo para Ki67, pero están en proliferación (Bruno y Darzynkiewics, 1992).

La presencia de las células que expresaron vimentina reveló la localización de los fibroblastos solamente en el lado estromal de la MA, demostrando además que los queratinocitos no se han desdiferenciado hacia estas células.

La rápida proliferación de los queratinocitos y de los fibroblastos sobre el soporte de MA, seguramente se deba a la presencia de factores de crecimiento que se retienen aunque en baja concentración en la MA una vez descelularizada como EGF, TGF, KGF, KGFR, HGF, HGFR, bFGF y PDGF, que facilitan la reepitelización, la reducción de la cicatriz y la inflamación (Choi et al., 2009) y también VEGF, angiogenina, y PDGF que favorece la angiogénesis (Uberti et al., 2010). No existe ningún estudio que estudie la proliferación de estas células, solamente describen la migración de los queratinocitos y fibroblastos con una solución de citoquinas celulares derivadas de la MA comercial, obteniendo buenos resultados (Uberti et al., 2010).

En resumen, conseguimos sintetizar un equivalente de piel usando la MA descelularizada con 1% de T/E a 37°C durante 30 min como soporte, sembrando queratinocitos sobre la membrana basal del lado epitelial y fibroblastos sobre el lado estromal simulando una epidermis y una dermis respectivamente, con una estructura similar a la piel humana que podría usarse en la práctica clínica.

B. INGENIERIA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO

La piel se encuentra ricamente innervada tanto por el sistema autónomo (simpáticos y parasimpáticos) como de fibras sensitivas no mielinizadas que transportan la información nociceptiva y termoceptiva (Roosterman et al., 2006; Rice et al., 1998) que se pierden cuando se daña (Ulmann et al., 2007). Por tanto, no sólo es importante la regeneración de las láminas estructurales que componen la piel sino también en la medida de lo posible, del sistema nervioso que la inerva. Por ello, en esta tesis nos propusimos también analizar posibles técnicas de Ingeniería Tisular para su aplicación a este sistema.

Entre las diversas técnicas analizadas para su aplicación a la regeneración del sistema nervioso, una de las más frecuentes es la Terapia Celular y la Ingeniería Tisular usando células madre para reducir la progresión y mejorar la reparación de las lesiones (Castillo-Melendez et al., 2013). Esta terapia puede ofrecer tratamientos para una variedad de enfermedades intratables (Marcus et al., 2008). Además, la liberación secuencial y controlada de factores de crecimiento por estas células podrían mejorar los efectos estimulantes en la regeneración (de la Puente et al., 2011).

Actualmente existen diversos tipos de células madre usadas tanto en Terapia Celular como en Ingeniería Tisular del sistema nervioso como las células madre adultas (Mehanna et al., 2015), células madre neurales (Mitchell et al., 2003) y las células de Schwann (Walsh et al., 2010; Nishiura et al., 2004). Otra fuente son las CMM derivadas de la médula ósea (Mehanna et al., 2015), las CME y las iPSC (Kim et al., 2014). Todas ellas presentan algún inconveniente, por lo tanto, es necesario buscar nuevas fuentes de células.

Una posible alternativa a la utilización de todas estas poblaciones celulares, podrían ser las dos principales poblaciones de células madre/progenitoras que pueden ser obtenidas desde la MA humana: las CEA y las CMEA (Díaz-Prado et al., 2010a; Miki et al., 2010) o bien las células de la gelatina de Wharton del CU (Zhang et al., 2012a). Al igual que lo ya mencionado en el caso de la MA, el CU se tira normalmente después del parto y el procedimiento de recogida no es invasivo ni causa dolor (Liu et al., 2012; Niknejad et al., 2010).

Por lo tanto, quisimos analizar la capacidad de utilizar la MA y el CU como fuentes de células madre capaces de diferenciarse hacia células similares a células nerviosas *in vitro* para cultivarlas posteriormente sobre un soporte de MA. Estas células servirían para integrarlas en los equivalentes de piel para proporcionarles innervación y entre otras cosas favorecer la angiogénesis y melanogénesis.

1. Características y capacidad de diferenciación de los cultivos de las CMEA, CEA y CMMGW

Los protocolos de aislamiento de las células a utilizar deben ser reproducibles y retener tanto la morfología como las características fenotípicas a través de los pases (La Rocca et al., 2009). Nosotros aislamos las células desde la MA usando el método descrito por Soncini et al., (2007) con pequeñas variaciones en la composición del medio de cultivo descrito. La primera población obtenida fueron las CMEA con una morfología similar a los fibroblastos y una segunda población de CEA con morfología poliédrica. El medio usado para la expansión usualmente es medio basal DMEM, suplementado con SBF, antibióticos y antimicóticos (Lindenmair et al., 2012). Sin embargo, nosotros en un intento de mejorar el medio de cultivo de las CEA, hemos añadido EGF, ya que existen estudios en los cuales la presencia de este factor en el medio hace que las CEA proliferen mejor y formen una lámina confluyente de células epiteliales. Sin EGF, la proliferación cesa y las células forman células gigantes multinucleadas (Miki et al., 2005).

Las CEA crecieron en grupos unidas entre sí por uniones intercelulares en forma de empalizada, mientras que las CMEA crecieron de forma individual poseyendo forma irregular y protusiones celulares prominentes siendo aproximadamente tres veces más grandes que la CEA. Además, ambos tipos celulares mostraron una buena proliferación en cultivo. Las CMEA obtenidas expresaron vimentina, demostrando su origen mesodérmico (Lindenmair et al., 2012), mientras la segunda población celular obtenida, las CEA, expresaron CK debido a su origen epitelial (Chang et al., 2010; Ilancheran et al., 2007) pero no vimentina lo que indicaba la ausencia de contaminación con otros tipos celulares como las CMEA (Chang et al., 2010). Todos estos resultados fueron similares a los publicados por el grupo Bilic et al., (2008) tanto por el elevado grado de pureza en la extracción de las CEA que expresaron CK19 y de las CMEA que expresaron vimentina, como por el resto de las características de los cultivos, aunque en su caso el orden de obtención de las poblaciones celulares fue a la inversa, primero las CEA y después las CMEA.

Para aislar las CMMGW de forma segura, práctica y eficiente empleamos el método del explante al igual que Liu et al., (2012) e Ishige et al., (2009). En el trabajo de Salehinejad et al., (2012), comprobaron que la proliferación celular y actividad cuando se comparaban diferentes métodos de aislamiento fue mayor cuando se realizaba el aislamiento de las CMMGW mediante el método del explante, que con los diferentes tratamientos enzimáticos. Esto podría deberse a que con el método del explante, se obtienen células con una morfología homogénea, lo que podría resultar en una elevada proliferación celular (Mennan et al., 2016; Cardoso et al., 2012). Además, con los tratamientos de aislamiento enzimáticos, debido al daño de la MEC y que pueden desintegrar las membranas celulares, disminuye la viabilidad (Oyama et al., 1990) y la adhesión celular (Han et al., 2011) teniendo de este modo un impacto negativo en la capacidad de proliferación (Salehinejad et al., 2012). Dependiendo del

método de aislamiento utilizado, del cultivo y de los factores secretados por células accesorias en los pases iniciales (Chamberlain et al., 2007), la expresión de marcadores de superficie puede variar (Bobis et al., 2006). Los protocolos de aislamiento podrían provocar cambios epigenéticos y genéticos en las células, que podrían afectar a la plasticidad y utilidades terapéuticas (Phinney y Prockop, 2007). Se han observado marcadores morfológicos y diferencias en el tamaño celular en los cultivos primarios derivados del CU, en donde la subpoblación celular de tamaño más pequeño exhibe una elevada capacidad proliferativa comparada con la subpoblación de tamaño más grande (Majore et al., 2009).

Usando esta técnica, para evitar la contaminación con células endoteliales o hematopoyéticas como hicieron Castillo-Melendez, (2007), lavamos el CU y eliminamos las arterias y la vena antes de cultivar el explante. Obtuvimos aproximadamente 50.000 células/cm con morfología de fibroblasto y expresión de vimentina, lo mismo que Fu et al., (2006b) que obtuvieron 1×10^6 CMMGW en 20 cm. Después de 6 días, al igual que en los trabajos de Zhang et al., (2012a) las células se desplazaron desde los bordes del explante exhibiendo morfología poligonal y aplanada pero a las dos semanas su morfología cambió hacia una forma de huso dispuestas en paralelo alcanzando la confluencia presentando similares propiedades en cuanto a la morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación que las CMM (Salehinejad et al., 2012).

Tanto en Terapia Celular como en Ingeniería Tisular se requiere un número mínimo de células de varios cientos de millones. Para conseguir este número se requieren subcultivos durante varios meses. Este largo periodo de cultivo es tedioso y costoso. Bilic et al., (2008) proponen usar trasplantes de CEA de pase 1 y en el caso de las CMEA hasta el pase 3. Los subcultivos de las CEA puede llevar a la transición morfológica epitelial-mesenquimal, que se puede observar mediante la formación de células gigantes multinucleadas (Bilic et al., 2008). Nosotros utilizamos pase 1 o 2 de todas las células para asegurarnos que mantuvieran su fenotipo inicial. Aunque, cuando añadimos EGF al medio de cultivo, el cambio morfológico de las CEA fue más lento en pases superiores. En cuanto a las CMMGW, no sufrieron cambios en la morfología durante los 5 primeros pases (Garzón et al., 2012).

Una vez aisladas y cultivadas estas células, demostramos su pluripotencialidad diferenciando las CMEA, CEA y CMMGW al linaje mesodérmico a través de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica y al linaje neuro-ectodérmico a través de la diferenciación neurogénica.

Ya existen trabajos que demuestran la pluripotencialidad de estas células mediante análisis inmunohistoquímicos y genéticos en los cuales las CMEA, CEA y CMMGW se han diferenciado a los tres linajes germinales *in vitro*: endodérmico (hepatocitos, células pancreáticas, etc), mesodérmico (cardiomiocitos, miocitos, osteoblastos, adipocitos) y ectodérmico (células neurales y astrocíticas) (Insausti et al., 2010; Tamagawa et al., 2008; Alviano et al., 2007; Soncini et al., 2007; Tamagawa,

2007; Miki et al., 2005; In't Anker et al., 2004; Sakuragawa et al., 2004; Mitchell et al., 2003).

En nuestro trabajo, utilizamos estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos *in vitro* para confirmar la capacidad de diferenciación de estas células y comparamos los resultados de los tres tipos celulares. Con una estimulación adecuada, durante 21 días, las poblaciones celulares derivadas de la MA y de la gelatina de Wharton del CU se diferenciaron hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Al comparar los tres tipos celulares, observamos diferencias en este potencial de diferenciación celular.

Con respecto a la adipogénesis, la evaluamos con la tinción Oil Red O, mostrando que las células cultivadas en este medio aumentaron de tres a cuatro veces su tamaño, con numerosas células multinucleadas con gotas de lípidos dispersas por todo el citoplasma (Ilancheran et al., 2007). Las CMEA mostraron mayor capacidad de diferenciación adipogénica que las CMMGW y que las CEA. Sin embargo, Can y Karahuseyinoglu, (2007) mostraron que las células CMMGW mostraron el fenotipo de los adipocitos a los 40 días. Nuestros resultados fueron también similares a los de Struys et al., (2011), resultados en que solamente menos de un tercio de las CMMGW tenían potencial adipogénico (Choi et al., 2013; Salehinejad et al., 2012).

Respecto a la diferenciación osteogénica, en comparación con los controles, bajo condiciones de inducción las células crecieron de 2 a 3 veces, y muchas fueron binucleadas con depósitos de hueso mineralizado al igual que le sucedió a Ilancheran et al., (2007). Encontramos que las CMEA poseen una mayor capacidad de diferenciación osteogénica que las CEA al igual que Díaz-Prado et al., (2010a) y que las CMMGW. A pesar de ello, las tres poblaciones fueron capaces de diferenciarse hacia células con características de osteoblasto. En cambio, los estudios de diferenciación de Bilic et al., 2008 discrepan con nuestros resultados. Sus resultados sugieren una limitada plasticidad de las células amnióticas aisladas, al menos bajo condiciones de inducción *in vitro*. Las CEA parecen poseer mayor diferenciación al linaje mesodérmico que las CMEA (Bilic et al., 2008), aunque solamente lo mostraron en la diferenciación osteogénica.

En la diferenciación condrogénica, las secciones de las micromasas derivadas de las CMEA, CEA y CMMGW exhibieron una fuerte tinción para el colágeno tipo II de la MEC al igual que Liu et al., (2012) que lo comprobaron en las CMMGW. En general, no hemos observado grandes diferencias en la capacidad condrogénica entre los distintos tipos celulares. Observando las tinciones histoquímicas, lo único que podemos afirmar es que las micromasas formadas con las CEA se caracterizan por una mayor celularidad y menor síntesis de MEC. Esto puede deberse a que son células con una proporción núcleo-citoplasma menor que las CMEA y que las CMMGW, y de ahí que se sintetice menor cantidad de MEC.

Recientemente, salió se ha publicadoun trabajo en el campo de la Ingeniería Tisular aplicada al tejido cardiovascular (Pu et al., 2017) en el cual, de forma similar a nuestros objetivos, quisieron identificar que fuente de células es la mejor. En la

investigación hacen una comparación entre las células de la MA, sin separar las CEA de las CMEA y de las CMMGW del CU. Todas las células las obtuvieron mediante el método del explante, obteniendo en ambos casos células con morfología fibroblástica. Sus resultados describen que las CMMGW presentan mayor proliferación, depósito de colágeno y mayor viabilidad pero similar potencial de diferenciación que las células derivadas de la MA.

Aunque ya existían diferentes estudios que demostraban la capacidad de las CMEA, CEA y CMMGW de poder ser inducidas a diferenciarse en células nerviosas *in vitro* (Castillo-Melendez et al., 2013; Ma et al., 2005; Mitchell et al., 2003), y que ya habían sido usadas en la Ingeniería Tisular del SNP sin diferenciar para promover la recuperación después de la lesión medular aguda, no había ningún estudio comparativo entre estas tres poblaciones en cuando al potencial de diferenciación neurogénico se refiere, por lo que nos propusimos dicho objetivo.

Las CEA, CMEA y CMMGW antes de la inducción neural ya expresan muchos marcadores de células progenitoras neurales, neuronales y gliales (Wu et al., 2012; Ilancheran et al., 2007; Sakuragawa et al., 2004; Mitchell et al., 2003; Sakuragawa et al., 1996), pero cuando se cultivan con medio de inducción neural, las células aumentan la expresión de estos marcadores y asumen una morfología neuronal perdiendo la morfología epitelial y fibroblástica (Miki et al., 2005). Así pues, las CEA bajo ciertas condiciones se pueden diferenciar a células neurales maduras que sintetizan y liberen neurotransmisores, incluidos la acetilcolina, norepinefrina y dopamina (Miki et al., 2005). Además, tanto las CMEA como CMMGW humanas también se pueden diferenciar *in vitro* hacia células similares a células nerviosas (Tamagawa et al., 2008; Fu et al., 2006b; Ma et al., 2005; Mitchell et al., 2003) e incluso las CMMGW se pueden inducir hacia la diferenciación en células de Schwann funcionales y promover la regeneración de nervios periféricos (Xiao y Wang, 2015; Matsuse et al., 2010) y hacia células similares a neuronas dopaminérgicas y células que expresan acetil colina transferasa, sugiriendo que presentan un gran potencial en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (Li et al., 2013).

Como primer objetivo para analizar la diferenciación tanto de las CMEA, CEA y CMMGW al linaje neuro-ectodérmico, nos propusimos mejorar la composición del medio de diferenciación empleado en la inducción neural, añadiendo diferentes factores basándonos en la bibliografía. Para ello, lo preparamos añadiéndole al medio basal los siguientes factores adicionales: ácido retinoico, ya que juega un papel fundamental en el desarrollo del SNC, estimulando el crecimiento y migración de la cresta neural; bFGF que se expresa en el SNC y es necesario para desarrollo normal del córtex (la interacción entre estos dos factores es crucial para la diferenciación neural) (Niknejad et al., 2010); EGF porque las neuronas muestran una elevada supervivencia cuando se tratan con este factor (Uchida et al., 2000); insulina que inhibe la diferenciación al linaje mesodérmico y endodérmico, promoviendo la diferenciación neuro-ectodérmica en CME humanas (Chang et al., 2010); y finalmente, 2-

mercaptoetanol que induce a las células estromales de la médula ósea a diferenciarse hacia neuronas (Ma et al., 2005).

La diferenciación tanto de las CMEA, CEA y CMMGW al linaje neuroectodérmico fue evidente después del cultivo de las células en el medio de inducción neural anteriormente indicado, con cambios morfológicos significativos a los 4-5 días de cultivo adquiriendo la forma y fenotipo de las células nerviosas además de formar estructuras similares a redes neuronales. Después de la inducción neural durante 21 días las células mostraron una forma alargada y multipolar (Cho et al., 2012; Manochantr et al. 2010; Brohlin et al. 2009; Tamagawa et al., 2008). Las células inducidas a células nerviosas mostraron la expresión de marcadores neuronales como NF y NGFR, de células gliales tales como GFAP y S100, además de la vimentina, indicando que también existe en nuestra población células progenitoras neuronales y gliales. La cuantificación de la expresión de estos marcadores indicó que el mayor potencial de diferenciación neurogénica lo mostraron las CMMGW y las CEA con diferencias significativas con respecto a las CMEA, excepto para GFAP que no encontramos diferencias significativas entre los 3 grupos.

Otros investigadores también han observado que después del cultivo en sus medios de inducción, las CMEA (Manochantr et al., 2010; Brohlin et al., 2009; Tamagawa et al., 2008), CEA (Shinya et al., 2010) y CMMGW (Cho et al., 2012; Fu et al., 2006b; Mitchell et al., 2003) expresaron morfología similar con el desarrollo de extensiones típicas de las células nerviosas y expresaron marcadores de neuronas, células gliales como astrocitos y oligodendrocitos pero en menor porcentaje, pudiendo deberse al medio de inducción que han utilizado. Las CEA también expresan algunos neurotransmisores como acetilcolina (Sakuragawa et al., 1997; Sakuragawa et al., 1996), y catecolaminas o dopamina (Elwan et al., 2003) al igual que las CMEA (Chang et al., 2010) y CMMGW (Datta et al., 2011; Mitchell et al., 2003) que expresan tirosina hidroxilasa y dopamina después de la inducción, así como acetilcolina transferasa (Li et al., 2013).

2. La Membrana Amniótica como soporte para el cultivo de las células similares a células nerviosas

Como mencionamos anteriormente, previamente en nuestro laboratorio, usamos a la MA como soporte en Ingeniería Tisular para el cultivo de varios tipos celulares, incluyendo condrocitos (Díaz-Prado et al., 2009b), células madre limbales (Rendal-Vazquez et al., 2012), y piel (la presente tesis). Además de estas aplicaciones existen fuertes evidencias de que la MA posee también características estructurales que proporcionan las bases para su uso como soporte para la Ingeniería Tisular del sistema nervioso (Li et al., 2013). Varios grupos han demostrado que es posible cultivar neuronas directamente sobre la MA (Davis et al., 1987). Sin embargo, estas neuronas son difíciles de aislar y cultivar. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue valorar por

primera vez el potencial de la MA como soporte para las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas hacia células similares a células nerviosas.

Generalmente, para reparar lesiones del tejido nervioso se realiza un trasplante de células mediante la inyección de la suspensión celular. Sin embargo, la inyección directa de células disociadas es difícil de controlar por el tamaño del injerto, la localización y las funciones de las células, por lo tanto, no es suficiente para reemplazar los defectos congénitos (Toda et al., 2007). Curiosamente, los estudios *in vivo* en el que se inyectaron CEA en lesiones de cerebro de roedores o en lesiones de la médula espinal no mostraron evidencia concluyente de la diferenciación, pero si se vio que los factores inmunosupresores y/o neurotróficos producidos por estas CEA parecen ayudar a la reparación (Ilancheran et al., 2007). Usando la MA como soporte se puede impedir que las células se pierdan después de su inyección en modelos animales y controlar los problemas descritos, y potencialmente en humanos, proporcionando un soporte que se biodegrada a lo largo del tiempo (Li et al., 2013) y al usar células ya diferenciadas en células similares a células nerviosas se podría restaurar o regenerar el tejido.

Para la aplicación de la MA como soporte en Ingeniería Tisular del sistema nervioso, al igual que en el caso de su aplicación a la regeneración de la piel, tampoco hay un consenso con respecto a si las células derivadas de la MA deberían ser eliminadas para exponer completamente la membrana basal para la regeneración de los nervios. Mohammad et al., (2000) prepararon un conducto nervioso usando la MA sin epitelio (CEA) obteniendo como resultado el crecimiento de tejido nervioso, mostrando efectos de reparación similares al injerto de nervios. Otros investigadores, sin embargo, usaron la MA con CEA para preparar una cámara para regenerar nervios, en la cual el tejido nervioso procedente de ratas, con células de Schwann y los factores neurotróficos secretados, fueron sembradas dentro para fortalecer los efectos del soporte nervioso guiando la regeneración de los nervios (Henry et al., 2009; O'Neill et al., 2009). Por tanto, la MA con o sin epitelio puede ser usada como soporte para guiar en cierta medida el crecimiento de los nervios (Li et al., 2013).

La interacción del axón que se extiende con un microambiente permisivo puede aumentar la probabilidad de iniciación axonal, velocidad de alargamiento y grado de ramificación. Se acepta generalmente que la regeneración del SNC no ocurre fácilmente debido en parte al entorno de crecimiento no permisivo y la falta de factores de crecimiento adecuados, a diferencia de la regeneración que se produce con bastante facilidad en el SNP. Cuando una neurona del SNC se coloca en un entorno similar al SNP se puede regenerar (David y Aguayo, 1981). La laminina es el componente más abundante de la MEC periférica, se sobrerregula después de la lesión del nervio periférico (Wallquist et al., 2002) y probablemente desempeña un papel fisiológico en la regeneración axonal estimulando el crecimiento y mejorando la proliferación de neuritas cuando se usa como sustrato (Rankin et al 2008). Esto se vio en las investigaciones de Danielsen et al., (1988) en un modelo animal con ratas en

donde colocaron una tira de MA entre el septo axotomizado y el hipocampo denervado y tres meses después pudieron apreciar el crecimiento de fibras nerviosas solamente sobre el lado de la laminina de la MA. Por ello, para preparar el soporte de MA, la descelularizamos y dejamos la membrana basal libre de las CEA, dejando al descubierto la laminina, para observar cómo se comportaban las células diferenciadas a células nerviosas sobre este soporte, que es el que usamos en el equivalente de piel. Como dijimos anteriormente, al comparar diferentes tratamientos el que mejor nos funcionó fue el de 1% de T/E a 37°C durante 30 min. Este tratamiento eliminó completamente las CEA y CMEA sin dañar la MEC manteniendo los componentes esenciales para la adhesión celular, proliferación y remodelación del tejido (Liang et al., 2009). Estos componentes son el colágeno IV, heparán sulfato, PG, fibronectina y la laminina que se parecen a los componentes de la membrana basal de las células de Schwann e *in vitro* promueven la adhesión de las células nerviosas y estimulan la elongación axonal en neuronas del SNC y SNP (Li et al., 2013).

Una vez descelularizada la MA, sembramos las CMEA, CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas sobre la membrana basal de ésta. En nuestro equivalente de tejido nervioso, las células similares a células nerviosas mostraron una morfología similar a la de las células nerviosas con extensiones y se adhirieron bien a la membrana basal de la MA después de 7 días de cultivo. Además, los axones de estas células se integraron perfectamente en el estroma de la MA. Estos resultados concuerdan con la descripción previa de que las células nerviosas crecen extensivamente solamente por este lado de la MA debido a la adhesión neural a través de moléculas que se unen a la laminina (Davis et al., 1987).

Por tanto, este modelo *in vitro* podría abordar algunos de los inconvenientes de los cultivos de neuronas y la pérdida de células una vez inyectadas en el modelo animal.

3. Medio condicionado por la MA

Otro factor clave involucrado en la óptima regeneración axonal después del daño es el apoyo trófico proporcionado por las neurotrofinas, que estimulan la iniciación y extensión de las neuritas (Rankin et al., 2008).

Las CEA han sido usadas para tratar enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Parkinson porque tienen potencial neurorestaurativo y neuroprotector, producido por factores tróficos y antiangiogénicos que estimulan la angiogénesis, diferenciación neural y supervivencia de las neuronas (Uchida et al., 2000) y decrece la muerte celular por apoptosis (Castillo-Melendez et al., 2013). Estos factores neurotróficos incluyen el NGF, NT-3 y el BDNF (Toda et al., 2007). Las CEA también secretan factores inmunosupresores que podrían facilitar el injerto al suprimir la antigenicidad HLA y secretan factores de crecimiento y citoquinas que pueden estimular la diferenciación de poblaciones de células madre endógenas y/o ayudar en la curación y la reparación de heridas *in vivo* (Ilancheran et al., 2007).

Por ello, se han realizado diferentes estudios sobre la actuación de los factores de crecimiento y citoquinas secretados por las CEA sobre la proliferación y capacidad de migración de distintos tipos de células que demuestran que la solución derivada de estas células tiene un efecto beneficioso sobre la curación de las heridas *in vitro* por parte de las células epiteliales corneales al incrementar la migración de estas células y la proliferación a medida que se incrementan las concentraciones (Choi et al., 2009). También esta solución favorece la migración de los queratinocitos y de los fibroblastos durante la fase proliferativa de la curación de las heridas favoreciendo la reepitelización (Uberti et al., 2010). Con respecto al efecto que tiene este medio condicionado sobre las neuronas, en el estudio de Uchida et al., (2000 y 2003) al cultivar neuronas corticales de embriones de rata con una solución comercial de citoquinas derivadas de la MA, éstas aumentaron considerablemente su proliferación y crecimiento de las neuritas comparado con el medio control. Otros estudios como el de Venkatachalam et al., 2009 demostraron la acción de los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las CEA sobre células retinales neurales de pollo, las cuales solamente crecían con el medio condicionado por las CEA. En el estudio de Yang et al., (2013), usaron CMM de la sangre de CU diferenciándolas hacia células similares a neuronas dopaminérgicas con este medio. Las CMEA y las CMMGW, también promueven la reparación del tejido a través de la secreción de factores solubles que favorecen la supervivencia celular y la regeneración neural (neurogénesis y sinaptogénesis) a través de factores neurotróficos, tales como NGF y BDNF (Brohlin et al., 2009). Otras acciones incluyen remielinización e inhibición de la apoptosis e inflamación (Castillo-Melendez et al., 2013) por citoquinas y factores inmunomoduladores, tales como TGF- β , HGF, prostaglandina E2, IL-10, indoleamina 2,3-dioxigenasa, óxido nítrico y el HLA-G (Struys et al., 2011).

Todos estos factores de crecimiento secretados se reducen al eliminar las CEA y CMEA durante el proceso de descelularización así que nosotros los rescatamos mediante el medio condicionado por la MA.

Basándonos en estos descubrimientos, nosotros evaluamos por primera vez el efecto del medio condicionado por la MA sobre la proliferación de las células similares a células nerviosas obtenidas desde las CMEA, CEA y CMMGW. Para ello, sembramos cada uno de estos tipos celulares con varias concentraciones del medio condicionado por la MA, comparando la proliferación obtenida con respecto al medio control. Los resultados sugirieron que el medio condicionado por la MA favoreció la proliferación de las células similares a células nerviosas diferenciadas desde las CMEA, CEA y CMMGW de manera dosis dependiente sin diferencias significativas comparadas con el medio control aunque las CMEA diferenciadas a células similares a células nerviosas mostraron mayor proliferación. La no existencia de diferencias significativas puede deberse a que el medio control es un medio específico de neuronas, con lo cual nuestras células ya presentan una buena proliferación en dicho medio.

En resumen, la MA y el CU son dos posibles fuentes alternativas de células madre que se extraen y cultivan *in vitro* fácilmente, mientras mantienen una elevada capacidad proliferativa. Las CMEA y las CEA obtenidas de las MA y las CMMGW obtenidas de la gelatina de Wharton de los CU tienen un gran potencial para la síntesis de un equivalente de tejido nervioso por su habilidad para diferenciarse en células similares a células nerviosas no pudiendo afirmar que una fuente es mejor que otra. Además, la MA descelularizada es un buen soporte para estas células previniendo también la dispersión de las células una vez trasplantadas. Finalmente, el medio condicionado por la MA potencia la proliferación de las células similares a células nerviosas diferenciadas desde CMEA, CEA y CMMGW.

Síntesis

Aunque la Ingeniería Tisular de la piel tiene una larga historia, los tratamientos actuales todavía no son capaces de regenerar completamente la piel dañada (Cerqueira et al., 2012). No hay modelos de piel que completamente repliquen la anatomía, fisiología, estabilidad biológica o naturaleza estética de la piel lesionada (Metcalf y Ferguson, 2007). Estos equivalentes de piel a menudo no tienen melanocitos y por lo tanto no presentan pigmentación, ni tampoco contienen nervios lo que conlleva a la ausencia de sensación, T^a y/o presión (Metcalf y Ferguson, 2007).

Es por ello, que nosotros quisimos estudiar la regeneración del sistema nervioso porque posteriormente se podrían aplicar al correspondiente modelo de equivalente de piel *in vitro* consiguiendo inervarlo, lo que conlleva también a la mejora de la melanogénesis (Kumakiri et al., 1978) y angiogénesis.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, establecimos las siguientes conclusiones:

1. La eliminación de productos potencialmente tóxicos como la toxina colérica del medio de cultivo permite obtener queratinocitos y los equivalentes de piel en el mismo periodo de tiempo que utilizando medios que la incluyen.
2. La utilización de plasma humano como fuente de fibrina, utilizando ácido tranexámico y cloruro cálcico, permite obtener un soporte adecuado para desarrollar un equivalente de piel completamente autólogo.
3. El equivalente de piel usando el cultivo de los queratinocitos sobre matrices de fibrina con fibroblastos reveló la existencia de una MEC bien organizada con abundantes fibroblastos de morfología fusiforme, así como de un epitelio en la superficie organizado en varias capas de células equivalentes al epitelio de la piel normal.
4. En el modelo animal el injerto del equivalente de piel basado en la matriz de fibrina produce una buena integración del equivalente a los 21 días, que es total a los 4 meses, lo que da lugar a la curación de la lesión. Estos buenos resultados sugieren su posible uso clínico.
5. El mejor tratamiento para descelularizar la MA es 1% de T/E a 37°C durante 30 min. Este tratamiento no afecta a la estructura de la membrana basal ni a los componentes de la MEC.
6. El lado epitelial de la MA descelularizada es útil como soporte para la proliferación de los queratinocitos y el lado estromal para los fibroblastos, manteniendo su fenotipo.
7. Se puede sintetizar un equivalente de piel *in vitro* con los fibroblastos sembrados por el lado estromal y los queratinocitos sobre la membrana basal del lado epitelial de la MA descelularizada.
8. La MA y el CU son una fuente alternativa de células madre que pueden ser fácilmente aisladas y cultivadas *in vitro*, manteniendo una gran capacidad de proliferación y diferenciación.
9. Las CMEA y CEA obtenidas a partir de la MA y las CMMGW obtenidas a partir de CU presentan un gran potencial de diferenciación hacia los tres linajes embrionarios y capacidad de diferenciarse hacia células similares a células nerviosas.

Conclusiones

10. La membrana basal de la MA descelularizada funciona como un buen soporte para el crecimiento y elongación axonal de células similares a células nerviosas *in vitro*.
11. El medio condicionado por la MA ayuda a la proliferación de las CEA y CMMGW diferenciadas a células similares a células nerviosas pero no de las CMEA diferenciadas aunque los resultados no son estadísticamente significativos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface*. 2010; 6; 7 Suppl 6:S689-706.
2. Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Müller T, Fritz N, Beljajeva A, Mochii M, Liste I, Usoskin D, Suter U, Birchmeier C, Ernfors P. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*. 2009; 139(2):366-79.
3. Aihara M. Ultrastructural study of grafted autologous cultured human epithelium. *Br J Plast Surg*. 1989; 42(1):35-42.
4. Alexaline MM, Trouillas M, Nivet M, Bourreau E, Leclerc T, Duhamel P, Martin MT, Doucet C, Fortunel NO, Lataillade JJ. Bioengineering a human plasma-based epidermal substitute with efficient grafting capacity and high content in clonogenic cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4(6):643-54.
5. Alitalo K, Kuismanen E, Myllylä R, Kiistala U, Asko-Seljavaara S, Vaheri A. Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. *J Cell Biol*. 1982; 94(3):497-505.
6. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007; 7:11.
7. Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, Zummo G, Farina F, La Rocca G. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(4):423-38.
8. Apte SH, Redmond AM, Groves PL, Schussek S, Pattinson DJ, Doolan DL. Subcutaneous cholera toxin exposure induces potent CD103⁺ dermal dendritic cell activation and migration. *Eur J Immunol*. 2013; 43(10):2707-17.
9. Arvelo F, Pérez P, Cotte C. [Obtention of human skin sheets by means of tissue engineering]. *Acta Cient Venez*. 2004; 55(1):74-82.

10. Balasubramanian S, Jasty S, Sitalakshmi G, Madhavan HN, Krishnakumar S. Influence of feeder layer on the expression of stem cell markers in cultured limbal corneal epithelial cells. *Indian J Med Res.* 2008; 128(5):616-22.
11. Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005; 19(4):405-13.
12. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 2005; 31(6):674-86.
13. Bennion BJ, Daggett V. Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: a chemical chaperone at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(17):6433-8.
14. Berthod F, Germain L, Li H, Xu W, Damour O, Auger FA. Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice. *Matrix Biol.* 2001; 20(7):463-73.
15. Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant.* 2008; 17(8):955-68.
16. Blais M, Mottier L, Germain MA, Bellenfant S, Cadau S, Berthod F. Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model. *Tissue Eng Part A.* 2014; 20(15-16):2180-8.
17. Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44(4):215-30.
18. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta.* 2000; 21(2-3):203-9.
19. Boyce ST, Warden GD. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am J Surg.* 2002; 183(4):445-56.
20. Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, Terenghi G, Wiberg M, Shawcross SG, Novikova LN. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells. *Neurosci Res.* 2009; 64(1):41-9.

21. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992; 25(1):31-40.
22. Brusselaers N, Pirayesh A, Hoeksema H, Richters CD, Verbelen J, Beele H, Blot SI, Monstrey S. Skin replacement in burn wounds. *J Trauma.* 2010; 68(2):490-501.
23. Burgos H. Angiogenic factor from human term placenta. Purification and partial characterization. *Eur J Clin Invest.* 1986; 16(6):486-93.
24. Caicedo CA, Cuevas NM, Rodríguez IR, Torres JM, Vargas LP, Fontanilla M. Estrategias en el desarrollo de sustitutos de piel artificial. *Revista de la facultad de medicina.* 2005; 10(2):7-16.
25. Caissie R, Gingras M, Champigny MF, Berthod F. In vivo enhancement of sensory perception recovery in a tissue-engineered skin enriched with laminin. *Biomaterials.* 2006; 27(15):2988-93.
26. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25(11):2886-95.
27. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Novais JB, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Andrade AL, Gameiro R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol.* 2012; 12:18.
28. Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M Jr. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52(5):743-75.
29. Carretero M, Guerrero-Aspizua S, Del Rio M. Applicability of bioengineered human skin: from preclinical skin humanized mouse models to clinical regenerative therapies. *Bioeng Bugs.* 2011; 2(4):203-7.
30. Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front Neurosci.* 2013; 7:194.
31. Cerqueira MT, Marques AP, Reis RL. Using stem cells in skin regeneration: possibilities and reality. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(8):1201-14.

32. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007; 25(11):2739-49.
33. Chang YJ, Hwang SM, Tseng CP, Cheng FC, Huang SH, Hsu LF, Hsu LW, Tsai MS. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs*. 2010; 192(2):93-105.
34. Cho H, Seo YK, Jeon S, Yoon HH, Choi YK, Park JK. Neural differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells by sub-sonic vibration. *Life Sci*. 2012; 90(15-16):591-9.
35. Choi JA, Jin HJ, Jung S, Yang E, Choi JS, Chung SH, Joo CK. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing in vitro. *Mol Vis*. 2009; 15:2230-8.
36. Choi M, Lee HS, Naidansaren P, Kim HK, O E, Cha JH, Ahn HY, Yang PI, Shin JC, Joe YA. Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45(3):560-70.
37. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013; 30(1):30-41.
38. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936:355-67.
39. Clark RA, Chong BF, Mirchandani N, Yamanaka K, Murphy GF, Dowgiert RK, Kupper TS. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol*. 2006; 126(5):1059-70.
40. Compton CC, Hickerson W, Nadire K, Press W. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil*. 1993; 14(6):653-62.
41. Coolen NA, Verkerk M, Reijnen L, Vlig M, van den Bogaerdt AJ, Breetveld M, Gibbs S, Middelkoop E, Ulrich MM. Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell Transplant*. 2007; 16(6):649-61.
42. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 108(6):1713-26.

43. Danielsen N, Müller H, Pettmann B, Williams LR, Davis GE, Engvall E, Manthorpe M, Varon S. Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: effects in a silicone chamber model. *Brain Res.* 1988; 467(1):39-50.
44. Datta I, Mishra S, Mohanty L, Pulikkot S, Joshi PG. Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2011; 13(8):918-32.
45. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science.* 1981; 214(4523):931-3.
46. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci.* 2004; 79(2):214-23.
47. Davis GE, Engvall E, Varon S, Manthorpe M. Human amnion membrane as a substratum for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Brain Res.* 1987; 430(1):1-10.
48. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J.* 1910; 15:307-8.
49. de la Puente P, Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res.* 2014; 322(1):1-11.
50. de la Puente P, Ludeña D, Fernández A, Aranda JL, Varela G, Iglesias J. Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 99(4):648-54.
51. de Melo GB, Gomes JA, da Glória MA, Martins MC, Haapalainen EF. [Morphological assessment of different amniotic membrane epithelial denuding techniques]. *Arq Bras Oftalmol.* 2007; 70(3):407-11.
52. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity.* 2011; 35(6):857-69.
53. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001; 96(2):150-7.

54. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem.* 2010a; 111(4):846-57.
55. Díaz-Prado S, Rendal-Vázquez ME, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rodríguez-Cabarcos M, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank.* 2010b; 11(2):183-95.
56. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004; 9:283-9.
57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-7.
58. Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N. Evidence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett.* 2003; 344(3):157-60.
59. Emans PJ, van Rhijn LW, Welting TJ, Cremers A, Wijnands N, Spaapen F, Voncken JW, Shastri VP. Autologous engineering of cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(8):3418-23.
60. Engvall E, Davis GE, Dickerson K, Ruoslahti E, Varon S, Manthorpe M. Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: localization of the neurite-promoting site. *J Cell Biol.* 1986; 103(6 Pt 1):2457-65.
61. Ernfors P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res.* 2010; 316(8):1397-407.
62. Eves PC, Beck AJ, Shard AG, Mac Neil S. A chemically defined surface for the co-culture of melanocytes and keratinocytes. *Biomaterials.* 2005; 26(34):7068-81.
63. Feng X, Tonnesen MG, Mousa SA, Clark RA. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *Int J Cell Biol.* 2013; 2013:231279.

64. Fu X, Fang L, Li X, Cheng B, Sheng Z. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen.* 2006a; 14(3):325-35.
65. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells.* 2006b; 24(1):115-24.
66. Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci.* 2004; 11(5):652-60.
67. Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank.* 2004; 5(2):73-80.
68. Gartner LP, Hiatt JL. Atlas color de histología. 3ª ed. Madrid: Panamericana. 2003; 216-232.
69. Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Buján J, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012; 18(6):408-19.
70. Germain L, Guignard R, Rouabhia M, Auger FA. Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase. *Burns.* 1995; 21(3):175-80.
71. Goding C. Melanoma, making a difference. *Pigment Cell Res.* 2007; 20(6):457.
72. Graham A. Melanocyte production: dark side of the Schwann cell. *Curr Biol.* 2009; 19(24):R1116-7.
73. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell.* 1978; 15(3):801-11.
74. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(4-5):352-66.
75. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Clin Plast Surg.* 2012; 39(1):33-58.

76. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(1):63-71.
77. Han Y, Chai J, Sun T, Li D, Tao R. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into dermal fibroblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 413(4):561-5.
78. Henry FP, Goyal NA, David WS, Wes D, Bujold KE, Randolph MA, Winograd JM, Kochevar IE, Redmond RW. Improving electrophysiologic and histologic outcomes by photochemically sealing amnion to the peripheral nerve repair site. *Surgery.* 2009; 145(3):313-21.
79. Hermans MH. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? *Burns.* 2014; 40(3):408-15.
80. Hermanson A, Jonsson CE, Lindblom U. Sensibility after burn injury. *Clin Physiol.* 1986; 6(6):507-21.
81. Hieber AD, Corcino D, Motosue J, Sandberg LB, Roos PJ, Yu SY, Csiszar K, Kagan HM, Boyd CD, Bryant-Greenwood GD. Detection of elastin in the human fetal membranes: proposed molecular basis for elasticity. *Placenta.* 1997; 18(4):301-12.
82. Hirobe T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2005; 18(1):2-12.
83. Hojo M, Inokuchi S, Kidokoro M, Fukuyama N, Tanaka E, Tsuji C, Miyasaka M, Tanino R, Nakazawa H. Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(5):1638-45.
84. Höke A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol.* 2006; 2(8):448-54.
85. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, Dua HS. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14(4):371-81.

86. Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 2001; 22(22):2959-66.
87. Huang G, Ji S, Luo P, Liu H, Zhu S, Wang G, Zhou P, Xiao S, Xia Z. Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered amniotic membrane. *Cell Transplant*. 2013; 22(10):1831-44.
88. Huang SP, Hsu CC, Chang SC, Wang CH, Deng SC, Dai NT, Chen TM, Chan JY, Chen SG, Huang SM. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. *Ann Plast Surg*. 2012; 69(6):656-62.
89. Huang YC, Dennis RG, Larkin L, Baar K. Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels. *J Appl Physiol (1985)*. 2005; 98(2):706-13.
90. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006; 3(10):589-601.
91. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*. 2007; 77(3):577-88.
92. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1338-45.
93. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, Moraleda JM. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*. 2010; 25(1):91-8.
94. Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol*. 2009; 90(2):261-9.
95. Ji SZ, Xiao SC, Luo PF, Huang GF, Wang GY, Zhu SH, Wu MJ, Xia ZF. An epidermal stem cells niche microenvironment created by engineered human amniotic membrane. *Biomaterials*. 2011; 32(31):7801-11.

96. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, Messmer BJ, Turina M. Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 19(4):424-30.
97. Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg.* 2002; 55(3):185-93.
98. Jones JE, Nelson EA, Al-Hity A. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(1):CD001737.
99. Jorcano JL. Aspectos biotecnológicos: Aplicaciones preclínicas y clínicas de piel generada a partir de células madre epidérmicas. En: Cascales M, Dávila F. *Células madre y terapia regenerativa.* 1ª ed. Madrid. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España. 2009; 223-257.
100. Kaiser HW, Stark GB, Kopp J, Balcerkiewicz A, Spilker G, Kreysel HW. Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique. *Burns.* 1994; 20(1):23-9.
101. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol.* 2000; 165(1):27-34.
102. Kamolz LP, Luegmair M, Wick N, Eisenbock B, Burjak S, Koller R, Meissl G, Frey M. The Viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels. *Burns.* 2005; 31(1):25-9.
103. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(4):390-9.
104. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Mosc).* 2001; 66(1):1-7.
105. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukan A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells.* 2007; 25(2):319-31.

106. Karasek MA, Charlton ME. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J Invest Dermatol.* 1971; 56(3):205-10.
107. Karypidis D, Perrea D, Papadopoulos O, Kostakis A. The Effect of Human Recombinant Erythropoietin (rHuEPO) and Tacrolimus (FK506) in Autologous and Homologous Full Thickness Skin Graft (FTSG) Take and Viability in a Rat Model, *InTech*, 2011; 197-220.
108. Kesting MR, Wolff KD, Hohlweg-Majert B, Steinstraesser L. The role of allogenic amniotic membrane in burn treatment. *J Burn Care Res.* 2008; 29(6):907-16.
109. Kim DS, Cho HJ, Choi HR, Kwon SB, Park KC. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(21):2774-81.
110. Kim EY, Lee KB, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Rep.* 2014; 47(3):135-40.
111. Kim J, Kang HM, Kim H, Kim MR, Kwon HC, Gye MC, Kang SG, Yang HS, You J. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2007; 9(4):581-94.
112. Kim SS, Song CK, Shon SK, Lee KY, Kim CH, Lee MJ, Wang L. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell Tissue Res.* 2009; 336(1):59-66.
113. Kobayashi M, Yakuwa T, Sasaki K, Sato K, Kikuchi A, Kamo I, Yokoyama Y, Sakuragawa N. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer. *Cell Transplant.* 2008; 17(3):291-301.
114. Kober J, Gugerell A, Schmid M, Kamolz LP, Keck M. Generation of a Fibrin Based Three-Layered Skin Substitute. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:170427.
115. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(9):2506-13.
116. Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, Kociok N, Jousseaume AM, Kinoshita S. Comparison of intact and denuded amniotic membrane

- as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245(1):123-34.
117. König A, Bruckner-Tuderman L. Transforming growth factor-beta stimulates collagen VII expression by cutaneous cells in vitro. *J Cell Biol.* 1992; 117(3):679-85.
118. Kumakiri M, Hashimoto K, Willis I. Biological changes of human cutaneous nerves caused by ultraviolet irradiation: an ultrastructural study. *Br J Dermatol.* 1978; 99(1):65-75.
119. Kumar A, Wang X, Nune KC, Misra R. Biodegradable hydrogel-based biomaterials with high absorbent properties for non-adherent wound dressing. *Int Wound J.* 2017; 14(6):1076-1087.
120. Kumar R, Sinha S, Hagner A, Stykel M, Raharjo E, Singh KK, Midha R, Biernaskie J. Adult skin-derived precursor Schwann cells exhibit superior myelination and regeneration supportive properties compared to chronically denervated nerve-derived Schwann cells. *Exp Neurol.* 2016; 278:127-42.
121. Kuo SM, Chang SJ, Chen TW, Kuan TC. Guided tissue regeneration for using a chitosan membrane: an experimental study in rats. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 76(2):408-15.
122. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells and Umbilical Cord as Sources for Schwann Cell Differentiation: their Potential in Peripheral Nerve Repair. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal.* 2011; 4:54–63.
123. Kuroki T. Induction by cholera toxin of synchronous divisions in vivo in the epidermis resulting in hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(11):6958-62.
124. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131(2):267-82.
125. Lam PK, Chan ES, Liew CT, Lau C, Yen SC, King WW. Combination of a new composite biocompatible skin graft on the neoderms of artificial skin in an animal model. *ANZ J Surg.* 2002; 72(5):360-3.

126. Law JX, Chowdhury SR, Aminuddin BS, Ruszymah BHI. Role of plasma-derived fibrin on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cell Tissue Bank*. 2017; 18(4):585-595.
127. Lee DY, Cho KH. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch Dermatol Res*. 2005; 296(7):296-302.
128. Lee DY, Lee JH, Lee ES, Cho KH, Yang JM. Fibroblasts play a stimulatory role in keratinocyte proliferation but an inhibitory role in melanocyte growth and pigmentation in a skin equivalent system from skin type IV. *Arch Dermatol Res*. 2003; 294(10-11):444-6.
129. Lee DY, Lee JH, Yang JM, Lee ES, Park KH, Mun GH. A new dermal equivalent: the use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials. *J Dermatol Sci*. 2006; 43(2):95-104.
130. Lee JS, Kim DH, Choi DK, Kim CD, Ahn GB, Yoon TY, Lee JH, Lee JY. Comparison of Gene Expression Profiles between Keratinocytes, Melanocytes and Fibroblasts. *Ann Dermatol*. 2013; 25(1):36-45.
131. Ley-Chávez E, Martínez-Pardo ME, Roman R, Oliveros-Lozano Fde J, Canchola-Martínez E. Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. *Ann Transplant*. 2003; 8(4):46-9.
132. Li H, Chu Y, Zhang Z, Zhang G, Jiang L, Wu H, Liu S, Yu C, Jin Y. Construction of bilayered tissue-engineered skin with human amniotic mesenchymal cells and human amniotic epithelial cells. *Artif Organs*. 2012; 36(10):911-9.
133. Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, Herlyn M. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J Cell Sci*. 2010; 123(Pt 6):853-60.
134. Li W, He H, Kuo CL, Gao Y, Kawakita T, Tseng SC. Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(6):2381-9.
135. Li Z, Qin H, Feng Z, Liu W, Zhou Y, Yang L, Zhao W, Li Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-loaded amniotic membrane for the repair of radial nerve injury. *Neural Regen Res*. 2013; 8(36):3441-8.

136. Liang HS, Liang P, Xu Y, Wu JN, Liang T, Xu XP, Liu EZ. Denuded human amniotic membrane seeding bone marrow stromal cells as an effective composite matrix stimulates axonal outgrowth of rat neural cortical cells in vitro. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009; 151(9):1113-20.
137. Lim LS, Riau A, Poh R, Tan DT, Beuerman RW, Mehta JS. Effect of dispase denudation on amniotic membrane. *Mol Vis*. 2009; 15:1962-70.
138. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, Redl H, Kasper C. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*. 2012; 1(4):1061-88.
139. Liu S, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B, Sui X, Xu W, Lu S, Guo Q. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cell Immunol*. 2012; 278(1-2):35-44.
140. Llamas S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*. 2006; 7(1):47-53.
141. Llamas SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*. 2004; 77(3):350-5.
142. Lo V, Lara-Corrales I, Stuparich A, Pope E. Amniotic membrane grafting in patients with epidermolysis bullosa with chronic wounds. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 62(6):1038-44.
143. Lo V, Pope E. Amniotic membrane use in dermatology. *Int J Dermatol*. 2009; 48(9):935-40.
144. Lohmeyer JA, Liu F, Krüger S, Lindenmaier W, Siemers F, Machens HG. Use of gene-modified keratinocytes and fibroblasts to enhance regeneration in a full skin defect. *Langenbecks Arch Surg*. 2011; 396(4):543-50.
145. Ma L, Feng XY, Cui BL, Law F, Jiang XW, Yang LY, Xie QD, Huang TH. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)*. 2005; 118(23):1987-93.
146. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24:4833-41.

147. Macri L, Clark RA. Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009; 22(2):83-93.
148. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011; 216(7):753-62.
149. Mahmoudi-Rad M, Abolhasani E, Moravvej H, Mahmoudi-Rad N, Mirdamadi Y. Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. *Clin Exp Dermatol*. 2013; 38(6):646-51.
150. Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal*. 2009; 7:6.
151. Malenfant A, Forget R, Papillon J, Amsel R, Frigon JY, Choinière M. Prevalence and characteristics of chronic sensory problems in burn patients. *Pain*. 1996; 67(2-3):493-500.
152. Manochantr S, Tantrawatpan C, Kheolamai P, U-pratya Y, Supokawej A, Issaragrisil S. Isolation, characterization and neural differentiation potential of amnion derived mesenchymal stem cells. *J Med Assoc Thai*. 2010; 93 Suppl 7:S183-91.
153. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns*. 1999; 25(7):625-35.
154. Marcus AJ, Coyne TM, Rauch J, Woodbury D, Black IB. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*. 2008; 76(2):130-44.
155. Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, Tahan V, Miki T, Dorko K, Ellis E, Strom SC. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010; Chapter 1:Unit 1E.5.
156. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309):75-81.

157. Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69(9):973-85.
158. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(2):142-9.
159. Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Fuzina NH, Norhayati MM, Fauziah O, Isa MR, Saim L, Ruszymah BH. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns.* 2007; 33(3):355-63.
160. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns.* 1998; 24(7):621-30.
161. Mehanna RA, Nabil I, Attia N, Bary AA, Razek KA, Ahmed TA, Elsayed F. The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:846062.
162. Mennan C, Brown S, McCarthy H, Mavrogonatou E, Kletsas D, Garcia J, Balain B, Richardson J, Roberts S. Mesenchymal stromal cells derived from whole human umbilical cord exhibit similar properties to those derived from Wharton's jelly and bone marrow. *FEBS Open Bio.* 2016; 6(11):1054-1066.
163. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf).* 2017; 4(2):39-53.
164. Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface.* 2007; 4(14):413-37.
165. Mihiu CM, Rus Ciucă D, Soritău O, Suşman S, Mihiu D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Rom J Morphol Embryol.* 2009; 50(1):73-7.

166. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005; 23(10):1549-59.
167. Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010; Chapter 1: Unit 1E.3.
168. Miki T, Marongiu F, Ellis E, C Strom S. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2007; Chapter 1: Unit 1E.3.
169. Minamimura A, Ichioka S, Sano H, Sekiya N. Comparison of collagen matrix treatment impregnated with platelet rich plasma vs bone marrow. *J Plast Surg Hand Surg*. 2014; 48(1):15-20.
170. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003; 21(1):50-60.
171. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of an amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 105(2):660-6.
172. Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG, Neuenchwander S, Hoerstrup SP, Baaijens FP, Bouten CV. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2005; 26(16):3113-21.
173. Morgan ED, Bledsoe SC, Barker J. Ambulatory management of burns. *Am Fam Physician*. 2000; 62(9):2015-26, 2029-30, 2032.
174. Mulder GD, Vande Berg JS. Cellular senescence and matrix metalloproteinase activity in chronic wounds. Relevance to debridement and new technologies. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2002; 92(1):34-7.
175. Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*. 2004; 24(19):4585-95.
176. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, Jenkin G. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010; Chapter 1: Unit 1E.6.

177. Navsaria HA, Myers SR, Leigh IM, McKay IA. Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends Biotechnol.* 1995; 13(3):91-100.
178. Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *Eur Cell Mater.* 2010; 19:22-9.
179. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2008; 15:88-99.
180. Nishiura Y, Brandt J, Nilsson A, Kanje M, Dahlin LB. Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2004; 10(1-2):157-64.
181. Niyonsaba F, Ogawa H. Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J Dermatol Sci.* 2005; 40(3):157-68.
182. Nordback PH, Miettinen S, Kääriäinen M, Pelto-Huikko M, Kuokkanen H, Suuronen R. Amniotic membrane reduces wound size in early stages of the healing process. *J Wound Care.* 2012; 21(4):190-97.
183. O'Neill AC, Randolph MA, Bujold KE, Kochevar IE, Redmond RW, Winograd JM. Photochemical sealing improves outcome following peripheral neurorrhaphy. *J Surg Res.* 2009; 151(1):33-9.
184. Oragui E, Nannaparaju M, Khan WS. The role of bioreactors in tissue engineering for musculoskeletal applications. *Open Orthop J.* 2011; 5 Suppl 2:267-70.
185. Oyama Y, Hori N, Allen CN, Carpenter DO. Influences of trypsin and collagenase on acetylcholine responses of physically isolated single neurons of *Aplysia californica*. *Cell Mol Neurobiol.* 1990; 10(2):193-205.
186. Pajoum Shariati SR, Shokrgozar MA, Vossoughi M, Eslamifar A. In vitro co-culture of human skin keratinocytes and fibroblasts on a biocompatible and biodegradable scaffold. *Iran Biomed J.* 2009; 13(3):169-77.

Bibliografía

187. Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, Margolis L, Revoltella RP. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells*. 2003; 21(4):481-94.
188. Park BW, Kang DH, Kang EJ, Byun JH, Lee JS, Maeng GH, Rho GJ. Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; 6(2):113-24.
189. Park JJ, Cintron JR, Siedentop KH, Orsay CP, Pearl RK, Nelson RL, Abcarian H. Technical manual for manufacturing autologous fibrin tissue adhesive. *Dis Colon Rectum*. 1999; 42(10):1334-8.
190. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008; 26(2):300-11.
191. Parolini O, Soncini M, Evangelista M, Schmidt D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? *Regen Med*. 2009; 4(2):275-91.
192. Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1999; 113(6):1099-105.
193. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(5):289-301.
194. Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, Bondanza S, Guerra L, Zambruno G, Micali G, De Luca M. The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*. 1999; 68(6):868-79.
195. Peniche C, Argüelles W. Ingeniería de tejidos aplicada a la sustitución y regeneración de piel. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria. 2009.

196. Peña I, Junquera LM, Meana A, García E, García V, De Vicente JC. In vitro engineering of complete autologous oral mucosa equivalents: characterization of a novel scaffold. *J Periodontal Res.* 2010; 45(3):375-80.
197. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells.* 2007; 25(11):2896-902.
198. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194(3):664-73.
199. Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol.* 2002; 119(4):888-99.
200. Pouliot R, Larouche D, Auger FA, Juhasz J, Xu W, Li H, Germain L. Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation.* 2002; 73(11):1751-7.
201. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008; 14(1):105-18.
202. Pu L, Meng M, Wu J, Zhang J, Hou Z, Gao H, Xu H, Liu B, Tang W, Jiang L, Li Y. Compared to the amniotic membrane, Wharton's jelly may be a more suitable source of mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering and clinical regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1):72.
203. Ramakrishnan KM, Jayaraman V. Management of partial-thickness burn wounds by amniotic membrane: a cost-effective treatment in developing countries. *Burns.* 1997; 23 Suppl 1:S33-6.
204. Ramió-Lluch L, Cerrato S, Brazis P, Rabanal RM, Fondevila D, Puigdemont A. Proof of concept of a new autologous skin substitute for the treatment of deep wounds in dogs. *Vet J.* 2017; 230:36-40.
205. Rankin SL, Guy CS, Mearow KM. Neurite outgrowth is enhanced by laminin-mediated down-regulation of the low affinity neurotrophin receptor, p75NTR. *J Neurochem.* 2008; 107(3):799-813.
206. Regnier M, Duval C, Schmidt R. Potential cosmetic applications of reconstructed epidermis. *Int J Cosmet Sci.* 1999; 21(1):51-8.

207. Reinertsen E, Skinner M, Wu B, Tawil B. Concentration of fibrin and presence of plasminogen affect proliferation, fibrinolytic activity, and morphology of human fibroblasts and keratinocytes in 3D fibrin constructs. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20(21-22):2860-9.
208. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49(1):35-43.
209. Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W. Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank*. 2001; 2(2):95-102.
210. Rendal-Vázquez ME, San-Luis-Verdes A, Yebra-Pimentel-Vilar MT, López-Rodríguez I, Domenech-García N, Andión-Núñez C, Blanco-García F. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 2012; 13(3):513-9.
211. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med*. 2009; 41(12):858-65.
212. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6(3):331-43.
213. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and e-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010; 31(2):216-25.
214. Rice FL, Albers KM, Davis BM, Silos-Santiago I, Wilkinson GA, LeMaster AM, Ernfors P, Smeyne RJ, Aldskogius H, Phillips HS, Barbacid M, DeChiara TM, Yancopoulos GD, Dunne CE, Fundin BT. Differential dependency of unmyelinated and A delta epidermal and upper dermal innervation on neurotrophins, trk receptors, and p75LNGFR. *Dev Biol*. 1998; 198(1):57-81.
215. Rnjak J, Li Z, Maitz PK, Wise SG, Weiss AS. Primary human dermal fibroblast interactions with open weave three-dimensional scaffolds prepared from synthetic human elastin. *Biomaterials*. 2009; 30(32):6469-77.

216. Ronfard V, Broly H, Mitchell V, Galizia JP, Hochart D, Chambon E, Pellerin P, Huart JJ. Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. *Burns*. 1991; 17(3):181-4.
217. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*. 2006; 86(4):1309-79.
218. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2004.
219. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2005; 203(3):465-70.
220. Sabapathy V, Sundaram B, V M S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014; 9(4):e93726.
221. Sabella, N. Use of the Fetal Membranes in Skin Grafting. *Medication Reconciliation NY*. 1913; 83: 478-480.
222. Sadler TW. Second week of development: Bilaminar germ disc. In: Sadler TW, ed. *Langman's Medical Embryology*. 9^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2004.
223. Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Kobayashi M, Yokoyama Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res*. 2004; 78(2):208-14.
224. Sakuragawa N, Misawa H, Ohsugi K, Kakishita K, Ishii T, Thangavel R, Tohyama J, Elwan M, Yokoyama Y, Okuda O, Arai H, Ogino I, Sato K. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett*. 1997; 232(1):53-6.
225. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. 1996; 209(1):9-12.
226. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, Samani FS, Torshizi Z, Nematollahi-Mahani SN. Comparison of different methods for the

- isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2012; 48(2):75-83.
227. Scuderi N, Onesti MG, Bistoni G, Ceccarelli S, Rotolo S, Angeloni A, Marchese C. The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold. *Biomaterials.* 2008; 29(11):1620-9.
228. Sese N, Cole M, Tawil B. Proliferation of human keratinocytes and cocultured human keratinocytes and fibroblasts in three-dimensional fibrin constructs. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(3-4):429-37.
229. Shelton WR, Treacy SH, Dukes AD, Bomboy AL. Use of allografts in knee reconstruction: I. Basic science aspects and current status. *J Am Acad Orthop Surg.* 1998; 6(3):165-8.
230. Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol.* 2004; 164(6):2055-66.
231. Sheridan BS, Lefrançois L. Regional and mucosal memory T cells. *Nat Immunol.* 2011; 12(6):485-91.
232. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface.* 2010; 7(43):229-58.
233. Shinya M, Komuro H, Saihara R, Urita Y, Kaneko M, Liu Y. Neural differentiation potential of rat amniotic epithelial cells. *Fetal Pediatr Pathol.* 2010; 29(3):133-43.
234. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials.* 2009; 30(6):1056-65.
235. Singh R, Purohit S, Chacharkar MP, Bhandari PS, Bath AS. Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. *Burns.* 2007; 33(4):505-10.
236. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* 2000; 21(5):457-87.

237. Sobolewski K, Bańkowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate*. 1997; 71(1):11-21.
238. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67(1):1-8.
239. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1(4):296-305.
240. Splichal I, Trebichavský I. Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46(4):345-51.
241. Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol*. 1989; 93(2):287-90.
242. Struys T, Moreels M, Martens W, Donders R, Wolfs E, Lambrichts I. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2011; 193(6):366-78.
243. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol*. 2015; 66(1):14-21.
244. Svensjö T, Yao F, Pomahac B, Winkler T, Eriksson E. Cultured autologous fibroblasts augment epidermal repair. *Transplantation*. 2002; 73(7):1033-41.
245. Taghiabadi E, Mohammadi P, Aghdami N, Falah N, Orouji Z, Nazari A, Shafieyan S. Treatment of Hypertrophic Scar in Human with Autologous Transplantation of Cultured Keratinocytes and Fibroblasts along with Fibrin Glue. *Cell J*. 2015a; 17(1):49-58.
246. Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, Jalili Firoozinezhad S, Aghdami N. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering. *Cell J*. 2015b; 16(4):476-87.

247. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct.* 2004; 29(3):73-84.
248. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta.* 1991; 12(3):285-8.
249. Tamagawa T, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Induced in-vitro differentiation of neural-like cells from human amnion-derived fibroblast-like cells. *Hum Cell.* 2008; 21(2):38-45.
250. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro. *Hum Cell.* 2004; 17(3):125-30.
251. Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell.* 2007; 20(3):77-84.
252. Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development.* 1999; 126(6):1269-80.
253. Tauzin H, Rolin G, Viennet C, Saas P, Humbert P, Muret P. A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* 2014; 15(2):257-65.
254. Tenenhaus M, Rennekampff HO. Current Concepts in Tissue Engineering: Skin and Wound. *Plast Reconstr Surg.* 2016; 138(3 Suppl):42S-50S.
255. Theoret C. Tissue engineering in wound repair: the three "R"s--repair, replace, regenerate. *Vet Surg.* 2009; 38(8):905-13.
256. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci.* 2007; 105(3):215-28.
257. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 2005; 23(6):727-37.

258. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000; 5(1):40-6.
259. Topol BM, Haimes HB, Dubertret L, Bell E. Transfer of melanosomes in a skin equivalent model in vitro. *J Invest Dermatol.* 1986; 87(5):642-7.
260. Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(4):987-94.
261. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* 2008; 26(3):591-9.
262. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.* 1999; 179(3):325-35.
263. Uberti MG, Pierpont YN, Ko F, Wright TE, Smith CA, Cruse CW, Robson MC, Payne WG. Amnion-derived cellular cytokine solution (ACCS) promotes migration of keratinocytes and fibroblasts. *Ann Plast Surg.* 2010; 64(5):632-5.
264. Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurokawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res.* 2000; 62(4):585-90.
265. Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett.* 2003; 341(1):1-4.
266. Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kawasaki H, Kinoshita S, Sasai Y. Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(25):9554-9.
267. Ulmann L, Rodeau JL, Danoux L, Contet-Audonneau JL, Pauly G, Schlichter R. Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. *Eur J Neurosci.* 2007; 26(1):113-25.
268. Van Raamsdonk CD, Deo M. Links between Schwann cells and melanocytes in development and disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013; 26(5):634-45.

269. Velásquez DA, Pineda C, Cardona ME, Gómez NE, Gartz GJ, Úsuga IC, Tróchez DF, Londoño C. Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. *Revista Ingeniería Biomédica*. 2008; 2(3): 77-83.
270. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the celular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009; 37(5):1528-42.
271. Venkatachalam S, Palaniappan T, Jayapal PK, Neelamegan S, Rajan SS, Muthiah VP. Novel neurotrophic factor secreted by amniotic epithelial cells. *Biocell*. 2009; 33(2):81-9.
272. Wallquist W, Patarroyo M, Thams S, Carlstedt T, Stark B, Cullheim S, Hammarberg H. Laminin chains in rat and human peripheral nerve: distribution and regulation during development and after axonal injury. *J Comp Neurol*. 2002; 454(3):284-93.
273. Walsh SK, Gordon T, Addas BM, Kemp SW, Midha R. Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. *Exp Neurol*. 2010; 223(1):221-8.
274. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1330-7.
275. Ward RS, Tuckett RP, English KB, Johansson O, Saffle JR. Substance P axons and sensory threshold increase in burn-graft human skin. *J Surg Res*. 2004; 118(2):154-60.
276. Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, Borlongan CV. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2015; 17(1):18-24.
277. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003; 12(5):545-52.
278. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells:

- preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006; 24(3):781-92.
279. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007; 127(5):998-1008.
280. Wharton TW. *Adenographia*. Translated by S. Freer. 1^a ed. Oxford, UK: Oxford University Press. 1996; 242-8.
281. Whelan D, Caplice NM, Clover AJ. Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. *J Control Release*. 2014; 196:1-8.
282. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(4):463-72.
283. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006; 12(8):2117-29.
284. Wolbank S, Hildner F, Redl H, van Griensven M, Gabriel C, Hennerbichler S. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009; 3(8):651-4.
285. Wong T, McGrath JA, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol*. 2007; 156(6):1149-55.
286. Wu Z, Hui G, Lu Y, Liu T, Huang Q, Guo L. Human amniotic epithelial cells express specific markers of nerve cells and migrate along the nerve fibers in the corpus callosum. *Neural Regen Res*. 2012; 7(1):41-5.
287. Wu ZY, Hui GZ. Materials for neuro-transplantation and the amnion. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119(16):1323-6.
288. Xiao YZ, Wang S. Differentiation of Schwann-like cells from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Med Rep*. 2015; 11(2):1146-52.
289. Yam HF, Pang CP, Fan DS, Fan BJ, Yu EY, Lam DS. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane Cornea. 2002; 21(1):101-5.

290. Yamamoto M, Yanaga H, Nishina H, Watabe S, Mamba K. Fibrin stimulates the proliferation of human keratinocytes through the autocrine mechanism of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor. *Tohoku J Exp Med.* 2005; 207(1):33-40.
291. Yan G, Su Y, Ai G. [Study on human amniotic membrane loaded with marrow mesenchymal stem cells and epidermis cells in promoting healing of wound combined with radiation injury]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2004; 18(6):497-501.
292. Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res.* 2006; 326(1):69-77.
293. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J Dermatol Sci.* 2009; 56(3):188-95.
294. Yang S, Sun HM, Yan JH, Xue H, Wu B, Dong F, Li WS, Ji FQ, Zhou DS. Conditioned medium from human amniotic epithelial cells may induce the differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells. *J Neurosci Res.* 2013; 91(7):978-86.
295. Yang Y, Zhang W, Li Y, Fang G, Zhang K. Scalded skin of rat treated by using fibrin glue combined with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Dermatol.* 2014; 26(3):289-95.
296. Ye Q, Zünd G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA, Turina M. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000; 17(5):587-91.
297. Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Shahidi NT, Yang NS. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(25):12140-4.
298. Yoshita T, Kobayashi A, Sugiyama K, Tseng SC. Oxygen permeability of amniotic membrane and actual tear oxygen tension beneath amniotic membrane patch. *Am J Ophthalmol.* 2004; 138(3):486-7.

299. Zabierowski SE, Fukunaga-Kalabis M, Li L, Herlyn M. Dermis-derived stem cells: a source of epidermal melanocytes and melanoma? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24(3):422-9.
300. Zhang CP, Fu XB. Therapeutic potential of stem cells in skin repair and regeneration. *Chin J Traumatol.* 2008; 11(4):209-21.
301. Zhang L, Tan X, Dong C, Zou L, Zhao H, Zhang X, Tian M, Jin G. In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *Int J Dev Neurosci.* 2012a; 30(6):471-7.
302. Zhang L, Ye JS, Decot V, Stoltz JF, de Isla N. Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes. *Biomed Mater Eng.* 2012b; 22(1-3):105-11.
303. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation.* 2005; 79(5):528-35.

PÁGINAS WEB

1. McGraw-Hill Medical, n.d. Access Medicina. La piel. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1538§ionid=102302563>.
2. Studyblue.n.d. Histo. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/histo-integument-shit/deck/7955194>.
3. Dreamstime. n.d. The Skin. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-sensory-receptors-skin-detailed-anatomy-beautiful-bright-colors-image49741056>.
4. B Braun Sharing Expertise. n.d. Cicatrización de heridas crónicas. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <https://www.bbraun.es/es/pacientes/cicatrizacion-de-heridas/que-saber-sobre-la-piel.html>.

Bibliografía

5. B.log.ia 2.0. 1 de Diciembre de 2015. El sistema tegumentario. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <http://b-log-ia20.blogspot.com.es/2015/12/el-sistema-tegumentario.html>.
6. Urgo Medical. 7 de Enero del 2018. Urgomedical healing people. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <http://www.urgomedical.es/understanding-together-2/skin-and-wound-healing/>.
7. Cells4Life. 12 de Diciembre del 2017. ¿Para qué sirven las células madre del tejido del cordón umbilical?. Consultada el día 26 de Agosto del 2017. Disponible en: <https://cells4life.es/blog/sirven-las-celulas-madre-del-tejido-del-cordon-umbilical/>