



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Regeneración de la Musculatura Lingual de Ratas
Hemiglosectomizadas mediante el Trasplante de
Células Madre Progenitoras derivadas de Músculo sobre
Matriz Acelular de Vejiga Urinaria de Cerdo**

D. José Lacal Luján

2019

AGRADECIMIENTOS

Son numerosas las personas que han aportado su pequeño, pero a la vez imprescindible grano de arena en el desarrollo y conclusión de este proyecto, de las cuales he tenido la suerte de aprender en el terreno profesional y personal.

Mención especial merece mi familia. Mis padres José y M^a Dolores, quienes gracias a su dedicación incondicional, sacrificio y educación han sido capaces de brindarme un hogar donde crecer, aprender, desarrollarme y equivocarme, y que hoy marcan los valores que me definen. A ellos les debo todos los logros que he conseguido. Mi hermana Maria, esencial e incansable pilar de mi vida, siempre presente en los buenos y malos momentos. También agradecer a aquellas personas que se marcharon pero que desde algún lugar están viendo cumplido este proyecto.

Agradecer al Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia, en especial a Juana M^a Garcia, Antonia Bernabeu, José Muñoz y Pilar Gonzalez gracias a los cuales he podido sumergirme en el fascinante mundo de las células, todo ello de forma amable y desinteresada. También al Servicio de Microscopía, de la mano de Maria Garcia, Francisco Asensio y Laura Guzmán, con los que aprendí la importancia de los minúsculos detalles.

Por último, aunque no menos importante, agradecer infinitamente a mis directores, el Prof. Dr. Fabio Camacho y la Dra. Nuria Garcia, la confianza depositada en mi para poder desarrollar esta tesis doctoral. Gracias por la entrega constante y por transmitirme la pasión por la investigación. Sin ellos no hubiera sido posible.

Gracias a todos de corazón...

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CASP8: Gen codificador de la casposa 8.

CAT: Célula de Amplificación Transitoria.

CCC: Cáncer de Cabeza y Cuello.

CCO: Cancer de Cavidad Oral.

CDKN2A: gen codificador inhibido de la 2A quintas dependiente de cíclica.

CME: Célula Madre Embrionaria.

CMM: Célula Madre Multipotencial.

CMPMEs: Células Madre Progenitoras derivadas de Músculo Esquelético.

CMPI: Células Madre Progenitoras inducidas.

CO₂: Dióxido de Carbono.

COCE: Carcinoma Oral de Células Escamosas.

DAPI: 4´6 Dimidino-2Fenilindol.

DCNa: Desoxicolato de Sodio.

DMEM: Dulbecco´s modified Eagle´s Medium.

E. coli: *Escherichia coli*.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraácetico.

EGFR: Receptor de Factor de Crecimiento Epidermoide.

FAT1: Protocaderino FAT 1.

FDA: Food and Drug Administration.

GAGs: Glucosaminoglucanos.

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory.

H-E: Hematoxilina-Eosina.

HB-EGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico ligado a Heparina.

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution. **IGF-1:** Factor de Crecimiento Insulínico 1.

IL6: Interleucina 6.

IL8: Interleucina 8.

ITRM: Ingeniería Tisular de Reparación Muscular.

Kg: Kilogramo.

MAVU: Matriz Acelular de Vejiga Urinaria.

MEB: Microscopio Electrónico de Barrido.

MEC: Matrix Extracelular.

μg: microgramo.

μg/cm²: microgramo por centímetro cuadrado.

μL: microlitro.

μm: micrómetro/micra.

MPEs: Músculos Paraespinales.

NDMA: Nitrodimetilamina.

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso.

NH₄OH: Hidróxido de amonio.

NNK: 4-metilnitrosamino 1,3-piridil 1-butanona.

NNN: Nitronornicotina.

NOTCH1: Gen codificador del receptor Notch1.

NaN₃: Azida de Sodio.

OGG1: 8-Oxoguanina-ADN-glucosilasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.**PDGF-BB:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-BB.

PCSI: Pequeña Capa Submucosa Intestinal.

PIK3CA: Subunidad Catalítica α de Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa.

PP1: PrePlating 1.

PVM: Pérdida Volumétrica de Músculo.

RD: Real Decreto.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

Rb: Retinoblastoma.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.

SFS: Suero Fisiológico Salino.

TAC: Tomografía Axial Computarizada.

TM: Tricrómico de Masson.

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α .

TNM: Estadiaje Tamaño-Nodulos linfáticos-Metástasis.

TP53: Gen p53 (Guardián del genoma).

U/mL: Unidades por mililitro.

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

x: Aumentos.

bFGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico b.

mL: mililitro.

mM: miliMolar.**min:** minuto/s.**mm³:** milímetros cúbicos.

nm: nanómetro.

pRb: proteína del Retinoblastoma.

rpm: revoluciones por minuto.

°C: grados Celsius.

RESUMEN

Objetivos: El principal objetivo de este estudio fue aplicar la ingeniería tisular para la reparación muscular (ITRM) en la regeneración de la musculatura lingual de ratas hemiglosectomizadas, mediante el trasplante de células madre progenitoras derivadas de músculo (CMPDMs) sobre matriz acelular de vejiga urinaria (MAVU) de cerdo.

Material y Métodos: A un total de 80 ratas macho adultas Lewis se les realizó un defecto homogéneo en el lado izquierdo de la lengua mediante una lesión con pérdida volumétrica de músculo (PVM). Las ratas fueron entonces randomizadas en cuatro grupos (n=20 por grupo): Grupo 1 (MAVU+ CMPDMs), Grupo 2 (MAVU), Grupo 3 (CMPDMs), y Grupo 4 (Control). Las CMPDMs para los Grupos 1 y 3 fueron obtenidos de los músculos paraespinales de una rata neonatal singénica. Los animales fueron pesados en el día 0 y en el momento de la eutanasia. Cinco ratas de cada grupo fueron sacrificadas los días 2, 14, 28 y 42 y sus lenguas fueron procesadas para análisis macroscópico morfométrico (porcentaje de la superficie del dorso lingual ocupado por PVM), peso postoperatorio de la hemilengua izquierda (diferencia en mg entre el peso del lado control–el peso del lado operado), y estudio histológico (grados de inflamación y fibrosis). **Resultados:** El orden de mayor a menor aumento de peso de los animales y presencia de nuevo tejido fue MAVU+CMPDMs > CMPDMs > MAVU > control, donde el grupo MAVU + CMPDMs mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en comparación con los otros tres grupos en los días 14, 28 y 42 para las dos variables. El orden de menor a mayor porcentaje de la superficie del dorso lingual ocupado por PVM, diferencia en mg entre el peso del lado control – el peso del lado operado, y los grados de inflamación crónica y fibrosis fue MAVU+CMPDMs > CMPDMs > MAVU > control, donde MAVU+CMPDMs mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto a los otros tres grupos en los días 2, 14, 28 y 42 para el porcentaje de la superficie del

dorso lingual ocupado por PVM, y para la diferencia en mg entre el peso del lado control – el peso del lado operado. **Conclusiones:** El uso de un constructo de MAVU porcina y CMPDMs para la regeneración de la musculatura lingual de ratas hemiglosectomizadas, ha resultado ser un tratamiento efectivo de ITRM para la reparación de lesiones con PVM.

SUMMARY

Objectives: The main objective of this study was to apply tissue engineering for muscle repair (ITRM) in the regeneration of the lingual musculature of hemiglosectomized rats, by transplanting muscle-derived progenitor stem cells (MDPSCs) on acellular of urinary bladder matrix (AUBM) of Pig

Material and Methods: A total of 80 adult Lewis male rats had a homogeneous defect on the left side of the tongue through a lesion with volumetric muscle loss (PVM). The rats were then randomized into four groups (n = 20 per group): Group 1 (MAVU + MDPSCs), Group 2 (MAVU), Group 3 (MDPSCs) and Group 4 (Control). The MDPSCs for Groups 1 and 3 were obtained from the paraspinal muscles of a syngeneic neonatal rat. The animals were weighed on day 0 and at the time of euthanasia. Five rats of each group were sacrificed on days 2, 14, 28 and 42 and their tongues were processed for morphometric macroscopic analysis (percentage of the surface of the lingual dorsum occupied by PVM), postoperative weight of the left hemitongue (difference in mg between the weight of the control side - the weight of the operated side), and histological study (degrees of inflammation and fibrosis).

Results: The order of greatest to lowest weight gain of the animals and presence of new tissue was MAVU+MDPSCs > MDPSC > MAVU > control, where the MAVU+MDPSCs group changes the statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in comparison with the other three groups on days 14, 28 and 42 for the two variables. The order from lowest to highest percentage of the surface of the lingual back occupied by PVM, difference in mg between the weight of the control side - the weight of the operated side, and the degrees of chronic inflammation and fibrosis was MAVU+MDPSCs > MDPSCs > MAVU > control, where MAVU+MDPSCs changed different differences ($p \leq 0.05$) with respect to the other groups on days 2, 14, 28 and 42 for the percentage of the surface of the lingual back occupied by PVM, and for the difference

in mg between the weight of the control side - the weight of the operated side.

Conclusions: The use of a porcine MAVU and MDPSCs construct for the regeneration of the lingual musculature of hemiglossectomized rats has proved to be an effective ITRM treatment for the repair of lesions with PVM.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)	1
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	1
1.3 ETIOPATOGENIA	3
1.4 CUADRO CLÍNICO	8
1.5 DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO	9
1.6 TRATAMIENTO	11
1.7 INGENIERÍA TISULAR	18
1.7.1 COMPONENTE CELULAR. CÉLULAS MADRE	19
1.7.1.1 Células Madre Progenitoras Derivadas de Músculo (CMPDMs)	23
1.7.2 COMPONENTE EXTRACELULAR. MATRIZ ACELULAR. MAVU	24
1.7.2.1 Preparación de la MAVU	26
1.7.2.2 Composición de la MAVU	28
1.7.2.3 Estructura tridimensional de la MAVU	29
1.7.2.4 Propiedades de la MAVU	30
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	33
2.1 JUSTIFICACIÓN	33
2.2 OBJETIVOS	38

2.2.1 OBJETIVO GENERAL	38
2.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
3. METODOLOGÍA	40
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	40
3.2 PREPARACIÓN DE LA MATRIZ ACELULAR DE VEJIGA URINARIA. MAVU	41
3.2.1 Procedimiento con el grupo control	43
3.2.2 Procedimiento con el grupo estudio. Preparación MAVU	45
3.3 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PROGENITORAS	
DERIVADAS DE MÚSCULO (CMPDMs)	50
3.3.1 Comprobación de la efectividad del cultivo de CMPDMs	57
3.3.2 Siembra de las CMPDMs sobre los discos de MAVU	58
3.3.3 Preparación del infiltrado a partir de suspensión de CMPDMs	59
3.4 LESIONES LINGUALES CON PÉRDIDA MUSCULAR VOLUMÉTRICA (PVM)	
(HEMIGLOSECTOMIAS)	59
3.5 GRUPOS EXPERIMENTALES	61
3.6 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS	62
3.7 EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DEL PESO DEL ANIMAL	62
3.8 ANÁLISIS MACRÓSCOPICO MORFOMÉTRICO DE LA REGENERACIÓN LINGUAL	63
3.9 INCREMENTO DEL PESO LINGUAL POSTOPERATORIO	64

3.10 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	64
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
4. RESULTADOS.	67
4.1 EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DEL PESO DEL ANIMAL	67
4.2 ANÁLISIS MACRÓSCOPICO MORFOMÉTRICO DE LA REGENERACIÓN LINGUAL	68
4.3 INCREMENTO DEL PESO LINGUAL POSTOPERATORIO	69
4.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	70
5. DISCUSIÓN	72
6. CONCLUSIONES	78
7. BIBLIOGRAFÍA	96
8. ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CARCINOMA ORAL DE CELULAS ESCAMOSAS (COCE)

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) supone el 5% de todos los cánceres diagnosticados. Las regiones anatómicas afectadas dentro de este grupo incluyen la cavidad oral, orofaringe, laringe, glándulas salivales y senos paranasales, pudiendo ser a su vez de origen epitelial, mesenquimal o hematolinfoide. El carcinoma de células escamosas es el tipo de CCC de origen epitelial más frecuente en un 90% de los casos (*Gubpta y cols., 2016*). En su forma de presentación bucal, el COCE representa del 2 al 4% del total de neoplasias, 2% en España según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y alrededor del 97% de todos los cánceres orales (*Weckx y cols., 2019*).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad estos datos representan un serio problema de salud pública con tendencia creciente en algunas regiones del mundo. Así pues, el cáncer de labio, de cavidad oral y el faríngeo son los responsables de más de 500.000 nuevos casos al año, 2/3 de los cuales tienen lugar en países desarrollados. En su conjunto suponen el 3,8% del total de cánceres diagnosticados en el mundo y se estima que en 2035 estas cifras de incidencia se eleven un 62% por los cambios demográficos proyectados (*Shield y cols., 2017*).

La incidencia global media se calcula en un 5,8 por cada 100.000 en hombres y en 2,3 por cada 100.000 en mujeres a pesar de un importante aumento en este último grupo, según las estimaciones del programa GLOBOCAN 2018 de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La edad constituye un factor predisponente de aparición de cáncer oral. Un gran porcentaje de los casos de COCE tiene lugar en población por encima de 50 años de edad, con un pico máximo de incidencia en el rango de 55-64 años y que supone cerca de un 30% del total (*Xu y cols., 2018*). Sin embargo estudios epidemiológicos revelan un cambio de dicha tendencia en las últimas dos décadas, con un incremento notable del 6% en la incidencia en adultos jóvenes entre los 18-45 años y no vinculados a factores de riesgo tan potentes como el tabaco o el alcohol (*Fan y cols., 2014*), lo que hace pensar en la implicación de otros agentes como son los genéticos inherentes o las infecciones víricas como el virus del papiloma humano (VPH) (serotipos 16 y 18) (*Ng y cols., 2016*). Algunos autores señalan un incremento de la incidencia de COCE de lengua, base de lengua y amígdala en adultos jóvenes que puede atribuirse al consumo creciente de tabaco y marihuana y a infecciones por VPH, mientras que otros concluyen de manera precisa en una evolución más agresiva de la enfermedad que deriva en un peor pronóstico en este grupo de población (*Shiboski y cols., 2005; Majchrzak y cols., 2014*).

Atendiendo a la mortalidad, existen ciertos aspectos a tener en cuenta. Por término medio la mortalidad del COCE se encuentra por debajo de la mitad del valor correspondiente a la incidencia. Se estima que en el año 2018 se registraron en el mundo 177.384 casos de muerte como consecuencia de la evolución del cáncer oral, que supuso una tasa de mortalidad estandarizada global del 2,3 por cada 100.000 habitantes para ambos sexos.

Las tasas de supervivencia del COCE, entendidas como el porcentaje de personas que sobrevive tras el diagnóstico de la enfermedad, también aportan una idea acerca de la dimensión del problema. En la actualidad se calcula una tasa de

supervivencia global y libre de enfermedad del 56 y 58% respectivamente, y en concreto del 55% si se tienen en cuenta únicamente los 5 años siguientes al diagnóstico (Ng y cols., 2016). No se evidencia en cambio un incremento significativo de dichos valores en los últimos años, a pesar de los grandes avances y perfeccionamiento de las diferentes modalidades terapéuticas. Dichos porcentajes disminuyen de forma considerable hasta el 30% si existen antecedentes de recurrencia local o a distancia (Wang y cols., 2013; Camisasca y cols., 2011). Por todo ello, los esfuerzos deben centrarse en la prevención y el diagnóstico precoz de una enfermedad en la que el estadiaje (clasificación TNM) va a determinar en gran medida la evolución y pronóstico del paciente.

1.3 ETIOPATOGENIA

El COCE se define según la OMS como una neoplasia maligna de origen epitelial, consecuencia de un proceso de carcinogénesis de los queratinocitos del epitelio de la mucosa oral. La exposición a algunos agentes mutágenos ya sean químicos, físicos y/o microbiológicos favorecen la aparición de alteraciones en la secuencia de ADN de la célula y determinan la transformación hacia un queratinocito sin control sobre la proliferación celular y con autonomía propia. El COCE presenta gran variedad de estadios de diferenciación de las células escamosas y se caracteriza por su elevada y temprana capacidad de invasión local a través de la membrana basal subyacente y posterior metástasis a ganglios linfáticos cervicales y otras localizaciones a distancia como el hueso, cerebro, hígado y pulmón.

En la actualidad se desconoce la etiología exacta del cáncer oral, si bien se sabe que el origen de la transformación de los queratinocitos (carcinogénesis) representa un

fenómeno multifactorial. No obstante, existen algunos factores claramente vinculados al desarrollo de la enfermedad ya sean exógenos, como el consumo de tabaco en sus diferentes variantes, el alcohol, infecciones localizadas de origen bacteriano, micótico o vírico, exposición a toxinas, exposición prolongada a la radiación ultravioleta, malnutrición; o bien endógenas como la edad, sexo, predisposición genética heredada, estados de inmunosupresión y antecedentes de lesiones precancerosas.

- TABACO. Adquiere un papel tan importante en la carcinogénesis como en el carcinoma de pulmón, laringe o vejiga. Se ha comprobado que la incidencia de cáncer oral es mayor en aquellas personas que han sido grandes fumadoras. Aproximadamente un 85% de los pacientes con COCE presentan un consumo de tabaco elevado (más de 40 cigarrillos al día) aumentando el riesgo de displasia del epitelio oral a medida que esta cantidad es mayor.

Los principales agentes carcinogénicos son las partículas de nicotina y el alquitrán, además de los gases que se originan durante la combustión como el monóxido de carbono. Sin embargo existen otros compuestos implicados en la carcinogénesis que han sido estudiados ampliamente por su elevado potencial, tales como las aminas volátiles, hidrocarburos aromáticos derivados del benzopireno, los benzoantracenos, y las nitrosaminas específicas del tabaco: la nitroso-nor-nicotina (NNN), la nitrosodimetilamina (NDMA) y el 4-metilnitrosamino-1-3-piridil-1-butanona (NNK) (*Khariwala y cols., 2013*).

Estas sustancias, que son generadas durante la combustión del tabaco, ejercen su acción sobre los queratinocitos de la mucosa oral siendo absorbidos no sólo de forma local sino también en otras regiones del organismo. La exposición prolongada ocasiona daños severos sobre el ADN de estas células, especialmente

sobre 6-metilguanina, que interviene en el proceso de replicación del material genético (*Shimizu y cols., 2019*).

La relación entre el hábito tabáquico y la región anatómica del cáncer oral no está claramente establecida, si bien se señalan algunas áreas con mayor frecuencia de aparición como la lengua, concretamente en el borde lateral y el suelo de la boca.

Otro aspecto a tener en cuenta es la permanencia del hábito durante el tratamiento. Estudios retrospectivos han demostrado que entre el 34 y el 57% de los pacientes continúan consumiendo alcohol y tabaco tras el diagnóstico de cáncer oral, condición que se asocia a una menor respuesta al tratamiento de radioterapia y quimioterapia, a una reducción significativa de la tasa de supervivencia y a un aumento considerable de la probabilidad de aparición de segundas neoplasias durante esta fase (*Ashok y cols., 2017*).

- ALCOHOL. Numerosos estudios epidemiológicos han comprobado que el consumo de alcohol, con independencia del tabaco, aumenta el riesgo de padecer cáncer oral. El riesgo se acentúa a medida que la cantidad ingerida es mayor, independientemente del tipo de bebida alcohólica. Se establece que el alcohol (etanol) ejerce su acción como iniciador o promotor, induciendo cambios degenerativos en las células epiteliales, tanto de forma directa afectando al componente lipídico que rodea al estrato espinoso, como de forma indirecta por los metabolitos resultantes como el acetaldehído. En resumen, permanece clara la acción carcinogénica del alcohol, sin embargo es muy frecuente el binomio tabaco-alcohol, al que se le atribuye el 80% de todos los casos de carcinoma de cavidad oral y orofaringe. El efecto sinérgico reside en la alteración previa de la barrera epitelial oral en combinación con una mayor disolución de los compuestos

carcinogénicos del tabaco, que propicia un contacto más íntimo (*Jethwa y cols., 2017; Kumar y cols., 2019*)

- INFECCION POR VPH. La asociación entre infección por VPH y carcinoma de cuello de útero está ampliamente aceptada por la comunidad médica, sin embargo, estudios epidemiológicos y moleculares recientes añaden evidencias de peso que afirman la participación del VPH, especialmente los serotipos 16 y 18, como factor de riesgo importante en la aparición de cánceres de cabeza y cuello. Algunos autores han encontrado cifras elevadas de asociación entre VPH y COCE que ronda el 70% de los casos, mientras que otros se muestran más discretos con un 20% de resultados positivos con PCR para ADN del VPH-16 en individuos afectados por COCE de la cavidad oral, si bien todos ellos defienden la influencia de otros factores (*Tanaka y Alawi, 2017; Pytynia y cols., 2014*). El binomio VPH-COCE suele caracterizarse por una aparición en edades tempranas (adultos jóvenes), ausencia de hábitos tóxicos como alcohol y tabaco y una fuerte vinculación a la práctica sexual, particularmente sexo oral (*El-Motfy, 2014*).

A nivel molecular se han identificado ciertos genes como el E6 y E7 presentes en el genoma vírico que tienen la capacidad de disminuir la oncosupresión. Las oncoproteínas codificadas E6 y E7, en especial la primera, se unen con gran afinidad al gen p53 y a retinoblastoma (Rb), induciendo su degradación y con ello desestructurando el mecanismo regulador de la proliferación celular descontrolada. La sobreexpresión de la oncoproteína E6 vinculada a la infección por el VPH-16 está fuertemente relacionada con el proceso de carcinogénesis, cuya detección en suero del paciente constituye una de las bases del diagnóstico precoz de cáncer de orofaringe (*Beachler y cols., 2016*).

- PREDISPOSICION GENÉTICA. El componente genético cumple un papel importante en el desarrollo del cáncer oral, hecho que se aprecia en pacientes adultos jóvenes no vinculados a factores de riesgo como el tabaco y el alcohol, en los cuales se exhibe un aumento significativo de la fragilidad en ciertos *loci* de la secuencia de ADN frente a la exposición a ciertos mutágenos. Algunos de los genes más susceptibles de sufrir estos polimorfismos hereditarios son TP53, CDKN2A, NOTCH1, CASP8, FAT1, PIK3CA, la mayoría de ellos localizados en el cromosoma 8. (*Gu y cols., 2018; Brunotto y cols., 2014*). Estudios epidemiológicos muestran un pronóstico más desfavorable en pacientes jóvenes por debajo de los 40 años de edad con COCE de lengua, en los que se evidenció un curso más agresivo de la enfermedad, invasión locorregional y recurrencia a largo plazo en comparación con pacientes de mayor edad. Los antecedentes familiares también deben ser considerados en la incidencia del COCE. Autores han demostrado un aumento sustancial del riesgo relativo de COCE si algún familiar de primer grado había sufrido previamente la neoplasia, particularmente si el inicio de la enfermedad había ocurrido antes de los 50 años de edad, en cuyo caso, el riesgo se multiplicaba por dos (*Paderno y cols., 2018; Cooper y cols., 1995*).
- LESIONES PRECANCEROSAS. En la etiopatogénesis del COCE se ha observado la existencia de lesiones previas caracterizadas por una alteración estructural o celular del epitelio de la mucosa oral. Definidas por la OMS, como aquellos tejidos con morfología alterada que presentan una mayor predisposición a sufrir una transformación neoplásica. Las lesiones precancerosas relacionadas con el COCE por excelencia son: la leucoplasia, la eritroplasia y la fibrosis oral submucosa. El liquen plano oral, incluyendo sus seis variantes y el lupus eritematoso discoide conforman los denominados estados precancerosos (*El Motfy, 2014*).

1.4 CUADRO CLÍNICO

El COCE suele debutar en presencia de una tumoración ulcerada e indurada o bien como una úlcera indolora, acompañada en gran número de casos de adenopatías cervicales.

El tamaño de las lesiones puede variar de unos milímetros a varios centímetros de diámetro. Las lesiones iniciales pueden pasar inadvertidas ya que en numerosas ocasiones son asintomáticas. En estadios tempranos, estas lesiones suelen tener un aspecto característico en forma de placa de color rojo (eritroplasia) o blanco (leucoplasia/eritroleucoplasia), en las cuales, un cambio en el color y la textura a la palpación orientarán hacia la sospecha de malignidad. A medida que evoluciona la neoplasia, se puede percibir la presencia de una lesión ulcerativa que aumenta de tamaño y que no remite con la eliminación del posible factor etiológico asociado. La sintomatología en esta etapa oscila desde una leve molestia hasta un dolor intenso sobre todo en regiones móviles como la lengua, hemorragia, parestesias, trismus y halitosis entre otros. Todas ellas constituyen características clínicas inconfundibles, que en la mayoría de los casos no plantean problema alguno en el establecimiento de un diagnóstico de malignidad, no obstante algunos casos de COCE, principalmente en estadios tempranos de evolución pueden inducir a error en el diagnóstico, y por ende en uno de los aspectos más importantes de cara al tratamiento como es el diagnóstico precoz (*Imagen 1*).

Atendiendo a la localización, el COCE puede instaurarse en cualquier región de la cavidad oral, si bien existen ciertas áreas en las que se observa una mayor incidencia. La mayor parte de los estudios de la literatura coinciden en la lengua como localización más frecuente, que en algunos casos alcanza el 75-80% de los casos de COCE (*Farquhar*

y cols., 2018; Manikandan y cols., 2014). Otros estudios en cambio arrojan valores de incidencia más discretos que oscilan entre un 30 y un 40,2% de entre todas las regiones de la cavidad oral (Ariyoshi y cols., 2008; Brandizzi y cols., 2008).



Imagen 1. Paciente con tumoración en borde lateral izquierdo de la lengua, con escasos meses de evolución, adenopatía en cadena ganglionar submandibilar bilateral, dolorosa a la palpación, de consistencia indurada y con lecho central ulcerado. Lesión compatible con COCE.

A la presentación en la lengua le sigue el suelo de boca, y en menor proporción la mucosa yugal, área retromolar, encía adherida y paladar blando. Las áreas menos afectadas incluyen el dorso lingual y el paladar duro. El labio en especial, alcanza un porcentaje importante de afectación en ciertas regiones geográficas con alta exposición solar anual.

1.5 DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

El diagnóstico de los pacientes con COCE comienza por una correcta y minuciosa exploración de la cavidad oral y de la región cervical. Cualquier lesión blanca

o roja, de tipo exofítico o ulcerativo que persiste durante más de 15 días tras la eliminación del posible factor etiológico debe considerarse como neoplasia hasta que no se demuestre lo contrario. Ante este tipo de lesiones está plenamente justificada la realización de una biopsia, que mediante su estudio histopatológico, confirmará o rebatirá el diagnóstico inicial de presunción. La muestra debe tomarse del área que se observe clínicamente más alterada, o bien de los bordes de la lesión donde se aprecia induración o infiltración a la palpación. Debe evitarse siempre la biopsia de tipo excisional. El resultado histopatológico típico del COCE muestra una proliferación en nidos, cordones o islotes neoplásicos que recuerdan en mayor o menor grado al epitelio escamoso del que derivan, penetrando en el epitelio conectivo a través de la membrana basal (invasión temprana).

Sin embargo en algunas ocasiones el diagnóstico definitivo del COCE precisa el apoyo de otras técnicas y procedimientos diagnósticos. La mayoría de autores coinciden en que el TAC y la RMN aportan información esencial de cara al establecimiento del estadiaje tumoral (TMN) previo al tratamiento como la extensión de la lesión, infiltración de grandes vasos y posibles metástasis regionales, facilitando en gran medida la planificación del tratamiento y el pronóstico de la enfermedad.

Entre otras técnicas que complementan el arsenal de pruebas diagnósticas, de forma reciente han cobrado importancia aquellas que trabajan con marcadores biomoleculares (EGFR, Ciclina, D1, Ki67, p53/p63 y pRb), sistemas ópticos de visualización no invasivos a través de luz quimioluminescente (ViziLite®), fluorescencia (VELscope™), o por citología exfoliativa que analiza las alteraciones en las células descamadas del epitelio oral (*Hanken y cols., 2013; Sambandham y cols., 2013*). El análisis de marcadores salivales presentes en la saliva también contribuye al

diagnóstico. Más de 100 biomarcadores salivales distintos pueden hallarse con valores incrementados en pacientes con carcinoma oral, tales como la *O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa*, citoquinas *IL-6* e *IL-8*, *TNF α* y la *8-oxoguanina-ADN-glucosilasa* (OGG1), como así señalan algunos estudios (*Cheng y cols., 2014*).

1.6 TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer oral es de carácter multidisciplinar. En él participan diferentes especialistas formando comités clínicos, en los cuales se planifica el tratamiento de la neoplasia de forma protocolizada. En la actualidad, las recomendaciones y el pronóstico se basan principalmente en la estadificación TNM tumoral, estado de los márgenes quirúrgicos, resultado de la biopsia intraoperatoria, presencia de metástasis en nódulos linfáticos regionales, y en algunos casos el carácter de diferenciación del tumor y la presencia de invasión perineural y perivascular.

En estos momentos el tratamiento de elección del COCE queda determinado por el estadio de evolución, el tamaño y la localización de la lesión. Así pues en neoplasias de etapa temprana (estadios I y II), el abordaje quirúrgico convencional, la cirugía mínimamente invasiva y la radioterapia con preservación funcional y anatómica de la región orofaríngea plantean resultados similares. En etapas más avanzadas (estadio III y IV) se recurre a modalidades no quirúrgicas mediante radioterapia y/o quimioterapia únicamente o bien cirugía resectiva con amplios márgenes de seguridad acompañada por radioterapia/quimioterapia coadyuvante (*Infante-Cossio y cols., 2015*). Sin embargo, la incorporación de la quimioterapia postoperatoria arroja cierta controversia. Mientras que algunos autores demuestran una mejora del control locorregional en pacientes de alto riesgo con resultado positivo de márgenes

quirúrgicos, otros estudios de seguimiento a largo plazo no demuestran un incremento significativo en la tasa de supervivencia y en la preservación funcional. Asimismo la quimioterapia está asociada a una toxicidad sistémica aguda o tardía y a elevadas tasas de morbilidad, frecuentemente relacionadas con una disfunción en la deglución (*Huang y cols., 2017*).

Sin embargo, a pesar del tratamiento existen altas tasa de neoplasias orales secundarias. Entre un 30 y un 47,4% de los pacientes tratados sufren al menos una recurrencia o un segundo tumor primario, por tanto son numerosas las investigaciones que avalan la importancia de examinar el área que rodea a la lesión de cáncer con el fin de evaluar los posibles riesgos y establecer un manejo satisfactorio de la enfermedad. Estudios celulares y moleculares demuestran que aquellas células genéticamente alteradas o dañadas penetran a lo largo de la mucosa, en el tejido clínica e histológicamente normal que se encuentra periférico a la lesión. Esta infiltración localizada tiene la capacidad de iniciar un nuevo proceso neoplásico y se piensa que puede ser el responsable de las elevadas tasas de recurrencia en localizaciones primarias del COCE, concretamente entre el 10 y el 30% (*Weckx y cols., 2019*).

En consecuencia, el protocolo de cirugía va encaminado a extirpar el área del COCE incluyendo un margen de seguridad de mucosa oral aparentemente sana, con objeto de incluir la infiltración perilesional. Aparecen dos tendencias quirúrgicas: un abordaje resectivo funcional, más conservador, el cual intenta tomar unos márgenes de seguridad tan reducidos como sea posible, lo que se traduce en una mayor probabilidad de resultado positivo en márgenes quirúrgicos tras la intervención y en un mayor riesgo de recurrencia; o bien, optar por una cirugía ablativa más agresiva con amplios márgenes, que implica severas complicaciones estéticas y funcionales, sobre

todo en localizaciones como la lengua, presentación más frecuente dentro de la cavidad oral.

Los pacientes con COCE de lengua en concreto, requieren tratamientos quirúrgicos a menudo mutilantes que van desde incisiones moderadas de mucosa y tejido muscular a hemiglosectomias y en algunos casos a glosectomias totales. La técnica de incisión amplia consiste en la extirpación de la totalidad de la lesión tomando márgenes de mucosa de alrededor de 1,5 cm desde el área afectada visible y palpable, realizando las incisiones en profundidad (*Imágenes 2 y 3*).



Imágenes 2 y 3. Intervención quirúrgica de COCE de lengua. Excisión, rotación de los bordes hacia la línea media y sutura longitudinal convencional.

Por otro lado, la hemiglosectomía constituye un tratamiento más agresivo y se realiza practicando una incisión longitudinal desde el vértice lingual hasta el agujero ciego, abarcando en profundidad desde el pilar anterior del velo del paladar hasta el suelo de la boca. El músculo geniogloso es desinsertado de la mandíbula, los músculos estilogloso, hiogloso, faringogloso, palatogloso, amigdalogloso, longitudinal inferior, longitudinal superior y transversos seccionados y la arteria lingual ligada. Finalmente el defecto quirúrgico puede suturarse de dos formas: mediante una rotación en sentido posterior de del vértice lingual y unión al borde remanente posterolateral de la base, o bien a través de una sutura longitudinal en sentido anteroposterior uniendo los bordes quirúrgicos dorsal y ventral de la herida (*Montinero y Boston, 2013*).

La glosectomía total se reserva para casos de COCE con un estadiaje más avanzado. Dicha intervención implica la resección completa del órgano lingual, preservando en la mayoría de casos la epiglotis y el hueso hioides y suele ir acompañada de un vaciamiento cervical radical donde se lleva a cabo linfadenectomía de todos los niveles ganglionares de la región, extirpación de la glándula submandibular, la porción inferior de la parótida, nervio accesorio, vena yugular interna y músculo esternocleidomastoideo (*Figuras 1 y 2*).

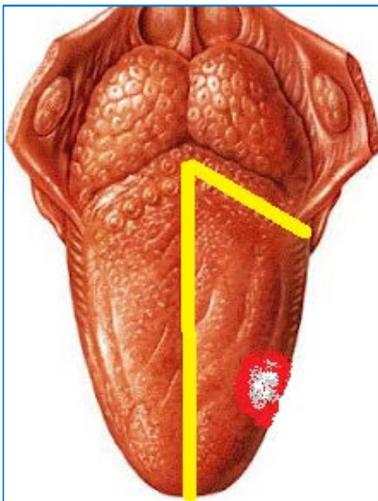


Figura 1. Incisiones practicadas en la técnica de hemiglossectomía.
Sobotta. Anatomía Humana 22^º ed

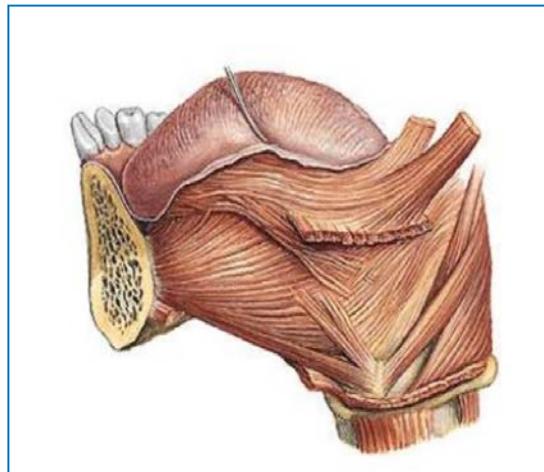


Figura 2. Musculatura afectada en la hemiglossectomía. Sobotta. Anatomía Humana 22^º ed

Las consecuencias postquirúrgicas derivadas de dichos procedimientos son devastadoras y afectan a la mayoría de las funciones como la fonación, la deglución, la masticación y la respiración, además de conllevar un elevado riesgo de broncoaspiración de sólidos por aumento de la permeabilidad de las vías aéreas superiores, y con ello un considerable impacto negativo en la calidad de vida de estos pacientes. Por todo ello, la reconstrucción de los defectos quirúrgicos se torna indispensable y debe hacerse de manera inmediata a la resección del tumor. En este sentido, aparece la cirugía reconstructiva entendida como tal, aquella cuyo objetivo es

la restitución de la anatomía lingual, y en la medida de lo posible, la funcionalidad del órgano (*Tong y cols., 2016*).

Las opciones reconstructivas del defecto lingual deben por tanto tener en cuenta dos aspectos: mantener la movilidad del órgano y proporcionar volumen. Conseguir estética en este procedimiento comporta un papel secundario. Así pues, en glosectomías que involucran en torno al 30-50% del volumen de la lengua, se hace especial hincapié en mantener la movilidad del tejido restaurado mediante injertos o colgajos pediculados (*Infante-Cossio y cols., 2015*). Entre estos colgajos locorreregionales, el colgajo de isla de paladar, el submental y el miomucoso buccinatorio constituyen opciones ideales para la reconstrucción de defectos orofaríngeos de reducido tamaño. Por otro lado, cuando el volumen remanente tras la resección es inferior al 30% respecto del original, la tendencia restauradora se desplaza hacia una preservación del volumen para facilitar la deglución y proteger la permeabilidad de la vía aérea. La técnica quirúrgica elegida en estos casos son los colgajos libres microvascularizados.

En general, la cirugía de colgajos libres microvascularizados es considerada el patrón de oro en la reconstrucción de defectos severos en cabeza y cuello, con una tasa de éxito que se sitúa entre el 85-95% (*Marttila y cols., 2018*). El colgajo ideal debe poder restaurar las funciones principales de la lengua mediante el manejo de distintos fascículos musculares en conjunto con áreas cutáneas, además de un cierto potencial de reinervación sensitiva y motora. Según esto, el cuerpo del colgajo debe tener un tamaño y la flexibilidad que aseguren el contacto con la red vascular receptora, un calibre adecuado de los vasos incluidos en él que favorezca la anastomosis y la disponibilidad de un nervio cutáneo, en los casos en los que se busca la reinervación. Otros criterios a tener en cuenta están relacionados con el área donante, la cual debe

tener la suficiente cantidad de tejido para permitir la toma del colgajo, además de posibilitar un cierre primario de la herida quirúrgica de manera sencilla asegurando una mínima morbilidad.

En los últimos 30 años, la cirugía microquirúrgica ha evolucionado de forma considerable dando lugar a los diferentes tipos del colgajos para la reconstrucción de defectos linguales en el intento de mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados. El más utilizado es el colgajo libre radial de antebrazo en sus distintas variantes seguido del colgajo libre anterolateral (*Imágenes 4-7 y Figura 3*).

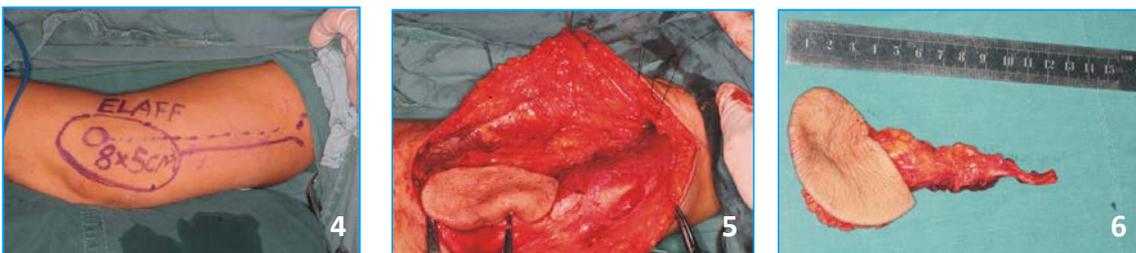


Imagen 4. Diseño del colgajo libre radial de antebrazo. **Imagen 5.** Disección y extracción cuidadosa del injerto.

Imagen 6. Presentación del colgajo libre extraído en el que se observan el pedículo vascular preparado para anastomosis. Fuente: Yang XD, Zhao SF, Zhang Q, Wang YX, Li W, Hong XV et al. Use of modified upper arm free flap for reconstruction of soft tissue defect after resection of oral cancer. *Head Face Med* 2016;12:9.

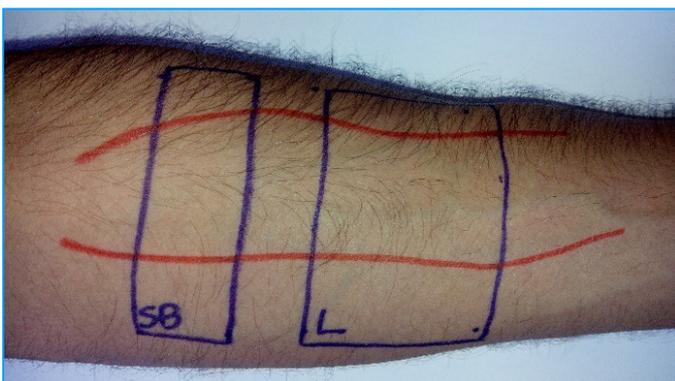


Imagen 7. Colgajo libre radial de doble paleta cutánea

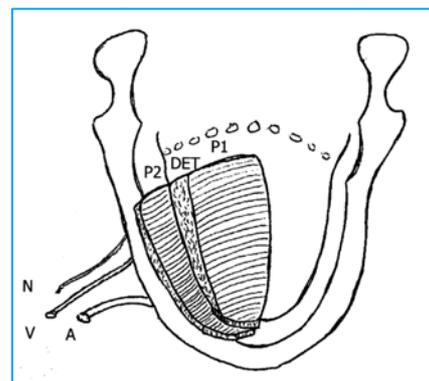


Figura 3. Reconstrucción lingual mediante injerto. Fuente: Acosta-Feria M, Infante Cossio P, García Perla B, Torres Carranza E, Belmonte Caro R. Colgajo libre radial de doble paleta cutánea para la reconstrucción de lengua y suelo de boca. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2006;28:287-94.

Otras técnicas que proporcionan volumen al tejido sano remanente son el colgajo miocutáneo recto abdominal, latissimus dorsi miocutáneo, pectoral mayor, y colgajo en isla del músculo trapecio.

Sin embargo, la disposición y complejidad de las fibras musculares que componen la lengua junto con el extraordinario rango de movimientos que presenta, hacen de la restauración completa uno de los grandes retos de la cirugía oral y maxilofacial. En la actualidad, los esfuerzos de las técnicas reconstructivas van encaminados a la mera preservación volumétrica y a una movilidad aceptable del muñón residual tras la hemiglosectomía. Por todo ello, los colgajos vascularizados e inervados se encuentran todavía lejos de conseguir la restauración total de la lengua original, pues cuentan con una serie de inconvenientes como: la pérdida de volumen a largo plazo debido a la atrofia progresiva del injerto y el colapso en el suelo de boca por efecto de la gravedad (que en el mejor de los casos proporcionan al paciente un movimiento exclusivamente unidireccional y una reinervación y revascularización incompletas). La necesidad de un área extraoral donante que requiere ablación quirúrgica, con las complicaciones que ello conlleva, son algunos de los efectos no deseados derivados de la intervención. Como resultado, los pacientes obtienen una mejora de las funciones como la deglución, la fonación y la protección de la vía aérea, aunque en un grado subóptimo (*Copelli y cols., 2017*).

La literatura científica también ha descrito nuevos avances y líneas de investigación. Entre estos, el trasplante total de lengua, como el realizado por *Haughley y cols.* (*Haughley y cols., 1999*), presentándose como alternativa en la reconstrucción de defectos linguales. En el estudio se evaluó el éxito del trasplante alogénico microneurovascular de lengua en 10 animales de experimentación, y aunque los

resultados histológicos evidenciaron una reinervación de los nervios hipogloso y lingual, junto con una preservación muscular y del estroma epitelio-conectivo, únicamente un 50% de los casos experimentaron una recuperación clínica y funcional satisfactoria. A la luz de estos resultados, cabe pensar en una posible aplicación en humanos, sin embargo los problemas de rechazo inmunológico derivados del alotrasplante hacen inviable esta opción terapéutica.

No obstante, es otra tendencia terapéutica la que arroja un futuro prometedor en el tratamiento reconstructivo de dichos defectos, minimizando tanto las consecuencias quirúrgicas derivadas de los injertos y colgajos, como el rechazo inmunológico inherente a los trasplantes, bien sean alogénicos o xenogénicos. Aparece por tanto la ingeniería tisular como una alternativa de peso a dichas opciones reparadoras. Si bien los resultados obtenidos que aparecen en la bibliografía científica son alentadores, continúa siendo un campo dentro de la medicina en vías de experimentación.

1.7 INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería tisular o medicina regenerativa es el área científico-médica basada en el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular y creación de sustitutos biológicos para su posterior implantación en el organismo vivo, con el objetivo de reparar o reemplazar la anatomía y función de un órgano o tejido. Aparecen dos pilares básicos sobre los cuales se sustenta la ingeniería tisular, a saber, el aislamiento, cultivo y expansión de poblaciones celulares aisladas, determinadas por el tipo de tejido a regenerar y por otro lado, el uso de andamiajes o *scaffolds*

biocompatibles, encargados de proporcionar el medio adecuado para el desarrollo y diferenciación celular.

1.7.1 COMPONENTE CELULAR. CÉLULAS MADRE

Los incesantes esfuerzos en la investigación de células madre en las últimas décadas, han desvelado diferentes características que hacen de estas líneas celulares una herramienta esencial en la regeneración de tejidos (*Seetharaman y cols., 2019*):

- Indiferenciación: las células madre no poseen rasgos fenotípicos presentes en las células diferenciadas de los tejidos del organismo adulto, característica que se hace patente sobre todo a nivel morfológico.
- Autoperpetuación: las células madre poseen la capacidad proliferar y expandirse mediante divisiones mitóticas que dan lugar a nuevas células de características idénticas. Con los estímulos necesarios, las células madre presentes en un tejido, pueden mantener constante la población o incrementarla, para hacer frente a las necesidades específicas, incluida la regeneración tisular.
- Potencialidad: existen ciertas señales que de forma natural o reproducidas en estudios experimentales *in vitro* hacen abandonar el estado de indiferenciación de una célula madre para transformarse en cualquier tipo de célula que integra el tejido de un organismo adulto.

Así pues, en función de la potencialidad de diferenciación de las células madre en diferentes líneas celulares, se pueden distinguir diferentes tipos (*Bozdog y cols., 2018*):

- CÉLULAS MADRE TOTIPOTENTES. Aparecen en estadios iniciales del desarrollo del embrión, concretamente en el proceso de segmentación del óvulo

fecundado. Poseen la capacidad de formar un organismo completo por si mismas, ya que pueden derivar tanto en células embrionarias de cualquier hoja blastodérmica (endodermo, mesodermo y ectodermo) como en células extraembrionarias (placenta, corion, alantoides y saco vitelino).

- **CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES.** Su potencialidad se limita a cualquier tipo celular perteneciente a las tres hojas blastodérmicas embrionarias ya mencionadas.

Dentro de estas células troncales a su vez aparecen:

- Células Madre Embrionarias (CME) que son obtenidas de la masa celular interna del blastocisto, originado en la etapa temprana de desarrollo embrionario. A pesar de su alta capacidad de diferenciación y autorrenovación que le otorgan un papel importante en el tratamiento eficaz de diferentes patologías como degeneración macular, diabetes, y daño de tejido nervioso en médula espinal como muestran algunos estudios (*Watson y cols., 2012*), no esta exento de complicaciones. La posibilidad de rechazo inmunológico al tratarse de un injerto alogénico, la dificultad de “guiar” la diferenciación hacia las diferentes líneas celulares de forma completamente eficaz, la alta probabilidad de desarrollo de teratomas en el organismo implantado y los aspectos éticos derivados de la obtención en el embrión son algunas de las barreras en el tratamiento de la regeneración mediante CME.

- Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPi) reconocidas por los estudios de Pessôa y cols. en 2006 (*Pessôa y cols., 2006*) ofrecen un gran potencial terapéutico en medicina regenerativa. Se obtienen a través de la reprogramación de células somáticas obtenidas del mismo organismo adulto

mediante transformación epigenómica. La integración de 4 factores de transcripción (Otc3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc) con la ayuda de diferentes técnicas (transformación retroviral, integración lentiviral o utilización de vectores episomales) dotan a la célula somática de un estado pluripotencial inducido idéntico al que posee una célula madre (*Pimentel y Murcia., 2017*). Sin embargo, las secuencias génicas introducidas de forma permanente en las CMPis pueden dar lugar a alteraciones como la reactivación del protooncogen c-Myc, hecho que se traduce en un aumento del riesgo en el desarrollo de una neoplasia.

- **CÉLULAS MADRE MULTIPOTENTES.** La potencialidad de la célula madre queda reducida exclusivamente a la hoja blastodérmica a la que pertenece, bien sea endodermo, mesodermo o ectodermo. Las células multipotentes por excelencia son las células madre mesenquimales (CMM) que pueden ser aisladas de diferentes tejidos como el adiposo, muscular, médula ósea y de cordón umbilical. Representan poblaciones celulares de morfología similar al fibroblasto cuando son cultivadas *in vitro*, cuyo propósito es la de conservación del tejido en el que residen mediante división asimétrica concediendo a una célula progenitora idéntica y a otra célula de amplificación transitoria (CAT), la cual sufrirá numerosos procesos de mitosis con el fin de expandir la población celular. En ocasiones las CATs se transforman en células postmitóticas, las cuales sufren únicamente un proceso de diferenciación hacia células terminales, aboliéndose en ellas la mitosis como mecanismo de protección frente a divisiones celulares continuas y posibles fenómenos neoplásicos. Dicho potencial de diferenciación engloba numerosas estirpes celulares del mesodermo incluidos adipocitos, mocitos, condrocitos y osteoblastos. Por otra parte, algunos estudios han demostrado funciones adicionales como la inmunomoduladora y la

actividad angiogénica de las CMMs a través de la secreción de diferentes factores, que aportan resultados muy favorables en ensayos clínicos centrados en el tratamiento de enfermedades de entidad inflamatoria, cardiovascular o que cursan con daño severo de tejido nervioso, cartílago y hueso (Fu y cols., 2016; Squillaro y cols., 2016) (Figura 4).

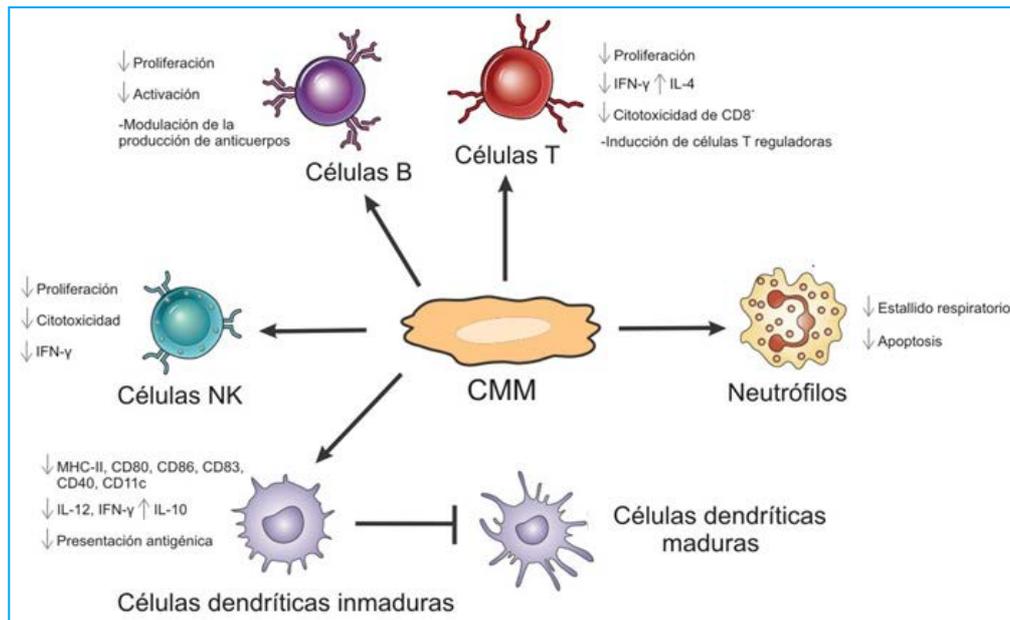


Figura 4. Actividad inmunomoduladora de las CMMs. Fuente: Miranda Rodríguez A, Galván Cabrera J, de León Delgado J. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter. 2015; 31(1):20-31.

En resumen, las células madre pueden diferenciarse en diversos tipos de células en función de ciertas situaciones o estímulos (ligandos o factores de crecimiento) que se originan en los tejidos en que habitan. De ello cabría esperar, que el trasplante de ciertas células madre en tejidos dañados o anómalos puede suponer un procedimiento sencillo en el tratamiento de numerosas patologías, sin embargo se contemplan serias dificultades en la manipulación de dichas células, sobre todo relacionadas con la expansión *ex vivo* de estas poblaciones y con la pobre viabilidad celular conseguida en

el tejido u órgano receptor. Aparecen dos factores añadidos dentro de la ingeniería tisular como son los ligandos y la matriz extracelular, que componen el llamado “nicho” o entorno extracelular, indispensable para la supervivencia de la célula madre y con el cual establece una compleja interacción mediante señales estructurales, eléctricas y bioquímicas.

1.7.1.1 Células Madre Progenitoras Derivadas de Músculo (CMPDMs)

En el presente estudio se escogieron las células madre progenitoras derivadas del músculo esquelético (CMPDMs) como línea celular encargada de la regeneración tisular mediante su cultivo y posterior diferenciación en las diferentes estirpes del tejido dañado. Así pues, con las señales extracelulares adecuadas, las CMPDMs pueden llegar a diferenciarse en mioblastos, osteoblastos, condroblastos e incluso en células hematopoyéticas y neurales. Entre las ventajas que aportan las CMPDMs sobre otras poblaciones se encuentran el acceso relativamente sencillo al tejido en que residen (músculo esquelético), el requerimiento de una cantidad reducida de tejido muscular para su obtención y la sencillez en el procedimiento de aislamiento y expansión *ex vivo*. Por otro lado la presencia de estas células progenitoras en el organismo adulto (aunque en menor proporción que en el embrión y posterior neonato) brinda la oportunidad del tratamiento autólogo de lesiones de diversa índole, eliminando por completo la posibilidad de cualquier rechazo por el sistema inmune del individuo (Lavasani y cols., 2013).

1.7.2 COMPONENTE EXTRACELULAR. MATRIZ ACELULAR. MAVU

El otro pilar, la matriz extracelular (MEC), se compone del entramado o andamiaje físico construido por las propias células mediante la secreción de diversas proteínas. Sin embargo, el papel que desempeña no es únicamente el de soporte de forma pasiva, sino que también regula el comportamiento de las células en una relación de reciprocidad dinámica descrita por Bornstein y Sage en 2002 (*Bornstein y Sage, 2002*). La MEC juega un papel crítico en la viabilidad y diferenciación de las células madre en virtud de propiedades intrínsecas como la composición proteica, disposición de receptores para ligandos celulares, y físicas como la elasticidad y rigidez. Aunque el estudio simultáneo *in vitro* de todas estas propiedades resulta de gran complejidad, existen numerosos estudios que examinan de forma aislada algunas de ellas, arrojando resultados prometedores, así pues Huebsch y cols. (*Huebsch y cols., 2015*) afirman la existencia de vías de mecanotransducción íntimamente relacionados con el módulo de elasticidad de la MEC, que guían la diferenciación en osteoblastos y regeneración ósea; Sung y cols. (*Sung y cols., 2018*) demostraron una estrecha relación entre de las propiedades mecánicas del entorno y la viabilidad de CMEs mediante la creación de cápsulas de gelatina coloidal y Arshi y cols. (*Arshi y cols., 2013*) llegaron a la conclusión de que sustratos con elevada rigidez favorecían la diferenciación de CMEs en cardiomiocitos en un estudio en ratones.

Bajo el nombre de integrinas se engloban a un conjunto de receptores de superficie de membrana, a través de los cuales la célula interactúa con los componentes de la MEC. Dichos receptores están involucrados en procesos celulares tan importantes como la expansión, adhesión, migración y diferenciación y transfieren

señales químicas y mecánicas a la célula en cuestión. La naturaleza y número de integrinas son específicas de cada célula y tejido (*Figura 5*).

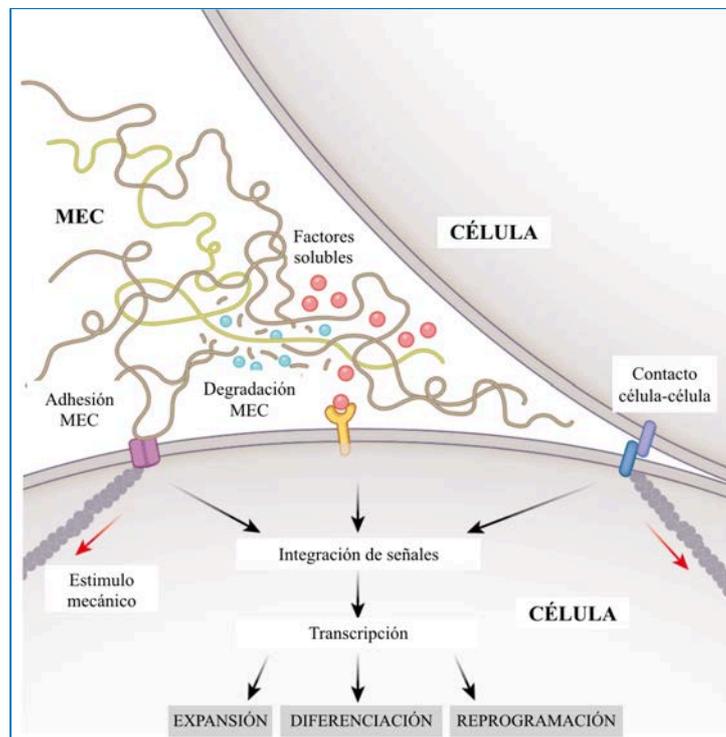


Figura 5. Interacción de la célula madre con el microentorno o nicho.
Fuente: Madl C, Heilshorn S, Blau H. Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature* 2018;557:335-41.

Centrando la atención en los andamiajes biológicos obtenidos de matriz extracelular (MEC) xenogénica, aparecen referencias de su utilización de manera satisfactoria en estudios animales preclínicos y en aplicaciones clínicas en humanos para la reconstrucción de una gran variedad de tejidos musculares incluyendo esófago, miocardio, túnica muscular de vasos sanguíneos, pero especialmente músculo esquelético. Los mecanismos responsables de la respuesta remodeladora continúan sin ser esclarecidos hasta la fecha. Se piensa que intervienen diferentes procesos de reclutamiento de células pluripotenciales y diferenciadas, angiogénesis, neoformación de tejido nervioso que originan una aposición estructurada de tejido y una rápida

degradación de la MEC implantada (*Kochupura y cols., 2005; Ota y cols., 2017; Valentin y cols., 2010; Badylak, 2004*).

Desde sus inicios en el campo de la medicina regenerativa, se han propuesto numerosas variantes de matriz acelular, en función del tejido originario, como son la derivada de submucosa intestinal: *Surgisis*®, *Stratasis*® (Cook, Estados Unidos), *Oasis*® (Healthpoint, Estados Unidos); o aquellas de origen dérmico: *Alloderm*® (BioHorizons, Estados Unidos), *DermaMatrix*® (Synthes, Estados Unidos) y *SurgiMend*® (TEI Biosciences, Estados Unidos) entre otras. Sin embargo, aplicaciones más recientes en la materia han encontrado en otros órganos un importante y eficaz reservorio de matriz acelular como es el caso de pulmón, hígado, riñón y vejiga urinaria.

Concretamente, la matriz extracelular obtenida de vejiga urinaria porcina, representa un excelente andamiaje para la regeneración tisular, según demuestran numerosos estudios de la literatura. Esto es debido a las espléndidas propiedades que brinda: su carácter acelular evita cualquier tipo de respuesta inmunitaria de rechazo del injerto por parte del organismo receptor, adecuada estabilidad dimensional y resistencia mecánica, la presencia de diversas moléculas como proteínas de adhesión celular (colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos, glucosaminoglucanos, elastina y fibrina) y gran número factores de crecimiento y enzimas. Estas características hacen de la Matriz Acelular de Vejiga Urinaria (MAVU) un andamiaje de soporte celular que acelera y favorece la regeneración de defectos tisulares, entre ellos el músculo esquelético (*Pokrywczynska y cols., 2015*).

1.7.2.1 Preparación de la MAVU

Las primeras referencias de la MAVU en la literatura científica y de los métodos empleados para su obtención a partir de la vejiga urinaria porcina datan de 1975 por

Meezan y cols. (*Meezan y cols., 1975*). Desde entonces se han propuesto numerosas técnicas de preparación basadas en ligeras modificaciones que los distintos autores han ido aplicando, hecho que demuestra la viabilidad y eficacia de la matriz.

El procedimiento para la obtención final de la MAVU puede dividirse en tres fases: mecánica, física y bioquímica o enzimática. En los primeros pasos se lleva a cabo un desbridamiento mecánico de las capas histológicas adyacentes en contacto con el estrato de interés, la lámina propia. De este modo se separan y descartan las túnicas adventicia, muscular y mucosa con una tracción consistente pero cuidadosa, disecando la capa histológica en cuestión. La segunda fase somete a la MEC a un proceso físico de enfriamiento, liofilización y cambios de presión que inician la descelularización por choque térmico y la consiguiente lisis celular. La fase enzimática prosigue con la aplicación de diferentes reactivos: Azida de sodio (NaN_3), Desoxicolato de sodio (DCNa), DodecilSulfato sódico (SDS), soluciones hiper e hipotónicas, Tritón X-100 e Hidróxido de amonio (NH_4OH), que completan la descelularización con una reacción más agresiva sobre el componente celular. El protocolo finaliza con el examen histológico (tinción con Hematoxilina-Eosina) e inmunohistoquímico (anticuerpos frente a α -*actina*) que dictaminan la acelularidad de la matriz resultante.

Sin embargo, existe evidencia de alteración de la estructura nativa de la MEC durante el procedimiento, dependiendo de la técnica empleada, en cualquiera de las tres fases. Se ha demostrado que la dirección en la que se desbridan las diferentes túnicas (fase mecánica) cumple un papel crucial en la preservación de la estructura reticular de la MEC y con ello, la conservación de las propiedades mecánicas intrínsecas. El colapso de la retícula fibrilar provoca no solo un mal comportamiento

estático y dinámico en el tejido receptor, sino que también dificulta seriamente la capacidad de adhesión celular.

1.7.2.2 Composición de la MAVU

La MAVU se compone esencialmente de colágeno, elastina, laminina, fibronectina, glucosaminoglicanos (GAGs) y diversos factores de crecimiento. Algunos ensayos en animales de experimentación y clínicos revelan la similitud existente entre la MAVU obtenida de rata, porcina y humana, si bien esta coincidencia es aun mayor entre las dos últimas, las cuales presentan mayor componente elástico. El colágeno aparece en sus diferentes variantes (tipo I, II, III y IV), siendo el tipo I y IV el predominante en la especie porcina (*Chun y cols., 2007; Farhat y cols., 2006*), principales responsables de la distribución de fuerzas en la vejiga urinaria y por tanto en la MAVU (*Badylak y cols., 2004*). Se confirma la presencia de laminina y fibronectina, con una ligera reducción cuantitativa asociada al procedimiento de descelularización. La primera cumple un papel esencial en el fenómeno de adhesión celular al colágeno tipo IV a la vez que estimula la neovascularización por inducir la diferenciación de las células progenitoras a endoteliales. La fibronectina por otro lado, favorece la integración y proliferación de la población celular implantada en la estructura reticular.

En cuanto a los factores de crecimiento presentes en la MAVU, aparecen dos tendencias dependiendo de su procedencia. El origen endógeno queda demostrado con la presencia de factores de crecimiento que permanecen en la matriz tras la descelularización. Sin embargo, no se puede determinar la distribución homogénea ni la cantidad exacta remanente, pues se piensa que su actividad queda bloqueada por los procesos físicos y químicos aplicados a la MEC, que inducen la desnaturalización

proteica de dichos factores. Otra tendencia, es la incorporación de factores de crecimiento de origen exógeno. Uno de los mas estudiados es el bFGF (Factor de crecimiento fibroblástico). Aplicado de forma muy sencilla mediante la rehidratación de la MAVU liofilizada por inmersión en suero de bFGF, demuestra un aumento de la actividad angiogénica, indispensable en el fenómeno de regeneración, según demostraron Youssif y cols. (*Youssif y cols., 2005*). Otros factores ampliamente estudiados son el HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos), PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB), IGF-1 (factor de crecimiento insulínico 1), HB-EGF (factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y NGF (factor de crecimiento nervioso). Es sabido que la adición de dichos factores a la MAVU incrementa la angiogénesis, neovascularización y reinervación en los tejidos receptores, no obstante la limitada capacidad de unión a la matriz y su corto periodo de actividad en comparación a aquellos de carácter endógeno explican la falta de evidencia científica que demuestre resultados significativamente superiores de MAVU + bFGF *versus* MAVU (*Chen y cols., 2011*). A pesar de las ventajas que aportan, la reducida vida media, la rápida e incontrolable difusión en la MAVU y el desconocimiento de la dosis óptima propician el desvío de los esfuerzos en investigación en favor de las poblaciones celulares que repueblan la MAVU.

1.7.2.3 Estructura tridimensional de la MAVU

La microestructura de la MAVU se compone de un entramado fibrilar con espacio irregular disperso (*Li y cols., 2016*) en la que se diferencian claramente dos caras bajo microscopio electrónico de barrido. La cara superior, en contacto con la membrana basal que sustentaba el epitelio de transición previo a la descelularización,

presenta una alta densidad reticular. En la cara inferior, que corresponde a la lámina propia, aparece una redícula menos densa, compuesta fundamentalmente por colágeno, lugar en donde residen las cualidades que favorecen la integración y proliferación de las células implantadas. El tamaño de los espacios intra-reticulares, comporta un papel fundamental en dicha capacidad y se ve afectado por las diferentes técnicas de obtención de la MAVU. Espacios demasiado grandes dificultan la repoblación celular, debido a un descenso en la proporción superficie-volumen que implica baja densidad de ligandos. Se ha confirmado que la incorporación de algunos compuestos como el ácido hialurónico disminuyen el tamaño de los poros en la malla fibrilar, favoreciendo la adhesión celular (*Pokrywczynska y cols., 2015*). En el otro extremo, una gran reducción del tamaño de los espacios intra-reticulares, conlleva una impermeabilidad que dificulta la difusión de la suspensión celular y factores de crecimiento.

1.7.2.4 Propiedades de la MAVU

Aunque la densidad de la estructura reticular de la MAVU difiere de la matriz extracelular nativa, la porción fibrilar se mantiene prácticamente invariable a nivel cuantitativo y cualitativo. El colágeno, constituyente mayoritario, determina las propiedades mecánicas de la matriz acelular dependiendo de la proporción y tipo presentes. El colágeno tipo I y IV preservados dotan a la MAVU de un módulo elástico similar al presente en la vejiga urinaria, si bien algunos autores han obtenido valores 3 veces superiores en favor de la matriz procesada (*Dahms y cols., 1998*). Aún así se mantiene por debajo de la MAVU de rata, con un mayor contenido de colágeno tipo I y menor presencia de fibras elásticas. La implantación de varias capas de MAVU no parece aumentar de forma significativa la resistencia a fuerzas tensiles (*Eberli y cols.,*

2011). Dichas propiedades mecánicas pueden verse afectadas por los diversos procedimientos previos a la implantación como la liofilización, esterilización y almacenaje. Con la liofilización se confirma un aumento de la impermeabilidad que dificulta a nivel microscópico la rehidratación y manipulación de la matriz, y a escala microscópica la difusión de la suspensión celular través del andamiaje. La esterilización también influye de forma directa. De los diferentes métodos existentes: óxido de etileno, radiación gamma y bombardeo con electrones, se confirma una preservación de las cualidades mecánicas con ciclos templados de óxido de etileno. El tratamiento con radiación y bombardeo de partículas, conlleva una reducción en la resistencia a fuerzas de tracción. Por otro lado, un tiempo de almacenamiento superior a los 12 meses parece tener un impacto directo sobre la resistencia del biomaterial, aunque sin evidencias significativas al respecto (*Freytes y cols., 2006*). En definitiva, tanto los protocolos de descelularización como los de procesado posterior deben ser tenidos en cuenta, ya que afectan a las propiedades biomecánicas de la MAVU, responsables directas de su comportamiento estático y dinámico en el tejido receptor, sobre todo en órganos dotados de gran movilidad como en el caso de la lengua.

La inmunocompatibilidad constituye el patrón de oro que hace de la MAVU un biomaterial xenogénico con un excelente comportamiento. Las proteínas y demás antígenos presentes en la MEC sufren una desnaturalización y desaparecen durante la fase física y enzimática de procesado. Por ello, se reduce al mínimo la posibilidad de respuesta inmune y ulterior rechazo inmunológico que impida el tratamiento regenerativo. También se ha estudiado su capacidad antibacteriana inherente a la matriz. Algunos péptidos de bajo peso molecular incluidos en su composición actúan frente a algunas bacterias Gram+ y Gram-. La actividad antibacteriana queda recogida

en algunos estudios, en los que se afirma una inhibición en la adhesión de los péptidos de la pared celular de *S. aureus* y *E. coli* a la estructura de la MAVU (Song y cols., 2014).

La angiogénesis, responsable de la formación temprana de un rico entramado vascular en el interior de la retícula de la MAVU determina la nutrición y aporte de oxígeno de las células integradas en su interior. Por ello, desempeña un papel fundamental en el éxito y viabilidad a largo plazo del tratamiento regenerativo. Como ya se ha mencionado, los factores de crecimiento inherentes a la matriz acelular estimulan la síntesis de VEGF que inician la neoangiogénesis. No obstante, otros factores como el bFGF también desencadenan este fenómeno. Únicamente queda por esclarecer los valores concretos de dosis y método de difusión (Zhou y cols., 2013).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

La lengua es un órgano móvil, impar y simétrico localizado en el interior de la boca. Este órgano versátil desempeña importantes funciones como la masticación, la deglución, el lenguaje y el sentido del gusto; actuando también como vía de absorción en su porción ventral y como mecanismo de protección mediante el tejido linfóide de las amígdalas linguales (*Dalesio y cols., 2018*). Gran parte de su multifuncionalidad se debe a la compleja anatomía de la musculatura lingual, que tiene su origen en células musculares emigradas de los somitas occipitales, compuesta por diecisiete músculos (intrínsecos y extrínsecos), ocho de ellos pares (geniogloso, estilogloso, hipogloso, palatogloso, faringogloso, amigdalogloso, transverso y lingual inferior) y uno impar y medio (lingual superior) (*Sanders y Mu, 2013*). Sin embargo, la lengua es la localización más frecuente del COCE, por encima incluso del suelo de la boca, mucosa yugal, superficie alveolar y paladar duro; además la localización lingual es también una de las de peor pronóstico, con tasas de supervivencia a 5 años por debajo del 60% (*Siegel y cols., 2011; Amit y cols., 2013*). Además, en los últimos años, se ha producido un incremento del COCE en lengua, base de lengua, amígdala y orofaringe en pacientes jóvenes asociados a factores de riesgo (consumo de tabaco, marihuana y/o alcohol, o a las infecciones víricas por el VPH) (*Shiboski y cols., 2005; Licitra y cols., 2008*) y sin exposición a factores de riesgo tradicionales (*Dahlstrom y cols., 2008*).

Los tratamientos quirúrgicos de estos COCEs son a menudo mutilantes y van desde incisiones moderadas de mucosa y tejido muscular a hemiglosectomías o glosectomías totales. En este sentido, las resecciones quirúrgicas de la lengua se clasifican de acuerdo al porcentaje resecado en hemiglosectomías (25-50%),

glosectomías subtotalet (60-90%) y glosectomías totales (*Urken y cols., 1994; Brown y cols., 2006*). Las consecuencias postquirúrgicas de las hemiglosectomías afectan a la mayoría de las funciones como la fonación, deglución, la masticación y la respiración, además de conllevar un elevado riesgo de broncoaspiración de sólidos por aumento de la permeabilidad de las vías aéreas superiores, y por lo tanto un considerable impacto negativo en la calidad de vida de estos pacientes (*Tong y cols., 2016*). Por este motivo, la reconstrucción mediante cirugía reconstructiva de los defectos quirúrgicos es indispensable, restituyendo en la medida de lo posible, la anatomía lingual y la funcionalidad del órgano. Las opciones terapéuticas deben por lo tanto tener en cuenta dos aspectos, mantener la movilidad del órgano y proporcionar volumen. El volumen es necesario para mantener contacto con las paredes faríngeas y el paladar y de esta manera permitir un mecanismo de deglución funcional, y la sensibilidad ofrece un mecanismo protector para evitar la broncoaspiración (*de Vicente y cols., 2008*). Las opciones quirúrgicas reconstructivas dependen de la cantidad de tejido lingual postresección, la posibilidad de protrusión de la lengua remanente, el estado de los tejidos adyacentes y las condiciones generales del paciente. Por lo general, en hemiglosectomías se suelen utilizar los colgajos locorreionales y la rotación de colgajos remanentes de la misma lengua (*Strauss y Kain, 2014*); mientras que en las glosectomías subtotalet y totales se utilizan colgajos cutáneos o fasciocutáneos libres microvascularizados, siendo el más utilizado el radial y el lateral de brazo (*Ko y cols., 2010; Thankappan y cols., 2011*), aunque podemos usar otros como el recto abdominal, pectoral mayor o el trapecoidal (*Vega y cols., 2011*).

Sin embargo, la disposición y complejidad de las fibras musculares que componen la lengua junto con el amplio rango de movimientos de este órgano, hacen de su restauración funcional completa uno de los grandes retos de la cirugía

maxilofacial oncológica. En la actualidad, los esfuerzos de las técnicas reconstructivas van dirigidos a la mera preservación volumétrica y a conseguir una movilidad aceptable del muñón residual tras la hemiglosectomía (*Zhen y cols., 2012*). Además, los colgajos microvascularizados presentan diversos inconvenientes, no sólo por la ablación quirúrgica extraoral de la zona donante, sino por la pérdida volumétrica derivada de la atrofia progresiva del colgajo a largo plazo, que en muchas ocasiones proporciona al paciente un movimiento lingual exclusivamente unidireccional y una reinervación y vascularización incompletas (*Copelli y cols., 2017*).

Para evitar estos problemas, han sido investigados otros tratamientos, que incluyen el trasplante alogénico de lengua, que fue ensayado en un modelo experimental en perros, y que aunque los resultados histológicos evidenciaron en algunos de ellos una reinervación de los nervios hipogloso y lingual, junto con una preservación muscular, lo cierto es que el 50% de los animales murieron por problemas inmunológicos, que continua siendo el principal problema para su aplicación en humanos (*Haughey y cols., 1999*).

En la actualidad la ingeniería tisular, basada en el uso de scaffolds biocompatibles donde se cultivan poblaciones celulares aisladas con el objetivo de reconstruir tejidos u órganos dañados, se ha convertido en un campo de investigación alentador para restaurar la anatomía y función de diferentes tipos de tejidos u órganos (*Rider y cols., 2018*). En relación a la reconstrucción de defectos de glosectomias parciales, han sido publicados algunos artículos científicos que usan la ingeniería tisular de reparación muscular (ITRM) para restaurar la anatomía y funcionalidad de la lengua, en animales de experimentación (*Kim y cols., 2003; Luxameechanporn y cols., 2006*). Kim y cols., (*Kim y cols., 2003*) en el año 2003 y Luxameechannporn y cols.,

(*Luxameechanporn y cols., 2006*) en el año 2006 trataron con éxito lenguas hemiglosectomizadas de ratas Lewis mediante constructos de CMPDMs sobre un scaffold de colágeno. Incluso, Plowman y cols., (*Plowman y cols., 2014*) en el año 2014 obtuvieron buenos resultados regenerativos tras implantar células madre derivadas de músculo autólogo en un modelo de ovejas Dorper con lenguas denervadas.

En los últimos años, en la ITRM, además de los scaffolds más frecuentemente utilizados a base de geles de colágeno, fibrina, ácido hialurónico y ácido poliglicólico (Kenar y cols., 2019); se han utilizado con éxito matrices acelulares de origen porcino, como la pequeña capa submucosa intestinal (PCSI) (*Rosetto y cols., 2013*), o la MAVU de cerdo (*Machingal y cols., 2011; Corona y cols., 2012*). La MAVU de cerdo es un buen scaffold biocompatible para utilizarlo en ingeniería tisular debido fundamentalmente a su carácter acelular, lo que evita cualquier tipo de respuesta inmunitaria de rechazo al injerto (*Rosario y cols., 2008*). Además, la MAVU de cerdo ofrece una elevada resistencia mecánica, estabilidad tridimensional y se ha descrito la presencia en ella de numerosas enzimas, factores de crecimiento y proteínas de adhesión celular (*Camacho-Alonso y cols., 2019*). Estas propiedades, han hecho que la administración de comida y fármacos de EEUU (FDA) apruebe el uso del scaffold de MAVU de cerdo para cirugías en las que es necesario reforzar el tejido blando y para el manejo de heridas (*Machingal y cols., 2011; Rosario y cols., 2008; Parekh y cols., 2009; Zhu y cols., 2011*). En este sentido, la MAVU porcina ha sido utilizada para la regeneración de membrana timpánica (*Parekh y cols., 2009*), corazón (*Remlinger y cols., 2013*), el menisco de la articulación tempromandibular (*Brown y cols., 2011*), uretra (*el-Kassaby y cols., 2008*), cerebro (*Wang y cols., 2013*), tejido facial (*Eberly y cols., 2011*), el manejo de úlceras diabéticas (*Frykberg y cols., 2016*), en la cicatrización de heridas cutáneas (*Lanteri Parcells y cols., 2014*) y de lengua (*Camacho-Alonso y cols., 2019*), quemaduras (*Kim y*

cols., 2016), en cirugía pélvica (*Liu y cols., 2012*), en la reparación de aneurismas endoteliales (*Callanan y cols., 2013*), e incluso para reparar defectos de la vejiga urinaria (*Zhu y cols., 2011*). En relación a su uso en ITRM, la MAVU porcina también ha sido utilizada para la regeneración de músculo liso como el del esófago (*Badylak y cols., 2005*) o de músculo cardíaco (*Ota y cols., 2008*), y para la regeneración de músculo esquelético (*Machingal y cols., 2011; Corona y cols., 2012; Aurora y cols., 2015; Aurora y cols., 2016*).

En relación a la regeneración de lesiones con pérdida volumétrica de músculo (PVM), *Aurora y cols., (Aurora y cols., 2015; Aurora y cols., 2016)* en los años 2015 y 2016 utilizaron sin demasiado éxito la MAVU porcina exclusivamente para la regeneración de defectos musculotendinosos en ratas Lewis. Sin embargo, el uso de constructos basados en MAVU de cerdo y células progenitoras de músculo, ha sido usado con éxito para la regeneración de músculo esquelético de mamíferos (*Machingal y cols., 2011; Corona y cols., 2012*).

En la actualidad, el uso de un constructo de MAVU porcina y células madre para la regeneración de la musculatura lingual tras lesiones con PVM, no ha sido investigado todavía. En este sentido, el objetivo de estudio fue aplicar la ITRM en la regeneración de la musculatura lingual de ratas hemiglosectomizadas mediante el trasplante de CMPDMs sobre MAVU porcina.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general fue el estudio de la capacidad de regeneración de la musculatura lingual mediante el trasplante de CMPDMs sobre MAVU de cerdo, en ratas hemiglosectomizadas.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea el presente estudio.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el aumento o descenso del peso postoperatorio como medida indirecta del dolor intraoral en ratas Lewis hemiglosectomizadas, a los 2, 14, 28, y 42 días de ser tratadas con: MAVU porcina + CMPDMs, MAVU porcina, CMPDMs y solución salina (control).

2. Valorar mediante análisis macroscópico morfométrico el porcentaje de superficie del dorso lingual con PVM en ratas Lewis hemiglosectomizadas, a los 2, 14, 28, y 42 días de ser tratadas con: MAVU porcina + CMPDMs, MAVU porcina, CMPDMs y solución salina (control).

3. Analizar el aumento de peso lingual postoperatorio mediante la diferencia de peso entre la hemilengua sana y la operada en ratas Lewis hemiglosectomizadas, a los 2, 14, 28, y 42 días de ser tratadas con: MAVU porcina + CMPDMs, MAVU porcina, CMPDMs y solución salina (control).

4. Determinar histológicamente el grado de inflamación lingual en ratas Lewis hemiglosectomizadas, a los 2, 14, 28, y 42 días de ser tratadas con: MAVU porcina + CMPDMs, MAVU porcina, CMPDMs y solución salina (control).

5. Estudiar histológicamente el grado de fibrosis lingual en ratas Lewis hemiglosectomizadas, a los 2, 14, 28, y 42 días de ser tratadas con: MAVU porcina + CMPDMs, MAVU porcina, CMPDMs y solución salina (control).

METODOLOGÍA

3

3. METODOLOGÍA

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales utilizados en este estudio fueron suministrados por el Servicio de Experimentación Animal (REGA ES300305440012) (Unidad de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia (España). El protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético de experimentación animal de la Universidad de Murcia (España) y de la autoridad competente (Consejería de Cultura y Agua, Dirección General de Ganadería y Pesca) (A1320140302) (Anexos 1 y 2), y se siguieron las Directrices de la Unión Europea para la experimentación animal (EU/63/2010).

Un total de 80 ratas macho Lewis, con un peso entre 247 y 253 g (peso medio 250 g), fueron incluidas en este estudio prospectivo aleatorizado, que tuvo lugar entre Abril de 2014 y Mayo de 2018. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas ventiladas con 12/12 horas de ciclos de luz/oscuridad, con comida y agua ad libitum. Durante todo el estudio fueron alimentadas con una dieta nutricionalmente completa especialmente diseñada para ratas y ratones de laboratorio (Pb Panlab, Barcelona, España), previamente triturada (Robot Coupe®, Bourgogne, Francia) para conseguir una dieta semiblanda. Todos los animales fueron aclimatados durante 1 semana antes del inicio del estudio.

3.2 PREPARACIÓN DE LA MATRIZ ACELULAR DE VEJIGA URINARIA (MAVU)

El andamiaje de matriz acelular (MAVU) fue obtenido a partir de la vejiga urinaria de un cerdo macho de entre 100 y 150 kg de peso, la cual fue conservada en un congelador a una temperatura de -80°C hasta el momento de su disección. Una vez descongelada, la vejiga de cerdo fue sometida a un lavado profuso con suero salino fisiológico al 0,9% para eliminar los restos biológicos y se dividió en dos secciones para facilitar la disección de los diferentes estratos histológicos. Se separaron las tunicas adventicia y muscular para aislar la lámina propia subyacente al epitelio de transición o urotelio, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en la literatura científica (Machingal y cols., 2011, Moon du y cols., 2008) (Figuras 6 y 7).

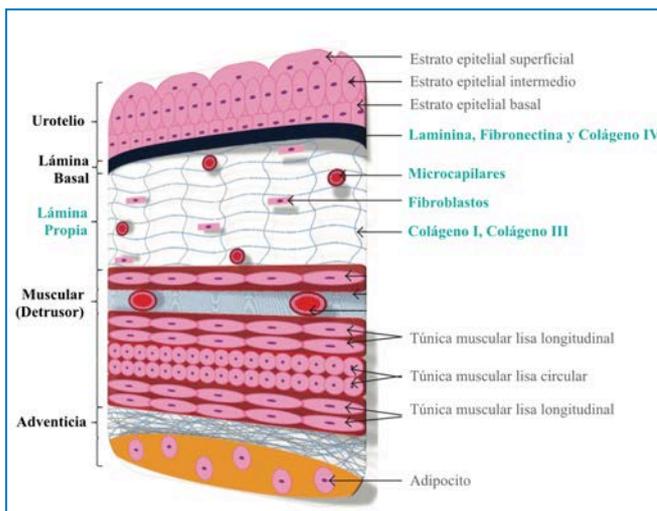


Figura 6. Representación del corte histológico de la vejiga urinaria de cerdo donde se aprecian las diferentes capas. Fuente: Orabi H, Bouhout S, Morissette A, Rousseau A, Chabaud S, Bolduc S. *Tissue Engineering of Urinary Bladder and Uretra: Advances from Bench to patients. Arab J Urol* 2013;11:415-420.

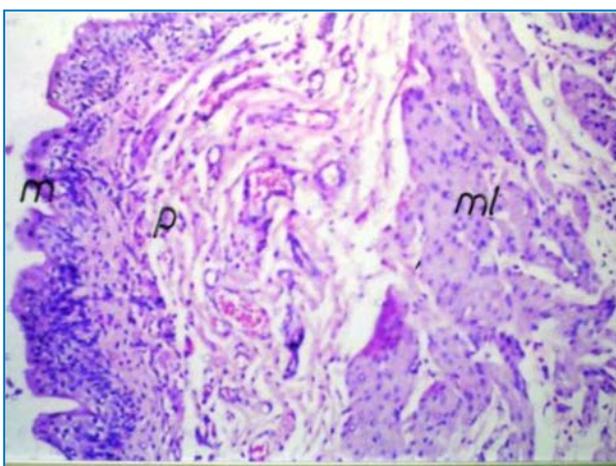


Imagen 7. Tinción en H-E en la que se muestran las diferentes capas histológicas de la vejiga urinaria de cerdo. Tinción con H-E. **m:** mucosa, **p:** lamina propia, **ml:** muscular. Fuente: El-Mosalamy H, Salman TM, Ashmawey AM, Osama N. *Role of chronic E. coli infection in the process of bladder cancer: an experimental study. Infect Agent Cancer.* 2012;7:19.

La fina membrana constituida por lámina propia se incluyó en medio de cultivo DMEM (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) suplementado con 1000 µg/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomina, 500 µg/mL de Gentamicina y 2,5 µg/mL de Anfotericina además de SBF (suero bovino fetal) al 10% de concentración (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) en volumen durante el transporte al servicio de cultivo de tejidos (*Imagen 8*).

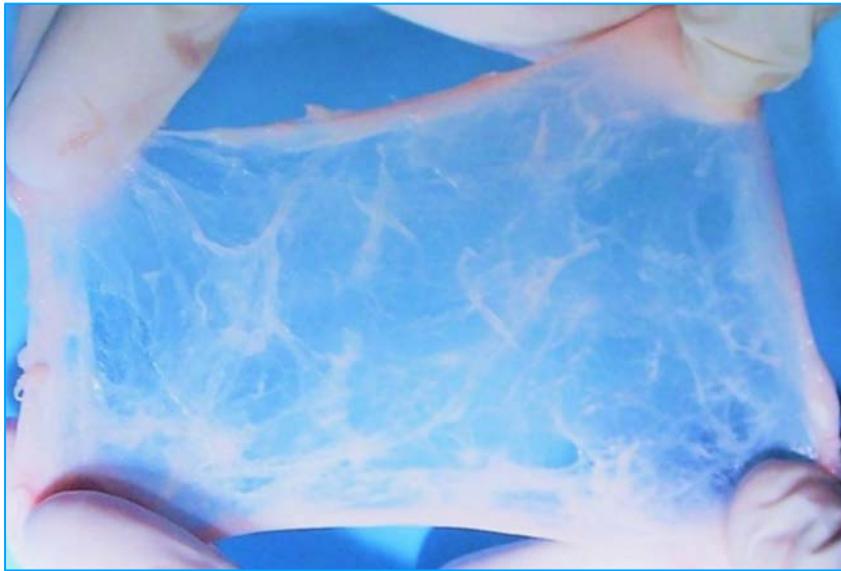


Imagen 8. Obtención en bruto de la fina membrana constituida por el epitelio de transición (urotelio) y la lámina propia subyacente, esta última considerada como objeto de estudio debido a sus propiedades estructurales como andamiaje y bioquímicas que favorecen la proliferación celular.

Con el fin de realizar un estudio histológico comparativo y evaluar la eficacia del proceso de descelularización de la lámina propia obtenida, dicha muestra se dividió en dos grupos: el grupo control, en el que se pretendía conservar la estructura nativa extracelular junto con el componente celular, y el grupo de estudio, que sería sometido a un proceso para eliminar únicamente la fracción celular y así obtener la MAVU (*Diagrama 1*).



Diagrama 1. Se muestran los grupos de tratamiento de la lamina propia obtenida.

3.2.1 Procedimiento con el Grupo Control

La muestra control fue recortada en fragmentos de aproximadamente 10 x 10 mm de tamaño para someterla a un protocolo de tinción. Seguidamente se llevó a cabo la fijación inmediata para evitar la muerte celular y la desestructuración de la matriz extracelular. En función del método de observación y de la tinción practicada, se dividieron a su vez en diferentes subgrupos (diagrama 2):

- Aquellas que fueron seleccionadas para su tinción con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson se fijaron con una solución de formaldehído (formalina) al 10% de concentración (Tecnoquim S.L., Murcia, España) y almacenadas en etanol al 60% (Tecnoquim S.L., Murcia, España) antes de incluirlas en parafina. De los bloques de parafina conformados, se obtuvieron secciones de 5 μm de grosor con la ayuda del microtomo motorizado. Las preparaciones fueron entonces teñidas con dos de los colorantes anteriormente mencionados: H-E y Tricrómico Masson (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Finalmente fueron observadas al microscopio óptico a 400x y 1000x (Leica™ DMRB y cámara Leica™ DC500, Leica Corp., Heerburg, Suiza).

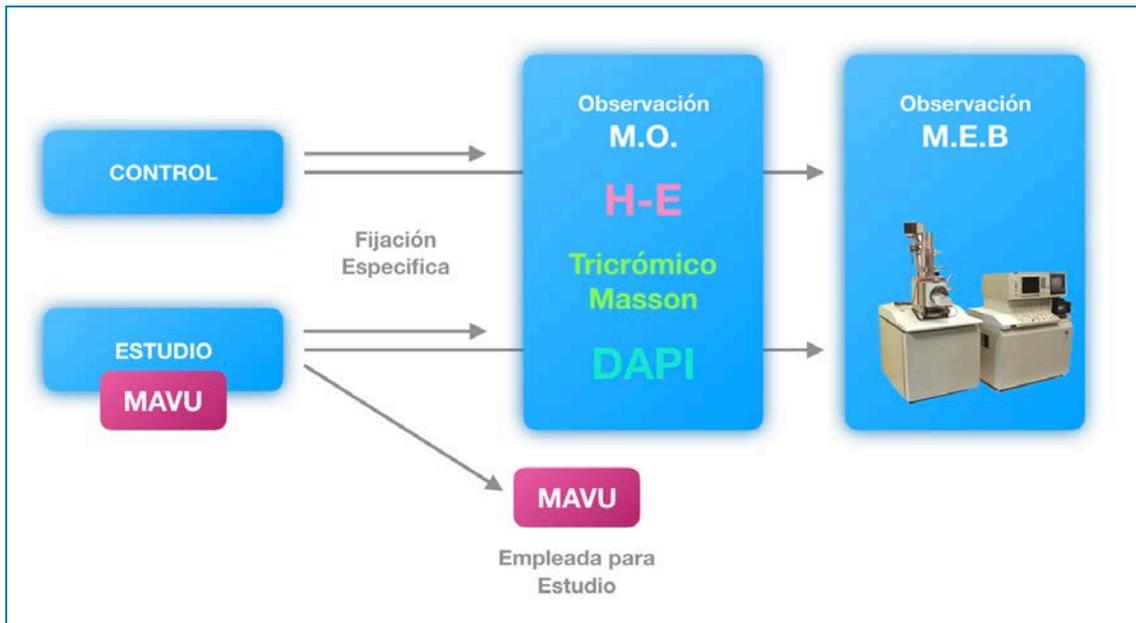


Diagrama 2. Ruta de las muestras según los protocolos de fijación, tinción y método de observación. **M.O.:** Microscopio Óptico y **M.E.B.:** Microscopio Electrónico de Barrido.

- Para la tinción con 4,6-diamino-2-fenilindol D952 (DAPI) (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España), las muestras siguieron inicialmente el mismo protocolo de fijación y conservación con formaldehído y etanol respectivamente para ser incluidas en parafina. A continuación fueron desparafinadas mediante 2 ciclos de inmersión en sustitutivo de Xilol durante 5 min cada uno. El DAPI preparado a una concentración de 200 µg/ml en agua desionizada estéril se colocó sobre el portaobjetos con las muestras y se incubó en oscuridad absoluta durante 15 min. Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon™ Eclipse 90i, Nikon Corp. Tokio, Japón) con filtro de excitación de 340-380 nm, espejo dicróico RKP 400 y un filtro de emisión de LP425 nm a 400x y 1000x.

- Por otro lado, los fragmentos seleccionados para su observación con microscopía electrónica de barrido (MEB) fueron fijados con una solución de glutaraldehído al 2,5% de concentración (Tecnoquim S.L., Murcia, España) durante 2 horas y conservados en etanol al 70% (Tecnoquim S.L., Murcia, España). Siguiendo

el protocolo, tras el liofilizado y baño metalográfico, fueron observadas con el microscopio electrónico (JEOL JSM-6100, JEOL Corp., Tokio, Japón) entre 100 y 3500x de aumento.

3.2.2 Procedimiento con el Grupo Estudio. Preparación de la MAVU

Las muestras de estudio fueron sometidas a un proceso de descelularización. En primer lugar se realizó la digestión enzimática de la lámina propia incorporando una solución de Tripsina y EDTA al 0,05% (HyClone™ Laboratories Inc, Utah, Estados Unidos) en una incubadora de agitación a 37°C durante 1 hora. Seguidamente fueron transferidas a una solución DMEM suplementada con SBF al 10% (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) y se incubaron en condiciones de oscuridad a 4°C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la humectación y saponificación de la vejiga mediante su inmersión en otra solución, esta vez Tritón X-100 al 1% (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) con hidróxido de amonio al 0,1% (Fisher Scientific S.L., Madrid, España) en agua desionizada estéril y se dejó actuar a 4°C de temperatura durante otros 4 días (Figura 8).

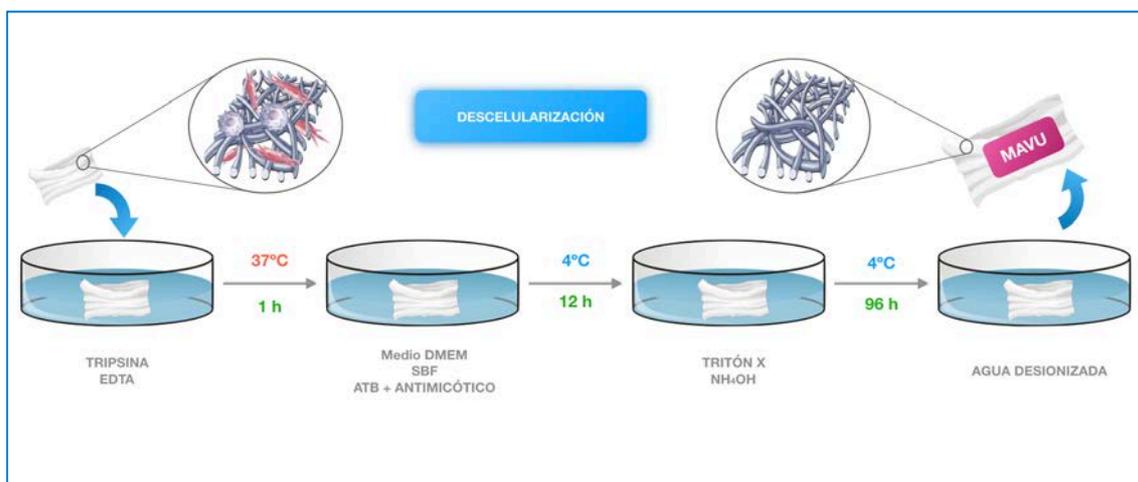


Figura 8. Representación del protocolo de descelularización de la lámina propia de vejiga urinaria mediante inmersión secuencial controlada en los diferentes reactivos. Se obtiene finalmente la lámina acelar o MAVU.

Las muestras de lámina propia descelularizadas fueron lavadas de forma abundante con agua desionizada estéril y conservadas en el frigorífico a 4°C durante 3 días. Concluido dicho protocolo de inmersión secuencial en diferentes productos obtuvimos la MAVU propiamente dicha (*Imagen 9*).



Imagen 9. Lámina propia después del proceso de descelularización (MAVU).

Parte de la muestra preparada se reservó y fue sometida a un procedimiento de fijación, tinción, procesado y observación similar al practicado en el grupo de lámina propia control: H-E y tinción tricrómica de Masson (Sigma Aldrich Química, S.A., Madrid, España) utilizando el microscopio óptico; DAPI (Sigma Aldrich Química, S.A., Madrid, España) usando un microscopio de fluorescencia Leica® DRMB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y finalmente bajo el microscopio electrónico de barrido (Oxford Instrument INCA 300 EDX System, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido). La efectividad del proceso de descelularización para la obtención de la MAVU se comprobó histológicamente (*Figura 9 y 10*).

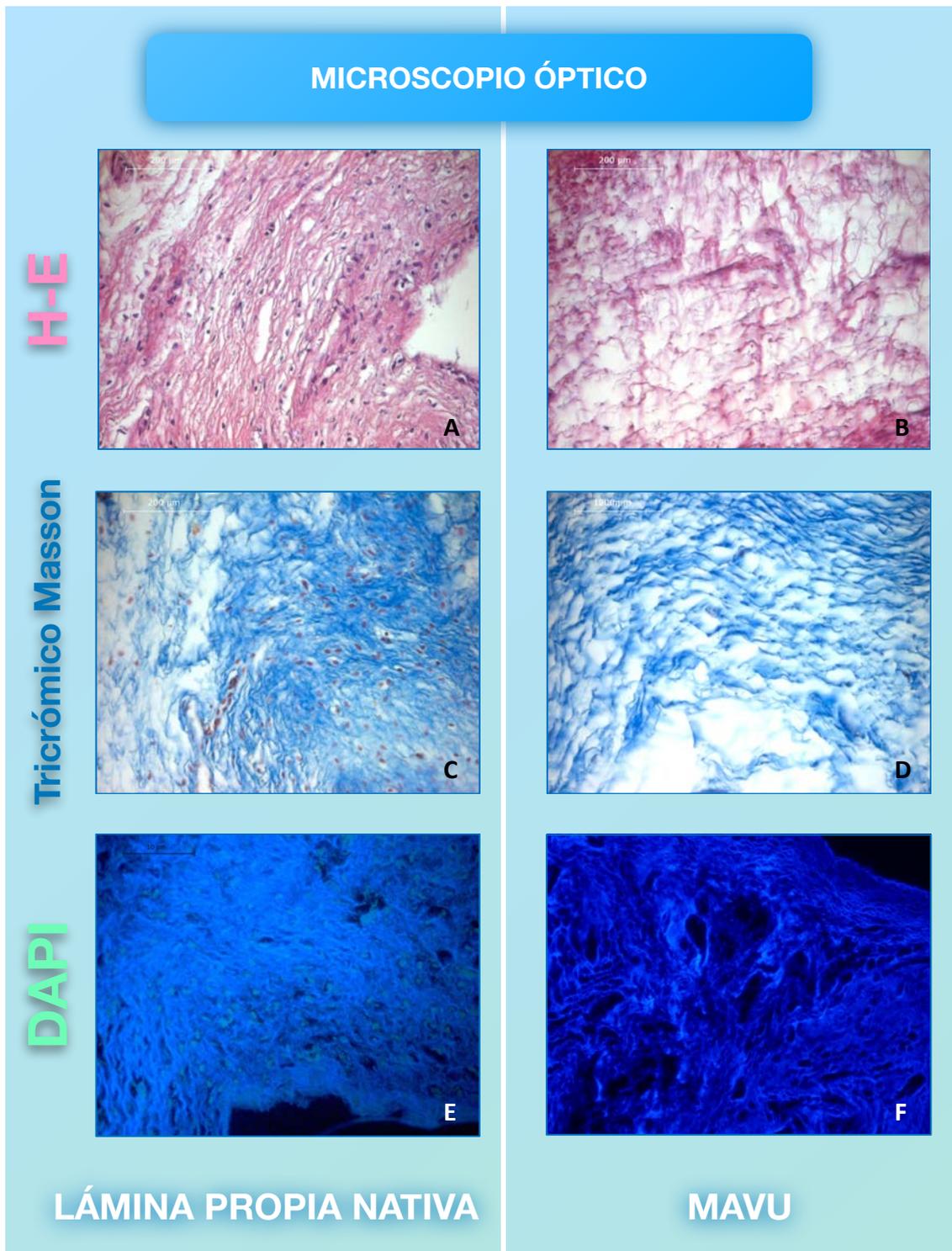


Figura 9. Comparativa de las diferentes imágenes histológicas pertenecientes a lámina propia nativa (izquierda) y lámina propia que recibió el procedimiento de descelularización o MAVU (derecha). Imágenes obtenidas al microscopio óptico (H-E y Tricrómico de Masson) y microscopio de fluorescencia (DAPI) a 40x de aumento.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

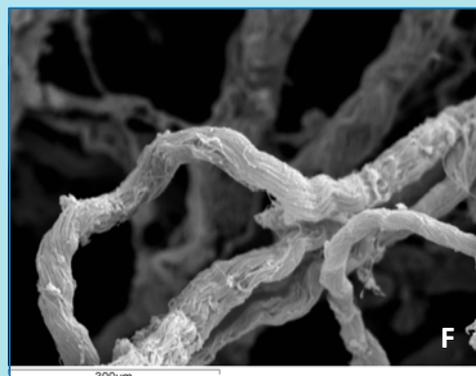
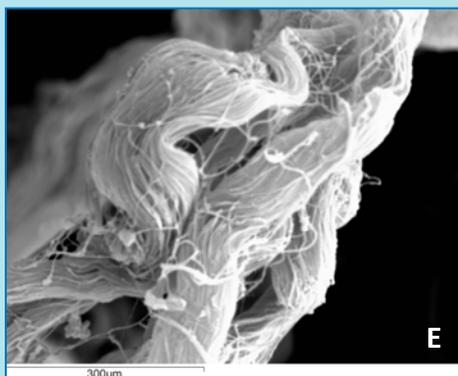
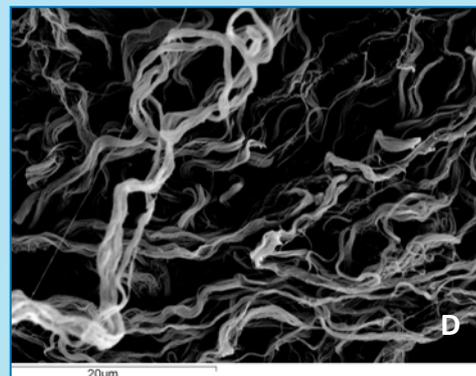
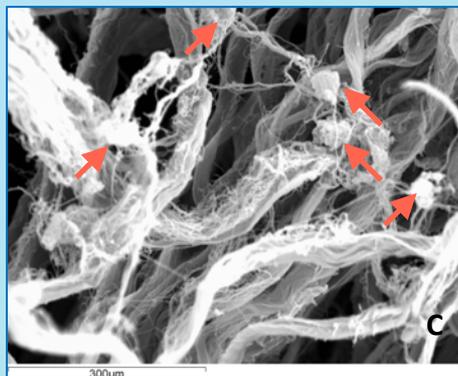
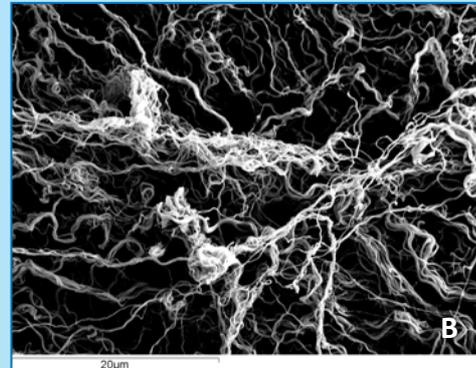
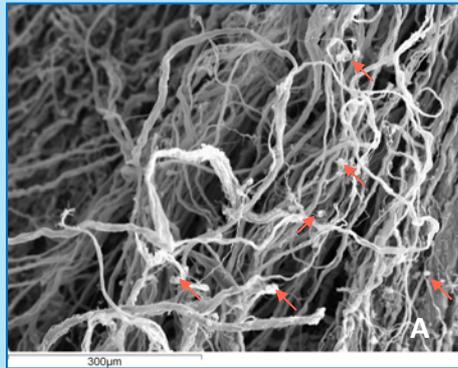


LÁMINA PROPIA NATIVA

MAVU

Figura 10. Comparativa de las diferentes imágenes imágenes obtenidas al MEB. Imágenes: A (300x), B (120x), C (1500x), D (500x), E (3500x) y F (1800x). Las flechas rojas señalan la presencia de algunas células en las muestras correspondientes a la lámina propia nativa.

La matriz acelular se redujo de nuevo mecánicamente para obtener un valor aproximado de 0,3-0,5 mm de espesor, dimensión adecuada para su implantación en el defecto quirúrgico creado en el animal de experimentación. A continuación la MAVU se recortó en tiras rectangulares de 30 x 20 mm de tamaño y se fijaron a unos marcos o cámaras de anclaje, diseñadas específicamente para el estudio y construidas con silicona fluida de uso dental (Aquasil Ultra LV, Denstply® Inc, Pennsylvania, Estados Unidos). Los dispositivos facilitaron en gran medida la manipulación de la MAVU durante la fase de esterilización en el autoclave, evitando el colapso del tejido y la formación de pliegues. Las muestras fueron almacenadas en bolsas precintadas y llevadas al autoclave de óxido de etileno (Steri-Vac 4XL de 3M® Company, Minnessota, Estados Unidos) para su esterilización con un ciclo templado a 55°C durante 12 horas. Dicha modalidad de esterilización evitó el choque térmico y la humedad de un ciclo normal con vapor de agua a 131°C, con la consiguiente destrucción de la microestructura reticular de colágeno.

En el momento en que los scaffolds iban a ser utilizados para los tratamientos quirúrgicos, las MAVUs fueron utilizadas con las cámaras de anclaje y recortadas en discos homogéneos de 3 mm de diámetro con la ayuda de un bisturí circular o *punch* nº3, todo ello asegurando el ambiente estéril en cabina de flujo laminar (Cultair™ASB Flujo vertical tipo II). Los discos resultantes se se reservaron hasta su aplicación en la reparación de lesiones con PVM (*Imágenes 10 y 11*).

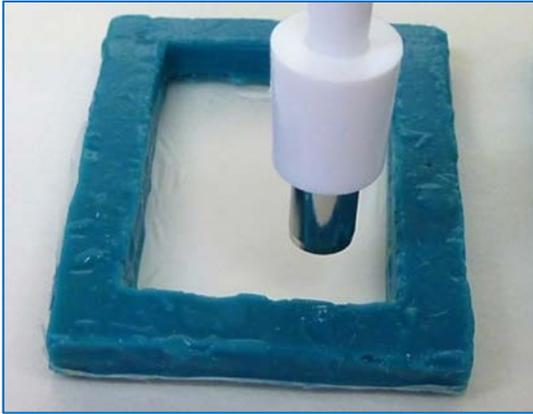


Imagen 10. Detalle del disco de MAVU obtenido, listo para su aplicación en los grupos experimentales 1 (MAVU+CMPDMs) y 2 (MAVU).

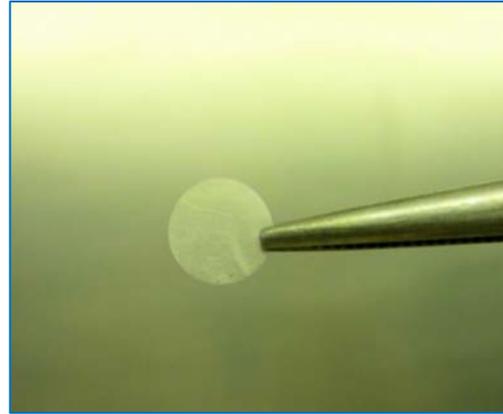


Imagen 11. Recorte de las MAVUs en las cámaras de anclaje para la obtención de discos de 3 mm de diámetro mediante un bisturí circular para

3.3 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PROGENITORAS DERIVADAS DE MÚSCULO (CMPDMs)

Un neonato de rata singénica *Lewis* macho de 18 o 19 días de vida fue sacrificado por sobredosis de inhalación de CO₂ previa sedación con isoflurano, según las recomendaciones establecidas por el RD 53/2013 en cuanto a los aspectos relacionados con la eutanasia en animales de experimentación. Las CMPDMs fueron obtenidas mediante disección quirúrgica de los músculos paraespinales de la rata *Lewis* neonata siguiendo la técnica previamente descrita en la literatura (Kim y cols., 2003; Luzameechanporn y cols., 2006; Bunaprasert y cols., 2003) en campo aséptico y con las medidas de esterilidad oportunas (Imagen 55).



Imagen 12. Abordaje quirúrgico para la extracción de los músculos paraespinales de una rata *Lewis* neonata.

Los músculos paraespinales (MPEs) disecados fueron incluidos en una solución de Hank's con Calcio y Magnesio (HBSS) (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) que se suplementó con 10000 U/ml de Penicilina y 5 µg/ml de Anfotericina B (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España), durante su transporte a la unidad de cultivo de tejidos. Ya en el laboratorio, las muestras de MPEs fueron lavadas repetidamente con HBSS estéril para retirar posibles residuos y los restos de fascia, rica en fibroblastos que dificultan el cultivo de las CMPDMs *in vitro*. A continuación, los fascículos se fragmentaron con el bisturí en cubos de 3-5 mm³ aproximadamente para incrementar el área y permitir una mayor difusión de los reactivos empleados (*Imagen 13*).

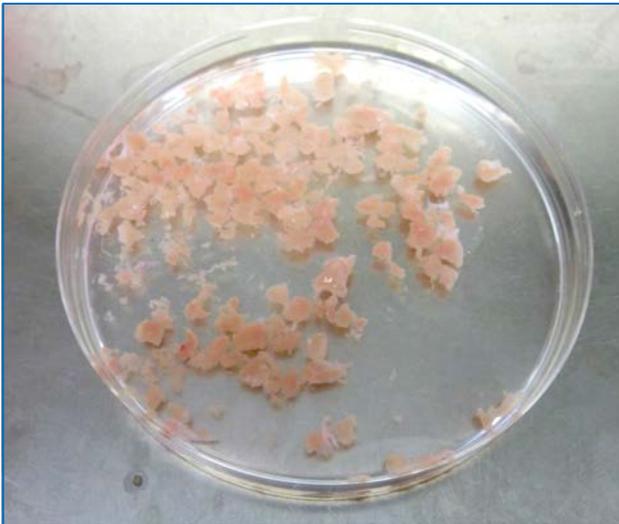


Imagen 13. Fragmentación de los fascículos de MPEs para aumentar el área de difusión y así facilitar las acción de los diferentes reactivos empleados en la digestión enzimática.

El tejido fue digerido enzimáticamente por incubación en un medio disociado que contenía colagenasa tipo II al 1% (Worthington Biochemicals® Corp, Nueva Jersey, Estados Unidos), Dispasa 2,4 U/ml (Boehringer Mannheim® S.A., Barcelona, España) y Cloruro Cálcico a concentración 2,5 mM en una incubadora de agitación durante 30 minutos a 37°C. El material resultante se trituró mediante pipeteado enérgico repetido con pipetas de 25 mL, 10 mL y 5 mL de forma sucesiva. Posteriormente se procedió a su tamizado con filtro de 70 µm para separar los restos de tejido no digeridos de la fracción celular (*Imágenes 14 y 15*).

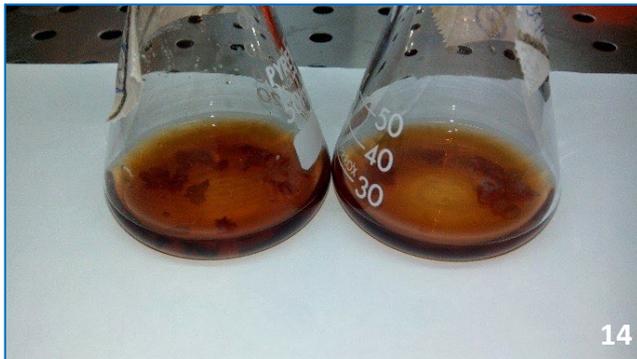


Imagen 14. Digestión enzimática de los músculos paraespinales para la separación del tejido de las CMPDMs. **Imagen 15.** Triturado por fricción en la aspiración mediante pipetas de calibre sucesivamente menor.



A la suspensión celular obtenida se le añadió medio de cultivo especial para mioblastos constituido por Ham's F10 mezcla de nutriente (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) complementado con 1000 µg/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina, L-Glutamina al 1% (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) además de SBF al 20% en volumen (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) y 3 ng/ml de bFGF (Promega Corp. Madison, Estados Unidos) y fue sometida a un proceso de centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1LR, Fisher Scientific S.L., Madrid, España). Tras retirar el sobrenadante de los tubos centrifugados, el pellet de células del fondo fue resuspendido con 2 mL del medio Ham's F10 preparado y transferido a frascos de cultivo de 25 cm² con tratamiento de superficie previo de 5 µg/ml de Laminina (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España). Finalmente se añadieron 3 mL adicionales del medio de cultivo hasta completar los 5 mL de suspensión celular. Los frascos de cultivo se incubaron en una estufa de CO₂ al 5% y 37°C de temperatura durante 48h para estabilizar la población celular.

Sin embargo, dicho cultivo inicial no estaría compuesto exclusivamente de CMPDMs. Cabía esperar la presencia de otras estirpes celulares residentes en el tejido extraído como mioblastos, macrófagos, células endoteliales, y numerosos fibroblastos

procedentes de las fascias musculares (epimisio, perimisio y endomisio). Con el cultivo de estabilización se consiguió separar los primeros tipos celulares que se encontraban en suspensión y que no se fijaron a la superficie del frasco. En cuanto a los fibroblastos, con una especificidad a medio reducida y una tasa de división celular muy superior, dificultaban el aislamiento y expansión de las CMPDMs. Con el fin aislar la población de CMPDMs, se aplicó un protocolo conocido como *preplating*, basado en el principio de adhesión diferencial de las líneas celulares a la superficie del medio de cultivo en función del tiempo (Lavasani y cols., 2013).

Una vez transcurridas las 48 horas de equilibrio y comprobada la adherencia a la superficie de las células obtenidas, se aspiró el medio de los frascos de cultivo que contenía residuos y restos celulares, se desprendieron del fondo utilizando Tripsina-EDTA al 0,25% (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España) durante 1 min en estufa a 37°C y se transfirieron a un tubo de ensayo de 10 mL con medio Ham's F10 nuevo para inactivar la acción del enzima.

Para la técnica de *preplating* se recurrió al pase sucesivo sobre diferentes frascos T25 que previamente habían sido tratados en superficie con Colágeno tipo I en concentración de 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Bajo un tiempo determinado en cada ciclo se conseguía la adhesión parcial de ciertas familias celulares. Los fibroblastos, ávidos por el colágeno tipo I, presentarían una adhesión mas rápida a la superficie de cultivo tratada que las CMPDMs, quedando estos últimos todavía en suspensión. Descartando los frascos y traspasando únicamente la suspensión a nuevos frascos, se conseguía purificar la población de CMPDMs en detrimento de los fibroblastos, que iban reduciéndose en en cada ciclo. De este modo, la suspensión celular inicial se incubó en el primer frasco de cultivo (PP1) por un tiempo de 2 h a 37°C en estufa de CO₂ al 5%. Seguidamente, la

suspensión (células no adherentes) se trasladó a un frasco T25 nuevo etiquetado como PP2, esta vez con un tiempo de incubación de 18 h. Transcurrido este tiempo, el medio celular recogido en un tubo de ensayo estéril fue centrifugado a 1200 rpm durante 5 min para eliminar los metabolitos excretados y restos celulares mediante la aspiración y descarte del sobrenadante. El pellet de células fue resuspendido con medio Ham's F10 nuevo y transferido a un nuevo frasco (PP3). Este último paso se repitió en 3 ocasiones hasta llegar a PP6. El cultivo PP6 se mantuvo en reposo durante 72 h para favorecer la adhesión de la población de CMPDMs enriquecida a la superficie (*Figura 11*).

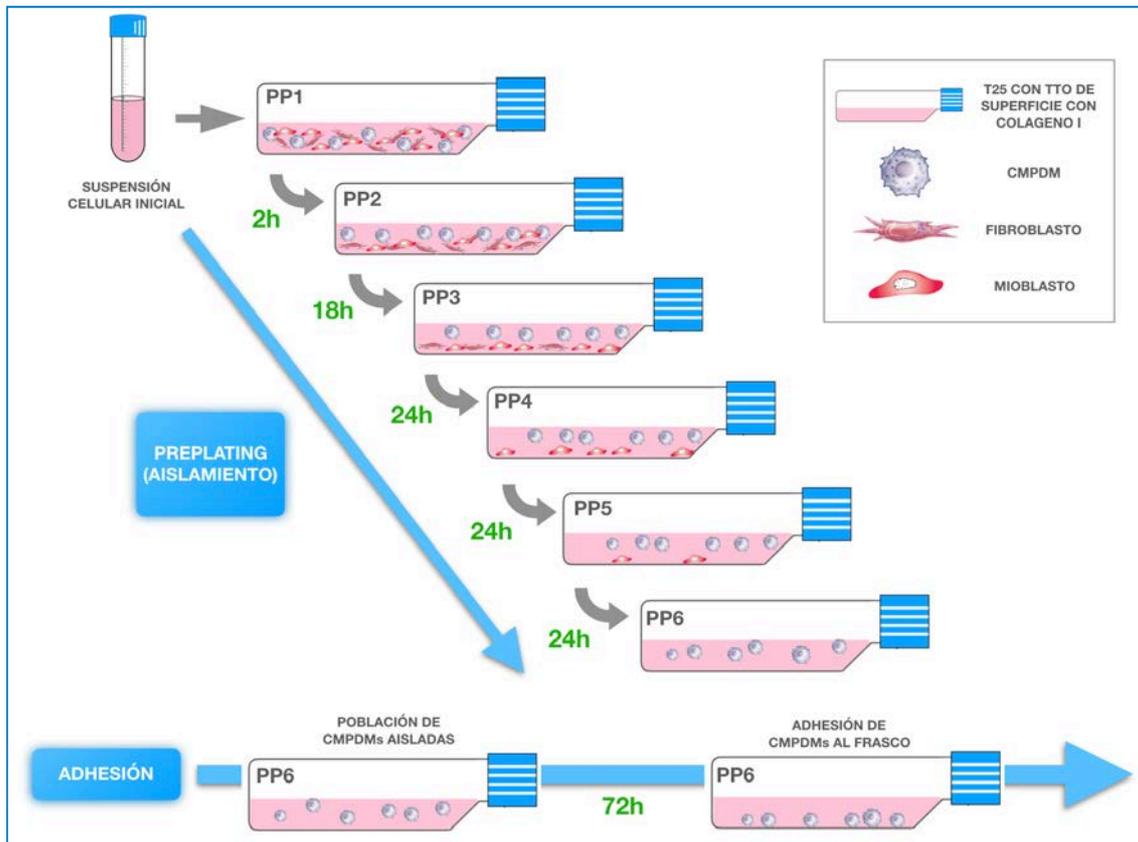


Figura 11. Esquema del procedimiento del preplating en el que se muestran los diferentes pasos a través de los frascos de cultivo con el fin de purificar la población de CMPDMs.

Cumplidas las 72 horas, al frasco de cultivo PP6 con las CMPDMs se le realizó un cambio de medio para retirar la fracción de células inviables y aportar nuevos

nutrientes. El cultivo se mantuvo en constante observación para mantener en todo momento una confluencia entre el 30 y 50%, ya que valores superiores de densidad celular favorecerían la diferenciación de CMPDMs en mioblastos formando miotubos. A los 7 días se realizó en primer subcultivo, dividiendo la muestra en 2 frascos T25 para reducir la densidad a la mitad (pase al 50%), esta vez con recubrimiento previo de Laminina (Sigma Aldrich® Química S.A., Madrid, España). El procedimiento de control del medio y subcultivo se repitió dos veces mas hasta completar un total de 21 días de evolución del cultivo (*Figura 12*).

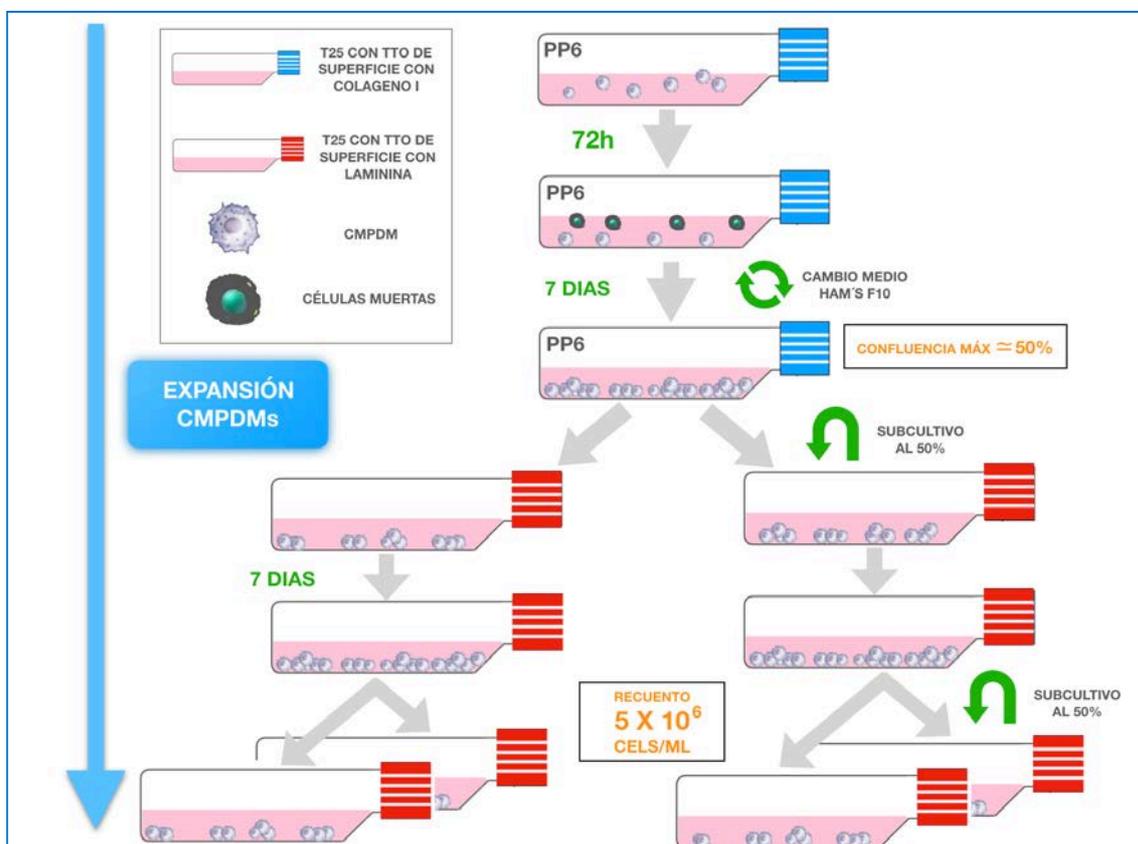


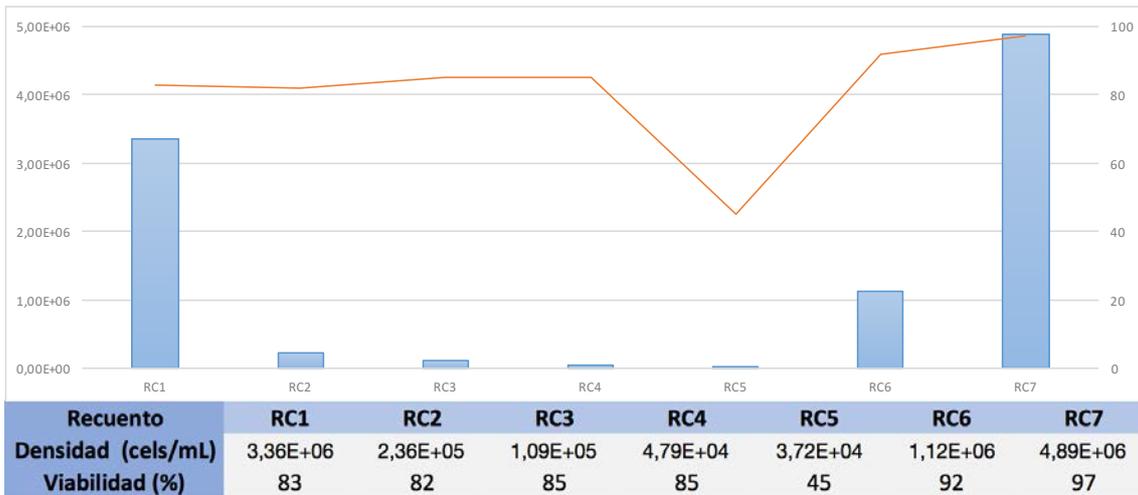
Figura 12. Esquema de la expansión de la población de CMPDMs una vez purificada (PP6). Se realizaron subcultivos al 50% cada 7 días intercalando periodos de cambio de medio y observaciones para mantener la confluencia y el recuento en parámetros adecuados. Se realizaron un total de 3 subcultivos en un tiempo de 21 días, hasta conseguir el objetivo de 5×10^6 cels/mL.

De forma paralela se realizaron recuentos celulares con la técnica de Azul Tripán en el contador de células automático (Bio-RAD TC-10™, Bio-Rad Laboratories Inc.,

California, Estados Unidos) para hallar la densidad y la viabilidad celular a un tiempo determinado. Se escogieron diferentes tiempos de medición (RC) que se detallan a continuación (*Gráfica 1*):

- RC₁: Recuento de la suspensión celular inicial, anterior a la técnica de *preplating*. Se confirmaron resultados elevados de densidad y de viabilidad celular por el escaso tiempo transcurrido *ex vivo*.
- RC₂: Recuento entre PP3 y PP4. Tuvo lugar un descenso considerable de la densidad celular como consecuencia del descarte de la fracción de fibroblastos por adhesión al colágeno tipo I de superficie.
- RC₃: Recuento entre PP4 y PP5. Continuación del proceso de selección de CMPDMs en detrimento de los fibroblastos que fueron eliminados de la muestra.
- RC₄: Recuento entre PP5 y PP6. Último paso en el aislamiento de CMPDMs. Se observó una presencia nula o muy reducida de fibroblastos (5-10%).
- RC₅: Recuento en PP6 tras 72 horas de cultivo. Se evidenció un descenso notable tanto de la densidad como de la viabilidad por la muerte de aquellos CMPDMs que no consiguieron adherirse a la superficie.
- RC₆: Recuento inmediatamente anterior al primer subcultivo al 50% de la población de CMPDMs purificada.
- RC₇: Recuento final de la población aislada de CMPDMs, previo a las fases de aplicación en los grupos experimentales.

Se fijó como objetivo final la obtención de una suspensión celular con una densidad de 5 millones de CMPDMs por mL, valor considerado ideal para asegurar la repoblación y proliferación y una viabilidad superior al 95%.



Gráfica 1. Evolución de la población de CMPDMs durante el procedimiento de preplating y expansión.

3.3.1 Comprobación de la efectividad del cultivo de CMPDMs

Con objeto de comprobar la presencia y la morfología de los CMPDMs cultivados en laboratorio se efectuaron observaciones a nivel histológico (*Imagen 16*). Parte de la suspensión celular adquirida durante las fases de subcultivo se fijó con una solución etanol al 70% y solución de Carnoy (metanol y ácido acético glacial). Las muestras fueron finalmente teñidas con H-E para ser observadas al microscopio óptico (Leica™ DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a 600x (*Imagen 17*).

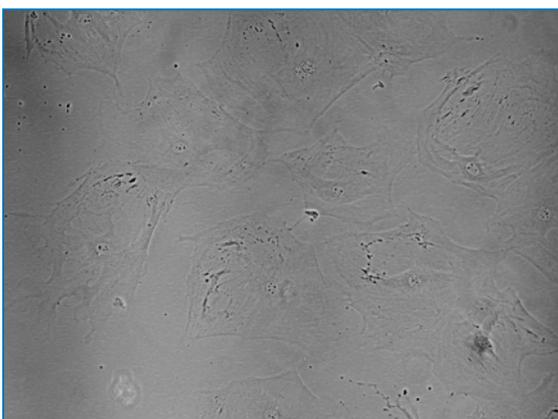


Imagen 16. CMPDMs en microscopio óptico de contraste de fases en la que se confirma la morfología y viabilidad. 400x

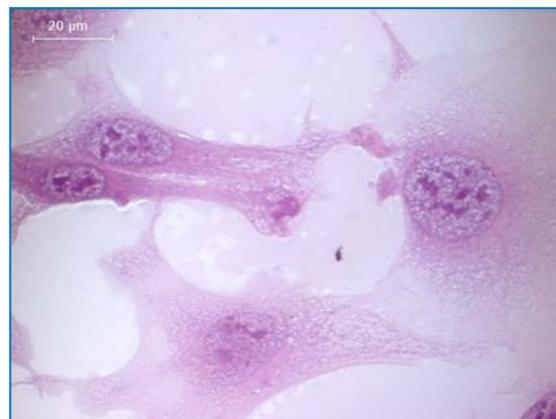


Imagen 17. Tinción de H-E observada al microscopio óptico a 600 x de aumento. Población de CMPDMs.

3.3.2 Siembra de las CMPDMs sobre los discos de MAVU

Uno de los grupos de estudio precisaba la implantación de las CMPDMs integradas en la MAVU. Para llegar a esto se introdujeron los discos de MAVU recortados en una placa de pocillos, a cada uno de los cuales se le incorporó 100 μL de la suspensión celular (que equivale aproximadamente a 5×10^5 células). Se incubaron durante 72 horas a 37°C en estufa de CO₂ al 5%. Pasado este tiempo se aspiró el contenido de cada pocillo de forma cuidadosa, se cambió la orientación del disco y se repitió el sembrado, pasando a incubación otras 72 horas (*Imagen 18*). Para comprobar la efectividad de la implantación y viabilidad de las CMPDMs en el entramado reticular de la MAVU, se seleccionaron de manera aleatoria dos muestras para su observación al MEB. Tras realizar el protocolo oportuno de fijación, se llevaron al MEB para efectuar la comprobación (*Imagen 19*).



Imagen 18. Scaffolds de MAVU sumergidas en pocillos con suspensión celular de CMPDMs. Se incubaron 72 horas por cada lado del disco para asegurar la integración.

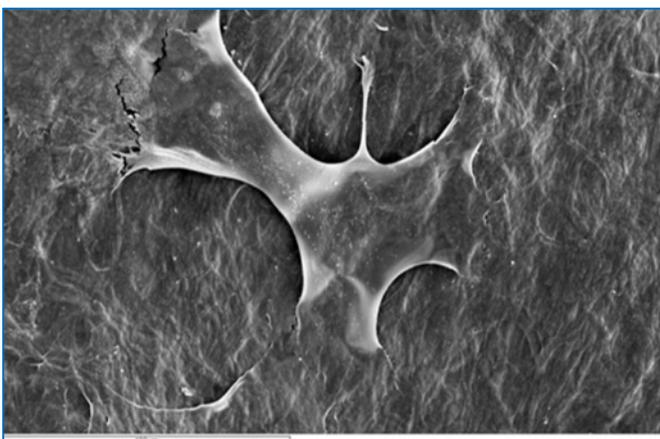


Imagen 19. Imagen obtenida al MEB a 650x de aumento donde se aprecia una CMPDM adherido a la superficie reticular de la MAVU.

3.3.3 Preparación del infiltrado a partir de la suspensión de CMPDMs

Otro de los grupos precisaba en cambio la implantación de las CMPDMs directamente en suspensión, libres de cualquier andamiaje. El preparado celular fue transferido a viales *Eppendorf* de 1,5 mL, tantos como animales fueron asignados al grupo (n=20), que se conservaron a temperatura constante en caja isotérmica durante su transporte al quirófano. Para la infiltración en el defecto del animal se emplearon jeringas de insulina de 1mL (Rays™ Insu-Light, Osimo, Italia). La temperatura de cultivo de 37°C se mantuvo constante en el interior de las jeringas durante las intervenciones mediante una bombilla incandescente térmica orientada.

3.4 LESIONES LINGUALES CON PÉRDIDA MUSCULAR VOLUMÉTRICA (PMV) (HEMIGLOSECTOMIAS)

La lesión con PVM se realizó en toda la muestra de ratas Lewis (n = 80) en condiciones asépticas. Los animales fueron pesados y anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina y Xilacina al 50% a una dosis de 0,1 ml/100 g de peso. A continuación se infiltró 0,1 ml de hidrocloreuro de articaína al 4% con una concentración 1:100.000 de Epinefrina (Ultracain®, Laboratorios Normon S.A., Madrid, España) como anestésico local, de forma periférica a la zona de incisión para lograr una vasoconstricción en el tejido.

El punto de acceso para realizar la hemiglosectomía parcial se situó en el borde lateral izquierdo de la lengua, simétrico respecto de las caras dorsal y ventral, en sus dos tercios anteriores, anterior a la papila circunvalada. La incisión inicial se practicó con un bisturí circular o *punch* de calibre 3 mm, penetrando en el tejido muscular con

una profundidad máxima de 3 mm desde la superficie de la mucosa y teniendo la precaución de no sobrepasar la línea media en sentido transversal (*Imagen 20*).

Tras la extracción del cilindro de tejido y se controló la hemorragia con el electrobisturí (Satelec®, Barcelona, España). De esta manera se consiguió realizar una resección homogénea de tejido muscular en todos los animales, afectando a los músculos hiogloso, estilgloso, geniogloso y a los intrínsecos longitudinal superior, longitudinal inferior y transverso, además de estructuras vasculares (arteria lingual, venas lingual y ranina) y nerviosas (nervio lingual) (*Imagen 21*).

Finalmente, los bordes de la lesión con PVM fueron suturados para conseguir un cierre por primera intención, con puntos simples de hilo reabsorbible poliglactin 910 de 5/0 (Vicryl®, Ethicon Inc, Nueva Jersey, Estados Unidos)(*Kim y cols., 2003*).

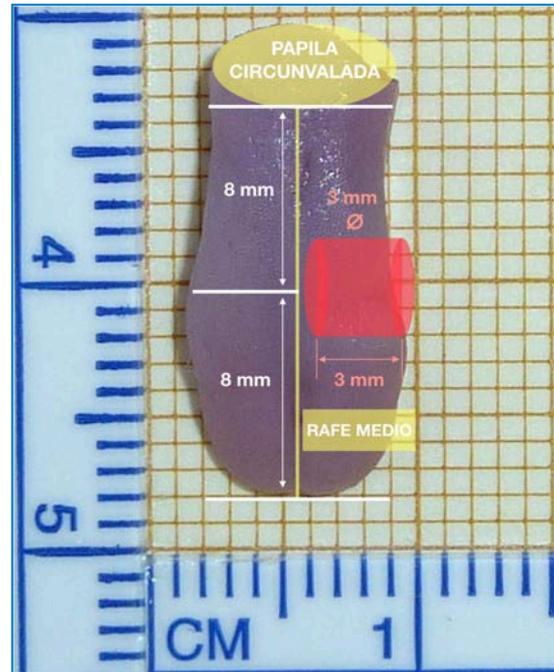


Imagen 20. Diseño de la lesión hemilingual con PVM.



Imagen 21. Lesión hemilingual con PVM después de controlar la hemorragia.

La herida fue lavada con suero fisiológico para limpiar el campo oral. La analgesia postoperatoria se realizó mediante la administración subcutánea de buprenorfina una dosis de 0,05mg/kg.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTALES

La muestra de ratas *Lewis* (n=80) se dividió de forma aleatorizada en 4 grupos experimentales (n=20 por grupo) usando un servicio online (www.randomization.com) en función del tratamiento practicado en la lesión con PVM:

- **Grupo 1 (MAVU + CMPDMs):** después del procedimiento quirúrgico para provocar las lesiones linguales con PVM, el defecto lingual fue rellenado con MAVU porcina cultivada con 5 millones de células/mL y posteriormente suturada (*Figura 13 e Imagen 22*).

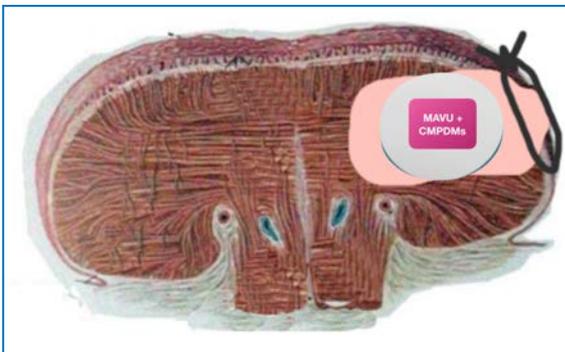


Figura 13. Esquema del procedimiento practicado en el grupo experimental 1 (MAVU + CMPDMs).



Imagen 22. Implantación de la MAVU con CMPDMs cultivadas en el defecto quirúrgico practicado.

- **Grupo 2 (MAVU):** después del procedimiento quirúrgico para provocar las lesiones linguales con PVM, el defecto lingual fue rellenado con el disco de MAVU únicamente, adaptándolo de forma homogénea.
- **Grupo 3 (CMPDMs):** después del procedimiento quirúrgico para provocar las lesiones linguales con PVM, el defecto lingual fue suturado y se efectuó una única infiltración de 0,1 mL de la suspensión celular de CMPDMs.
- **Grupo 4 (Sin tratamiento).** después del procedimiento quirúrgico para provocar las lesiones linguales con PVM, el defecto lingual fue suturado y se efectuó una única infiltración de 0,1 mL solución salina estéril al 0,9%.

3.6 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS

Los animales de experimentación fueron sacrificados por sobredosis de inhalación de CO₂ previa sedación con isoflurano, según las recomendaciones establecidas por el RD 53/2013 en cuanto a aspectos relacionados con la eutanasia en animales de experimentación. El cronograma para el sacrificio de los animales y la toma de muestras (glosectomía total *postmortem* con incisión transversal posterior a la papila circunvalada) se detalla continuación (*Diagrama 3*):

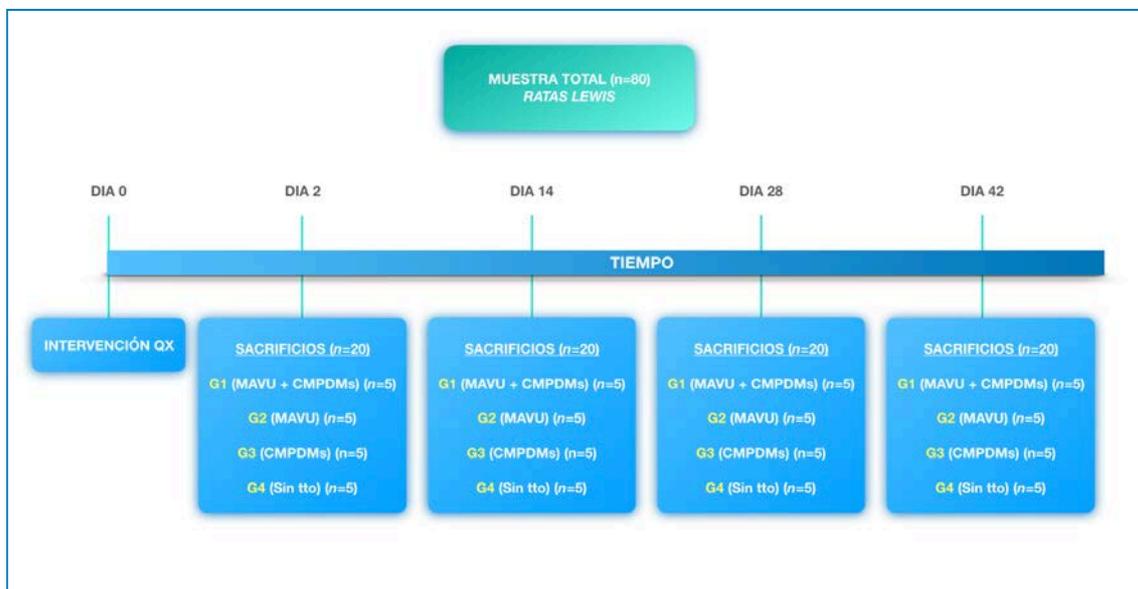


Diagrama 3. Diagrama de la secuencia de sacrificios programados en los diferentes grupos experimentales.

3.7 EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DEL PESO DEL ANIMAL

Con el fin de comprobar una evolución postquirúrgica satisfactoria, se procedió al control del peso en la totalidad de la muestra de ratas Lewis (n=80), en el día 0 de estudio y en el día de eutanasia (*Diagrama 3*). De la comparativa de ambos datos (aumento o pérdida de masa corporal) se infería el dolor intraoral postoperatorio, íntimamente relacionado con la correcta nutrición del animal (*Camacho-Alonso y cols., 2019; Camacho-Alonso y cols., 2005*).

3.9 INCREMENTO DEL PESO LINGUAL POSTOPERATORIO

Acto seguido, las muestras se procesaron para estudiar la recuperación volumétrica mediante su peso. De este modo las lenguas se seccionaron siguiendo el surco central, practicando una incisión en la línea media paralela al eje longitudinal, que dividía el órgano en dos porciones: hemilengua control (derecha) y hemilengua intervenida (izquierda). Ambas fueron pesadas en una balanza digital (GRAM FR, Barcelona España) con una resolución de 0,001g. El estudio de la variable aumento del peso lingual postoperatorio fue calculado como la diferencia de peso en mg entre lado control y operado, que corresponde a la masa de tejido no regenerada a un tiempo de sacrificio dado. Los datos se recogieron en la hoja de registro de cada espécimen.

3.10 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las hemilenguas que contenían el defecto con PVM en sus diferentes fases de cicatrización se sometieron a un estudio histológico exhaustivo. Desde su sección fueron conservadas en una disolución de formaldehído (formalina) al 10% de concentración (Tecnoquim S.L., Murcia, España) durante 24 horas, momento en el cual se sumergieron en parafina para conformar los bloques de corte. Se obtuvieron secciones en el microtomo de 5 μm de grosor, siguiendo una orientación paralela al eje mayor longitudinal, comenzando por la superficie de la cara dorsal avanzando en dirección a la cara ventral. Las secciones iniciales se descartaron, tomando como válida aquella profundidad de corte en la cual el defecto alcanzaba mayor dimensión a nivel transversal hacia la línea media. Los cortes seleccionados según este criterio fueron sometidos a una tinción con H-E y examinados al microscopio óptico con aumentos 20x,

40x y 100x, todas ellos por el mismo patólogo cegado respecto de los grupos a los que pertenecían.

Se estableció un análisis semicuantitativo del grado de inflamación y fibrosis tomando como referencia un sistema de clasificación que recoge de los diferentes estadios de evolución de la respuesta inflamatoria (*Camacho-Alonso y cols., 2009*).

La variable grado de inflamación se calculó en base a la presencia de ciertos tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio como son los linfocitos y los histiocitos. Se propusieron 5 grados:

- Grado 0: Ausencia de inflamación.
- Grado 1: Leve presencia de histiocitos e infiltrado linfocitario.
- Grado 2: Presencia moderada de histiocitos e infiltrado linfocitario.
- Grado 3: Presencia severa de histiocitos e infiltrado linfocitario.
- Grado 4: Cicatrización completa. Pueden encontrarse células inflamatorias.

La variable grado de fibrosis se calculó en base a la presencia de fibroblastos y a los niveles de depósito de colágeno acelular en el lugar de la lesión con PVM a un tiempo determinado (*Luxammechanporn y cols., 2006*). Se establecieron 4 grados:

- Grado 0: Ausencia de fibrosis.
- Grado 1: Leve espesor de fibrosis y deposición de colágeno acelular.
- Grado 2: Moderado espesor de fibrosis y deposición de colágeno acelular.
- Grado 3: Severo espesor de fibrosis y deposición de colágeno acelular.

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). Se realizó un estudio descriptivo de cada variable. Aplicamos el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de Levene, y los datos mostraron una distribución no normal, por lo que la estadística inferencial se realizó mediante tests no paramétricos. Los tests Kruskal-Wallis y Dunn fueron aplicados para el estudio de las variables cuantitativas. La significación estadística fue aceptada para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4

4. RESULTADOS

4.1. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DEL PESO DEL ANIMAL

El orden de menor a mayor pérdida de peso corporal a los 2 días de la cirugía fue MAVU+CMPDMs < CMPDMs < MAVU < control y el orden de mayor a menor aumento de peso a los 14, 28 y 42 días fue MAVU+CMPDMs > CMPDMs > MAVU > control, con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre MAVU+CMPDMs y el resto de grupos en los días 14, 28 y 42. A los 2 días de la cirugía, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p > 0,05$). A los 14, 28 y 42 días los animales cuyas lesiones hemilinguales con PVM fueron tratadas con CMPDMs mostraron un aumento significativamente mayor de peso al compararlos con el grupo control ($p = 0,014$, $p = 0,007$, y $p = 0,007$; respectivamente), y que el grupo MAVU en el día 42 ($p = 0,007$). En los días 28 y 42 los animales tratados con MAVU mostraron un significativo mayor aumento de peso que el grupo control ($p = 0,010$, y $p = 0,007$; respectivamente) (Tabla 1).

Grupos Estudio	Día 2 Mediana (Rango)	Día 14 Mediana (Rango)	Día 28 Mediana (Rango)	Día 42 Mediana (Rango)
MAVU + CMPDMs	-1,00 (-3,00-1,00)	50,00 (47,00-55,00) ^{#,§,†}	100,00 (90,00-105,00) ^{#,§,†}	200,00 (190,00-205,00) ^{#,§,†}
MAVU	-3,00 (-5,00-1,00)	26,00 (20,00-27,00) [*]	79,00 (75,00-82,00) ^{*,†}	175,00 (172,00-178,00) ^{*,§,†}
CMPDMs	-2,00 (-3,00-1,00)	28,00 (23,00-29,00) ^{*,†}	83,00 (78,00-85,00) ^{*,†}	185,00 (180,00-186,00) ^{*,#,†}
Control	-4,00 (-5,00-1,00)	19,00 (16,00-27,00) ^{*,§}	70,00 (67,00-75,00) ^{*,#,§}	150,00 (143,00-156,00) ^{*,#,§}

* Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU+CMPDMs; # Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU; § Diferencia significativa comparada con el grupo CMPDMs; † Diferencia significativa comparada con el grupo Control.

Tabla 1. Comparación de la ganancia postoperatoria de peso (g) entre los diferentes grupos experimentales (Test de Kruskal-Wallis and Dunn).

4.2. ANÁLISIS MACROSCÓPICO MORFOMÉTRICO DE LA REGENERACIÓN LINGUAL

El porcentaje de la superficie dorso-lateral de lengua ocupada por lesión con PVM en orden de menor a mayor fue MAVU+CMPDMs < CMPDMs < MAVU < control en todos los tiempos de estudio, con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre MAVU+CMPDMs y el resto de grupos en los días 2, 14, 28, y 42. En el día 14 los animales cuyas lesiones hemilinguales con PVM fueron tratadas con CMPDMs tuvieron un significativo menor porcentaje de superficie del dorso lingual ocupada por lesiones con PVM que los grupos tratados con MAVU ($p=0,076$) y el grupo control ($p=0,009$), y en los días 28 y 42 con el grupo control exclusivamente ($p= 0,009$ y $p= 0,014$; respectivamente). En los días 14, 28 y 42 los animales tratados con MAVU mostraron un significativo menor porcentaje de superficie del dorso lingual ocupada por lesión con PVM que el grupo control ($p=0,009$, $p=0,009$, $p=0,014$; respectivamente) (Tabla 2) (Imágenes 25 y 26).

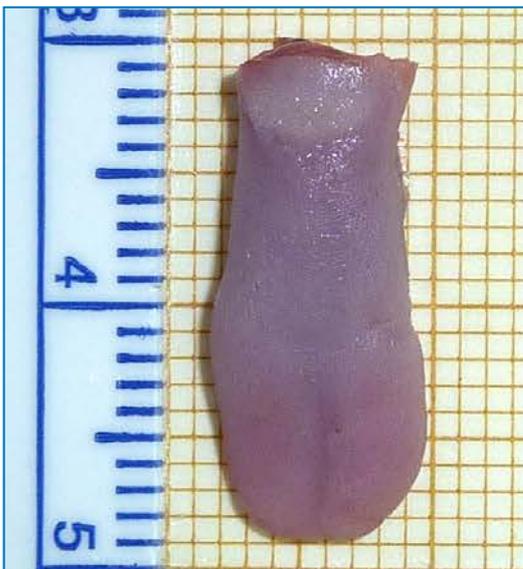


Imagen 25. Lengua tratada con MAVU + CMPDMs a los 28 días de la cirugía (antes de usar el software de morfometría).



Imagen 26. Lengua tratada con infiltración de CMPDMs a los 28 días de la cirugía (antes de usar el software de morfometría).

Grupos Estudio	Día 2 Mediana (Rango)	Día 14 Mediana (Rango)	Día 28 Mediana (Rango)	Día 42 Mediana (Rango)
MAVU + CMPDMs	20,35 (17,65-22,51)#,§,†	15,21 (14,17-16,23)#,§,†	10,19 (9,11-10,93)#,§,†	5,07 (4,11-5,56)#,§,†
MAVU	23,84 (22,95-24,56)*	18,84 (17,24-19,32)*,§,†	15,24 (14,26-15,89)*,†	10,12 (9,11-10,82)*,†
CMPDMs	23,09 (22,16-23,98)*	17,25 (16,26-17,92)*,#,†	14,37 (13,27-14,98)*,†	9,11 (7,85-9,24) *,†
Control	24,01 (23,94-25,00)*	22,45 (21,43-22,77)*,#,§	21,61 (20,41-21,98)*,#,§	20,26 (19,58-20,39) *,#,§

* Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU+CMPDMs; # Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU; § Diferencia significativa comparada con el grupo CMPDMs; † Diferencia significativa comparada con el grupo Control.

Tabla 2. Comparación del porcentaje de de la superficie dorso-lateral de lengua ocupada por la lesión con PVM entre los diferentes grupos experimentales (Test de Kruskal-Wallis and Dunn).

4.3. INCREMENTO DEL PESO LINGUAL POSTOPERATORIO

La diferencia en de peso en mg entre la hemilengua control y la intervenida en orden de menor a mayor fue MAVU+CMPDMs < CMPDMs < MAVU < control en todos los tiempos de estudio, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre MAVU+CMPDMs y el resto de grupos en los días 2, 14, 28, y 42. En el día 14 los animales cuyas lesiones hemilinguales fueron tratadas con CMPDMs mostraron una significativa menor diferencia de peso en mg entre el lado control y el lado operado que los grupos tratados con MAVU ($p=0,009$) y el grupo control ($p=0,009$), y en los días 28 y 42 con el grupo control exclusivamente ($p= 0,009$ y $p= 0,009$; respectivamente). En los días 14, 28, y 42 los animales tratados con MAVU mostraron una significativa menor diferencia de peso en mg entre el lado control y el lado operado que el grupo control ($p=0,009$, $p=0,009$, $p=0,009$; respectivamente) (Tabla 3).

Grupos Estudio	Día 2 Mediana (Rango)	Día 14 Mediana (Rango)	Día 28 Mediana (Rango)	Día 42 Mediana (Rango)
MAVU + CMPDMs	84,29 (81,57-88,32) ^{#,§,†}	72,16 (70,78-74,89) ^{#,§,†}	51,65 (50,59-54,16) ^{#,§,†}	15,33 (11,12-16,23) ^{#,§,†}
MAVU	97,42 (93,26-98,17) [*]	84,14 (83,68-89,25) ^{*,§,†}	60,25 (58,69-63,92) ^{*,†}	25,35 (23,58-27,21) ^{*,†}
CMPDMs	96,26 (92,38-97,18) [*]	79,46 (76,77-81,35) ^{*,§,†}	58,43 (56,37-61,15) ^{*,†}	22,26 (21,14-26,57) ^{*,†}
Control	101,26 (95,28-103,19) [*]	89,37 (93,27-99,14) ^{*,#,§}	95,48 (93,81-96,55) ^{*,#,§}	89,37 (88,57-90,35) ^{*,#,§}

*** Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU+CMPDMs; # Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU; § Diferencia significativa comparada con el grupo CMPDMs; † Diferencia significativa comparada con el grupo Control.**

Tabla 3. Comparación del peso lingual postoperatorio (diferencia en mg entre hemilengua control y hemilengua intervenida) entre los diferentes grupos experimentales (Test de Kruskal-Wallis and Dunn).

4.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El grado de inflamación en orden de menor a mayor fue MAVU+CMPDMs < CMPDMs < MAVU < control en todos los tiempos de estudio, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre MAVU+CMPDMs y los grupos MAVU y control los días 28, y 42. En los días 28 y 42 los animales cuyas lesiones hemilinguales fueron tratadas con CMPDMs mostraron un significativo menor grado de inflamación que el grupo control ($p = 0,031$, y $p = 0,033$; respectivamente) (Imagen 27)(Tabla 4).

El grado de fibrosis en orden de menor a mayor fue MAVU+CMPDMs < CMPDMs < MAVU < control en todos los tiempos de estudio, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre MAVU + CMPDMs y los grupos MAVU y control los días 14, 28, y 42. En los días 14, 28 y 42 los animales cuyas lesiones hemilinguales fueron tratadas con CMPDMs mostraron un significativo menor grado de inflamación que el grupo control ($p = 0,050$, $p = 0,033$, y $p = 0,016$; respectivamente) (Imagen 28)(Tabla 5).

Grupos Estudio	Día 2 Mediana (Rango)	Día 14 Mediana (Rango)	Día 28 Mediana (Rango)	Día 42 Mediana (Rango)
MAVU + CMPDMs	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,00-3,00)	1,00 (0,00-2,00) ^{#,†}	1,00 (0,00-1,00) ^{#,†}
MAVU	3,00 (2,00-3,00)	3,00 (2,00-3,00)	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,00-2,00)
CMPDMs	2,50 (2,00-3,00)	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,00-2,00) [†]	1,00 (0,00-2,00) [†]
Control	3,00 (3,00-3,00)	3,00 (2,00-3,00)	3,00 (2,00-3,00) ^{*,§}	2,00 (2,00-3,00) ^{*,§}

*** Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU+CMPDMs; # Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU; § Diferencia significativa comparada con el grupo CMPDMs; † Diferencia significativa comparada con el grupo Control.**

Tabla 4. Comparación del grado de inflamación entre los diferentes grupos experimentales (Test de Kruskal-Wallis and Dunn).

Grupos Estudio	Día 2 Mediana (Rango)	Día 14 Mediana (Rango)	Día 28 Mediana (Rango)	Día 42 Mediana (Rango)
MAVU + CMPDMs	2,00 (1,00-3,00)	2,00 (1,00-2,00) [†]	1,00 (0,00-2,00) [†]	0,00 (0,00-1,00) [†]
MAVU	3,00 (2,00-3,00)	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,00-3,00)	2,00 (0,00-2,00)
CMPDMs	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (2,00-2,00) [†]	1,00 (0,00-2,00) [†]	1,00 (0,00-1,00) [†]
Control	3,00 (3,00-3,00)	3,00 (2,00-3,00) ^{*,§}	2,00 (2,00-3,00) ^{*,§}	2,00 (1,00-3,00) ^{*,§}

*** Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU+CMPDMs; # Diferencia significativa comparada con el grupo MAVU; § Diferencia significativa comparada con el grupo CMPDMs; † Diferencia significativa comparada con el grupo Control.**

Tabla 5. Comparación del grado de fibrosis entre los diferentes grupos experimentales (Test de Kruskal-Wallis and Dunn).

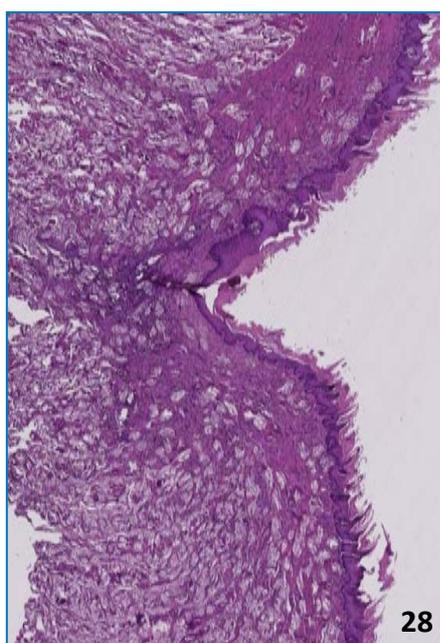


Imagen 27. Observación bajo el microscopio óptico a 40x de aumento en el que se aprecia una respuesta inflamatoria moderada del grupo MAVU+CMPDMs a los 2 días de la cirugía.
Imagen 28. Observación bajo el microscopio óptico a 40x de aumento en el que se aprecia una fibrosis moderada del grupo control a los 28 días de la cirugía.

DISCUSIÓN

5

5. DISCUSIÓN

En el año 2018 fueron registrados un total de 33.950 casos de cáncer de la cavidad oral (CCO) y un total de 6.800 muertes por este tipo de entidad (*Gómez y cols., 2018*). En los últimos años, se ha producido además un aumento de la incidencia del CCO en pacientes jóvenes, observando que del 4-6% se diagnostican en menores de 40 años (*Udeabor y cols., 2012*). Teniendo en cuenta que el 60% de los CCO afectan a la lengua (*Siegel y cols., 2011; Amit y cols., 2013*) y que el tratamiento quirúrgico en la mayoría de las ocasiones provoca una lesión con PVM, bien sea en el caso de tumores linguales en estadíos T1 y T2 que requieren una glosectomía parcial, o bien en tumores avanzados T3 y T4 susceptibles de la práctica de glosectomía total (*Righini y cols., 2019*); las funciones esenciales como la fonación, deglución, masticación y respiración, suelen quedar seriamente afectadas, repercutiendo enormemente en la calidad de vida de los pacientes afectados (*Tong y cols., 2016; Zhang y cols., 2018*).

En los últimos años la ITRM ha ido encaminada a la creación en el laboratorio de matrices acelulares en combinación con el uso de células madre autólogas u obtenidas de mamíferos singénicos, que posteriormente son implantadas para la reparación de la PVM (*Kim y cols., 2003; Luxameechanporn y cols., 2006; Koning y cols., 2009*). Estas técnicas de ITRM, que han sido aplicadas de forma exitosa en la reparación de extremidades y heridas faciales tanto en la población civil como militar (*Levenberg y cols., 2005*) suponen una interesante vía de investigación en la restitución del defecto muscular y la función dinámica en lenguas con lesiones con PVM (*Halum y cols., 2008*).

Este trabajo constituye la primera investigación sobre el uso de un constructo de MAVU porcina y CMPDMs para la regeneración de la musculatura lingual tras una

lesión lingual con PVM lingual. Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian un aumento del peso postoperatorio en los animales tratados con MAVU porcina + CMPDMs (indicando una reducción del dolor bucal), un menor porcentaje de superficie del dorso lingual ocupada por la lesión con PVM, una menor diferencia de peso en mg entre la hemilengua control e intervenida, un menor grado de inflamación crónica y fibrosis, y una mayor presencia de nuevo tejido que en los otros tres grupos de tratamiento a los 2, 14, 18 y 42 días desde la creación de la lesión hemilingual con PVM.

Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, usando la ITRM para la regeneración de lesiones linguales con PVM con CMPDMs de mamíferos singénicos (*Kim y cols., 2003; Luxameechanporn y cols., 2006*) en animales de experimentación. Kim y cols. (*Kim y cols., 2003*) realizaron hemiglosectomías con una resección muscular que se extendía en profundidad hasta el rafe medio y posteriormente hasta el margen anterior de la papila circunvalada manteniendo la mucosa intacta, en un total de treinta ratas Lewis macho. Cuando la incisión fue suturada, se comprobó el potencial regenerativo de músculo esquelético lingual usando un hidrogel rico en colágeno como scaffold que contenía la infiltración de una suspensión de CMPDMs de una rata singénica, comparándolo con el uso exclusivo de hidrogel rico en colágeno y un grupo control al que se le inyectó cloruro sódico. A las seis semanas tras la cirugía, y al igual que ocurría en este estudio al usar MAVU porcina + CMPDMs, las lenguas hemiglosectomizadas tratadas con hidrogel rico en colágeno + CMPDMs mostraron una menor diferencia de peso en mg entre el lado control y el lado operado, una mayor presencia de nuevo tejido con áreas de tejido musculoesquelético alrededor de islotes de hidrogel residual, mayor evidencia de neovascularización y regeneración nerviosa

(mediante el análisis histológico con tinción de H-E, tricrómico de Masson e inmunohistoquímico con anti-Desmina).

Luxameechannporn y cols., (*Luxameechannporn y cols., 2016*) realizaron hemiglosectomías con una resección muscular idéntica a la de los autores anteriores y preservando también las capas mucosa y submucosa, en un total de veintiocho ratas Lewis hembras. Previamente a la sutura de la heridas, catorce lesiones con PVM fueron rellenadas con una matriz de gel de colágeno + CMPDMs y las otras catorce fueron rellenadas exclusivamente con la matriz de gel de colágeno. A las seis semanas tras la cirugía, y al igual que los resultados obtenidos con el grupo experimental MAVU porcina + CMPDMs del presente estudio, las lenguas hemiglosectomizadas tratadas con gel de colágeno + CMPDMs confirmaron un menor grado de inflamación crónica y fibrosis, y una mayor cantidad de músculo esquelético neoformado (mediante el estudio histológico con tinción de HE, e inmunohistoquímica con anti-Desmina).

Los resultados obtenidos indicaron que la aplicación exclusiva de CMPDMs también favorece la regeneración de lesiones linguales con PVM (aunque con menor potencial que el constructo de MAVU porcina + CMPDMs). En este sentido, Plowman y cols. (*Plowman y cols., 2014*) observaron en un modelo sobre ovejas Dorper con lenguas denervadas, que al implantar células madre derivadas de músculo obtenidas de una biopsia previa del músculo esternoideomastoideo, se producía un incremento de fibras musculares, se atenuaba la atrofia muscular, se generan nuevas miofibras, y se producía un incremento de la fuerza contráctil lingual. Incluso se ha comprobado que la administración de células multipotenciales mucosas y estromales de origen humano reducen la fibrosis lingual en ratas hemiglosectomizadas (*Roh y cols., 2017; Vahabzadeh-Hagh y cols., 2018*).

A raíz de nuevos avances, la ITRM se ha beneficiado del uso de nuevas estructuras tridimensionales porosas que cumplen no solo un papel pasivo de soporte mecánico y protección física de las células madre cultivadas en su interior, si no que también participan de manera activa en el proceso de regeneración a través de una cascada de señales extracelulares inducidas por los componentes que poseen. Al tradicional scaffold empleado en este tipo de tratamientos a base de colágeno se añaden otros como son las matrices de fibrina, ácido hialurónico, ácido poliglicólico y otros polímeros naturales y sintéticos (hidrogel). Características como la porosidad (entendida como la densidad de espacios intrarreticulares altamente interconectados) responsable de permitir la migración celular, intercambio de fluidos, crecimiento tisular y neovascularización, constituyen un aspecto importante en la elección del scaffold para la regeneración del tejido óseo (*Kim y Kim, 2019; Norouz y cols., 2019*). Sin embargo, en la regeneración de tejidos blandos, el nivel de porosidad no desempeña un papel tan importante como si lo hace la configuración tridimensional intrínseca, la cual debería imitar al máximo la estructura nativa del tejido blando a reconstruir (*Sivayohan y cols., 2013*). En este sentido, la MAVU porcina está compuesta por una estructura tridimensionalmente homogénea altamente rica en colágeno, con propiedades de elasticidad, contractibilidad y resistencia similares al músculo esquelético de mamíferos. Además, la presencia en esta estructura acelular rica en colágeno, de diversas moléculas tales como enzimas, factores de crecimiento, y proteínas de adhesión celular permiten a este scaffold cumplir su función de movilizar y reclutar los mioblastos sembrados en él. Finalmente, su carácter acelular y libre de antígenos que impide la posibilidad de respuesta inmune del receptor (enfermedad injerto contra huésped) lo convierten en un scaffold ideal para la regeneración de músculo esquelético (*Kenar y cols., 2019*).

Una de las principales limitaciones del presente estudio fue la imposibilidad de comparar nuestros resultados con otros artículos de la literatura científica. Aunque la MAVU porcina ha sido empleada con éxito como scaffold en combinación con mioblastos para la regeneración de lesiones con PVM en diferentes músculos (*Machingal y cols., 2011; Corona y cols., 2012; Aurora y cols., 2015; Aurora y cols., 2016*), esta es la primera investigación sobre la aplicación de un constructo de MAVU porcina y CMPDMs para la regeneración de la musculatura lingual en lesiones con PVM. Estudios similares realizados en lengua, se centran en el uso de la MAVU con una presentación en polvo aplicada de forma tópica para la regeneración de heridas superficiales de mucosa lingual (sin afectación muscular) en ratas Sprague-Dawley (*Camacho-Alonso y cols., 2019*).

En este sentido, *Aurora y cols., (Aurora y cols., 2015; Aurora y cols., 2016)* utilizaron la MAVU porcina exclusivamente (sin ser cultivada con CMPDMs) para la regeneración de defectos musculotendinosos con PVM en el músculo gastrocnemio y tendón de Aquiles, y en el músculo tibial anterior en ratas Lewis. Ocho semanas después comenzar la regeneración de la lesión musculotendinosa, la MAVU porcina fue completamente reabsorbida sin remodelación tisular, sugiriendo que la aplicación de este scaffold de forma exclusiva no es adecuada para la reparación clínica de lesiones musculotendinosas. En relación a las lesiones con PVM en el músculo tibial anterior, ocho semanas después del tratamiento, la MAVU porcina implantada se remodeló a un tejido fibrótico que mejoró la función muscular que confirmó una reparación y no una regeneración muscular en sentido estricto. Nuestros resultados con el uso de MAVU porcina aislada, indicaron una mayor regeneración lingual de la lesión con PVM que en los animales del grupo control. Resultados positivos con el uso exclusivo de MAVU han sido publicados incluso en humanos; *Sicari y cols., (Scicari y cols., 2014)* en el año 2014,

aplicaron la MAVU porcina a cinco pacientes con lesiones con PVM en el músculo tibial anterior, cuádriceps, y músculo tibial lateral. Las biopsias musculares obtenidas entre las 5 y 32 semanas después de la regeneración, mostraron evidencias de CD146+, NG2+, PVSCs+ y desmina+.

El uso de constructos basados en MAVU porcina con células madre ha sido usado con éxito para la regeneración de otros músculos esqueléticos en mamíferos. Ciertos autores como Machingal y cols., en el año 2011 (*Machingal y cols., 2011*) y Corona y cols., en el año 2012 (*Machingal y cols., 2012*) trataron lesiones con PVM en el músculo dorsal ancho de ratones Nude (nu/nu) con el uso simultáneo de MAVU y células progenitoras musculares obtenidas de los músculos sóleo y tibial anterior de ratas Lewis y ratones Nude (nu/nu) singénicos. Ocho semanas después de la regeneración, los defectos musculares sometidos a dicho tratamiento evidenciaron la presencia de miofibras desmina + y signos de neovascularización.

Este estudio presenta diversas limitaciones. En primer lugar, nuestros resultados no pueden ser comparados con otros estudios de la literatura científica puesto que se trata del primer ensayo del que se tenga constancia en el que se emplea la MAVU porcina y CMPDMs para la regeneración de lesiones linguales con PVM. Por otro lado, se requieren futuros estudios que apliquen el binomio de MAVU porcina y CMPDMs tanto *in vivo* en animales de experimentación recurriendo a muestras de mayor tamaño, como en ensayos clínicos en humanos.

CONCLUSIONES

6

6. CONCLUSIONES

1. El dolor intraoral, cuantificado indirectamente por el menor aumento de peso postoperatorio en ratas Lewis hemiglosectomizadas, fue menor en las tratadas con MAVU porcina + CMPDMs, tanto a los 2, 14, 28, y 42 días.
2. La superficie dorso-lateral no regenerada de la hemilengua con PVM en ratas Lewis hemiglosectomizadas fue menor en las tratadas con MAVU porcina + CMPDMs, tanto a los 2, 14, 28, y 42 días.
3. El incremento de peso postoperatorio en la hemilengua intervenida en ratas Lewis hemiglosectomizadas fue mayor en las tratadas con MAVU porcina + CMPDMs, tanto a los 2, 14, 28, y 42 días.
4. El grado de inflamación lingual en ratas Lewis hemiglosectomizadas fue menor en las tratadas con MAVU porcina + CMPDMs, tanto a los 2, 14, 28, y 42 días.
5. El grado de fibrosis lingual en ratas Lewis hemiglosectomizadas fue menor en las tratadas con MAVU porcina + CMPDMs, tanto a los 2, 14, 28, y 42 días.

BIBLIOGRAFÍA

7

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta Feria M, Infante Cossío P, García-Perla A, Torres Carranza E, Belmonte Caro R. Colgajo libre radial de doble paleta cutánea para reconstrucción de lengua y suelo de boca. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2006;28:287-294.
2. Adriana J, Jochen H. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat* 2017;40:328-332.
3. Amit M, Yen TC, Liao CT, Chaturvedi P, Agarwal JP, Kowalski LP et al. Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: An international collaborative study. *Cancer* 2013;119:4242-8.
4. Aurora A, Roe JL, Corona BT, Walters TJ. An acellular biologic scaffold does not regenerate appreciable de novo muscle tissue in rat models of volumetric muscle loss injury. *Biomaterials* 2015;67:393-407.
5. Aurora A, Corona BT, Walters TJ. A Porcine Urinary Bladder Matrix Does Not Recapitulate the Spatiotemporal Macrophage Response of Muscle Regeneration after Volumetric Muscle Loss Injury. *Cells Tissues Organs* 2016;202:189-201.
6. Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H et al; Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol* 2008;13:220-8.
7. Arshi A, Nakashima Y, Nakano H, Eaimkhong S, Evseenko D, Reed J et al. Rigid microenvironments promote cardiac differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Sci Technol Adv Mater* 2013;14:pii025003.

8. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol* 2004;12:367-77.
9. Beachler DC, Waterboer T, Pierce Campbell ChM, Ingles DJ, Kuhs KA, Nyitray AG et al. HPV16 E6 seropositivity among cancer-free men with oral, anal or genital HPV16 infection. *Papillomavirus Res* 2016;2:141-144.
10. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:608-16.
11. Bozdogan SC, Yuksel MK, Demirel T. Adult Stem Cells and Medicine. *Adv Exp Med Biol* 2018;1079:17-36.
12. Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13:E544-8.
13. Brown BN, Chung WL, Pavlick M, Reppas S, Ochs MW, Russell AJ. Extracellular matrix as an inductive template for temporomandibular joint meniscus reconstruction: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:e488-505.
14. Brown JS, Rogers SN, Lowe. A comparison of tongue and soft palate squamous cell carcinoma treated by primary surgery in terms of survival and quality of life outcomes. *Int J oral Maxillofac Surg* 2006;35:208-14.
15. Brunotto M, Zarate AM, Bono A, Barra JL, Berra S. Risk genes in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of last 5 years. *Oral Oncol* 2014;50:178-88.
16. Bunaprasert T, Hadlock T, Marler J, Kobler J, Cowan D, Faquin W et al. Tissue engineered muscle implantation for tongue reconstruction: a preliminary report. *Laryngoscope* 2003;113:1792-7.

17. Callanan A, Davis NF, McGloughlin TM, Walsh MT. Development of a rotational cell-seeding system for tubularized extracellular matrix (ECM) scaffolds in vascular surgery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;102:781-8.
18. Camacho-Alonso F, López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Effects of scalpel (with and without tissue adhesive) and cryosurgery on wound healing in rat tongues. *Oral Surg oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:e58-e63.
19. Camacho-Alonso F, Torralba-Ruiz MR, García-Carrillo N, Lacal-Luján J, Martínez-Díaz F, Sánchez-Siles M. Effects of topical applications of porcine acellular urinary bladder matrix and *Centella asiatica* extract on oral wound healing in a rat model. *Clin Oral Investig* 2019;23:2083-95.
20. Camisasca DR, Silami MA, Honorato J, Dias FL, de Faria PA, Lourenco Sde Q. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with and without recurrence. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2011;73:170-6.
21. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013;31:4550-9.
22. Chen BS, Xie H, Zhang SL, Geng HQ, Zhou JM, Pan J et al. Tissue engineering of bladder using vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells. *Int J Artif Organs* 2011;12:1137–1146.
23. Cheng YS, Rees T, Wright J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. *Clin Transl Med* 2014;3:3.
24. Cheng HL, Loai Y, Beaumont M, Farhat WA. The acellular matrix (ACM) for bladder tissue engineering: A quantitative magnetic resonance imaging study. *Magn Reson Med* 2010;64:341-8.

25. Chun SY, Lim GJ, Kwon TG, Kwak EK, Kim BW, Atala A et al. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials* 2007;28:4251-6.
26. Copelli C, Tewfik K, Cassano L, Pederneschi N, Cantazaro S, Manfuso A et al. Management of free flap failure in head and neck surgery. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2017;37:387-92.
27. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:157-60.
28. Corona BT, Machingal MA, Criswell T, Vadhavkar M, Dannahower AC, Bergman C et al. Further development of a tissue engineered muscle repair construct in vitro for enhanced functional recovery following implantation in vivo in a murine model of volumetric muscle loss injury. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1213-28.
29. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck* 2008;30:75-84.
30. Dahms SE, Piechota HJ, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. *Br J Urol* 1998;82:411-9.
31. Dalesio NM, Barreto Ortiz SF, Pluznick JL, Berkowitz. Olfactory, Taste and Photo Sensory Receptors in Non-sensory Organs: It Just Makes Sense. *Front Physiol* 2018;9:1673.

32. de Vicente JC, de Villalaín L, Torre A, Peña I. Microvascular free tissue transfer for tongue reconstruction after hemiglossectomy: a functional assessment of radical forearm versus anterolateral thigh flap. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:2270-5.
33. Eberly D, Atala A, Yoo JJ. One and four layer acellular bladder matrix for facial tissue reconstruction. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:741-51.
34. el-Kassaby A, AbouShwareb T, Atala A. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures. *J Urol* 2008;179:1432-6.
35. El-Motfy SK. Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: an update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014;19:e377-85.
36. Fan Y, Zheng L, Mao MH, Huang MW, Liu SM, Zhang J et al. Survival analysis of oral squamous cell carcinoma in a subgroup of young patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:8887-91.
37. Farhat WA, Chen J, Sherman C, Catwright L, Bahoric A, Yeger H. Impact of fibrin glue and urinary bladder cell spraying on the in-vivo acellular matrix cellularization: a porcine pilot study. *Can J Urol* 2006;13:3000-8.
38. Farquhar D, Tanner A, Masood M, Patel S, Hackman T, Olshan A et al. Oral tongue carcinoma among young patients: An analysis of risk factors and survival. *Oral Oncol* 2018;84:7-11.
39. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;144:1941-1953.

-
40. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403.
41. Freytes DO, Tullius RS, Badylak SF. Effect of storage upon material properties of lyophilized porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2006;78:327–333.
42. Frykberg RG, Cazzell SM, Arroyo-Rivera J, Tallis A, Reyzelman AM, Saba F et al. Evaluation of tissue engineering products for the management of neuropathic diabetic foot ulcers: an interim analysis. *J Wound Care* 2016;25:S18-25.
43. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2017;23:515-528.
44. Gamez ME, Kraus R, Hinni ML, Moore EJ, Ma DJ, Ko SJ et al. Treatment outcomes of squamous cell carcinoma of the oral cavity in young adults. *Oral Oncol* 2018;43-48.
45. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16 negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:407-20.
46. Gu X, Coates PJ, Boldrup L, Wang L, Krejci A, Hupp T et al. Copy number variation: A prognostic marker for young patients with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *J Oral Pathol Med* 2019;48:24-30.
47. Gubpta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* 2016;91:13-23.

48. Halum SL, Hiatt KK, Naidu M, Sufyan AS, Clapp DW. Optimization of autologous muscle stem cell survival in the denervated hemilarynx. *Laryngoscope* 2008;118:1308-1312.
49. Hanken H, Kraatz J, Smeets R, Heiland M, Assaf AT, Blessmann M et al. The detection of oral pre-malignant lesions with an autofluorescence based imaging system (VELscope™) - a single blinded clinical evaluation. *Head Face Med* 2013;9:23.
50. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:777-89.
51. Haughey BH, Beggs JC, Bong J, Genden EM, Bucker A. Microneurovascular allotransplantation of the canine tongue. *Laryngoscope* 1999;109:1461-70.
52. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001;7:349-54.
53. Huang T, Liu H, Zhang P, Zhao Y. Effect of induction chemotherapy on the quality-of-life in patients with advanced stage tongue cancer by a prospective study. *J Int Med Res* 2018;46:1461-1466.
54. Huebsch N, Lippens E, Lee K, Metha M, Koshy ST, Darnell MC et al. Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation. *Nat Mater* 2015;14:1269-77.

-
55. Infante-Cossio P, Gonzalez-Cardero E, Lopez-Martos R, Nuñez-Vera V, Olmos-Juarez E, Ruiz-Moya A et al. Infrahyoid flap in oropharyngeal reconstruction following carcinoma resection: A study of 6 patients and literature review. *Oncol Lett* 2016;11:3493-3500.
56. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2017;36:411-423.
57. Kanematsu A, Yamamoto S, Noguchi T, Ozeki M, Tabata Y, Ogawa O. Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor. *J Urol* 2003;170:1633-8.
58. Kenar H, Ozdogan CY, Dumlu C, Doger E, Kose GT, Hasirci V. Microfibrous scaffolds form poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) blended with xeno-free collagen/hyaluronic acid for improvement of vascularization in tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;97:31-44.
59. Khariwala SS, Carmella SG, Stepanov I, Fernandes P, Lassig AA, Yueh B et al. Elevated levels of 1-hydroxypyrene and N'-nitrosonornicotine in smokers with head and neck cancer: A matched control study. *Head Neck* 2013;35:1096-100.
60. Kim J, Hadlock T, Cheney M, Varvares M, Marler J. Muscle tissue engineering for partial glossectomy defects. *Arch Facial Plast Surg* 2003;5:403-7.
61. Kim JS, Kaminsky AJ, Summitt JB, Thayer WP. New Innovations for Deep Partial-Thickness Burn Treatment with ACell MatriStem Matrix. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016;5:546-52.
62. Ko AB, Lavertu P, Rezaee RP. Double bilobed radial forearm free flap for anterior tongue and floor-of-mouth reconstruction. *Ear Nose Throat J* 2010;89:177-9.

-
63. Kochupura PV, Azeloglu EU, Kelly DJ, Doronin SV, Badylak SF, Krukenkamp IB et al. Tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix provides regional mechanical function. *Circulation* 2005;112:1144–9.
64. Koning M, Harmsen MC, van Luyn MJ, Werker PM. Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2009;3:407-415.
65. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral Cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther* 2016;12:458-63.
66. Lanteri Parcells A, Abernathie B, Datiashvili R. The use of urinary bladder matrix in the treatment of complicated open wounds. *Wounds* 2014;26:189-96.
67. Lavasani M, Lu A, Thompson SD, Robbins PD, Huard J, Niedernhofer LJ. Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol Biol* 2013;976:53-65.
68. Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 2005;23:879-884.
69. Licitra L, Zigon G, Gatta G, Sánchez MJ, Berrino F, EUROCCARE Working Group. Human papillomavirus in HNSCC: a European epidemiologic perspective. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008;22:1143-53.
70. Li F, Li W, Johnson S, Ingram D, Yoder M, Badylak S. Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells. *Endothelium* 2004;11:199–206.

71. Li J, Wang W, Li J, Rexiati M, An H, Wang F et al. The histocompatibility research of hair follicle stem cells with bladder acellular matrix. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e4979.
72. Liu L, Deng L, Wang Y, Ge L, Chen Y, Liang Z. Porcine urinary bladder matrix-polypropylene mesh: a novel scaffold material reduces immunorejection in rat pelvic surgery. *Int Urogynecol J* 2012;23:1271-8.
73. Loai Y, Yeger H, Coz C, Antoon R, Islam SS, Moore K et al. Bladder tissue engineering: tissue regeneration and neurovascularization of HA-VEGF-incorporated bladder acellular constructs in mouse and porcine animal models. *J Biomed Mater Res A* 2012;94:1205-15.
74. Luxameechanporn T, Hadlock T, Shyu J, Cowan D, Faquin W, Varvares M. Successful myoblast transplantation in rat tongue reconstruction. *Head Neck* 2006;28:517-24.
75. Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannahower A et al. A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2291-303.
76. Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol* 2014;48:1-10.
77. Manikandan M, Deva Magendrha Rao AK, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med* 2015;44:792-800.

-
78. Marttila E, Thoren H, Thornwall J, Viitikko A, Wilkman T. Complications and loss of free flaps after reconstructions for oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2018;56:835-840.
79. Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, Carlson EC. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sciences* 1975;17:1721–1732.
80. Mitutsova V, Yeo WWY, Davaze R, Franckhauser C, Hani EH, Abdullah S et al. Adult muscle-derived stem cells engraft and differentiate into insulin-expressing cells in pancreatic islets of diabetic mice. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:86.
81. Montinaro V, Boston SE. Tongue rotation for reconstruction after rostral hemiglossectomy for excision of a liposarcoma of the rostral quadrant of the tongue in a dog. *Can Vet J* 2013;54:591-4.
82. Moon du G, Christ G, Suitzel JD, Atala A, Yoo JJ. Cyclic mechanical preconditioning improves engineered muscle contraction. *Tissue Eng A* 2008;14:473-82.
83. Motgi AA, Chavan MS, Diwan NN, Chowdhery A, Channe PP, Shete MV. Assessment of cytogenic damage in the form of micronuclei in oral epithelial cells in patients using smokeless and smoked form of tobacco and non-tobacco users and its relevance for oral cancer. *J Cancer Res Ther* 2014;10:165-70.
84. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck* 2017;39:297-304.
85. Ota T, Gilbert TW, Badylak SF, Schwartzman D, Zenati MA. Electromechanical characterization of a tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:979–85.

-
86. Ota T, Gilbert TW, Schwartzman D, McTiernan CF, Kitajima T, Ito Y et al. A fusion protein of hepatocyte growth factor enhances reconstruction of myocardium in a cardiac patch derived from porcine urinary bladder matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:1309-17.
87. Ota T, Takekoshi S, Takagi T, Kitatani K, Toriumi K, Kojima T et al. Notch signaling may be involved in the abnormal differentiation of epidermal keratinocytes in psoriasis. *Acta Histochem Cytochem* 2014;47:175-83.
88. Paderno A, Morello R, Piazza C. Tongue carcinoma in young adults: a review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2018;38:175-180.
89. Park JO, Jung SL, Joo YH, Jung CK, Cho KJ, Kim MS. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in the assessment of tumor invasion depth in oral/oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2011;47:381-6.
90. Parekh A, Mantle B, Banks J, Swartz JD, Badylak SF, Dohar JE et al. Repair of the Tympanic Membrane with Urinary Bladder Matrix. *Laryngoscope* 2009;119:1206-13.
91. Parikh HK, Rao RS, Sukhthankar P, Deshmane VH, Parikhi DM, Surgery in Early Cancer of the Oral Tongue (T1-2). Wide Excision Versus Hemiglossectomy. *IJO & HNS* 1998;50:349-53.
92. Patel SC, Carpenter S, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol* 2011;11:1488-94.
93. Pessôa LVF, Bressan FF, Freude KK. Induced pluripotent stem cells throughout the animal kingdom: Availability and applications. *World J Stem Cells* 2019;11:491-505.

-
94. Pimentel-Parra GA, Murcia-Ordoñez B. Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatol Reprod Hum* 2017;31:28-33.
95. Plowman EK, Bijangi-Vishehsaraei K, Halum S, Cates D, Hanenberg H, Domer AS, et al. Autologous myoblasts attenuate atrophy and improve tongue force in a denervated tongue model: a pilot study. *Laryngoscope* 2014;124:E20-6.
96. Pokrywczynska M, Gubauska I, Drewa G, Drewa T. Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: the state of the art and future directions. *Biomed Res Int* 2015; 2015:613439.
97. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2014;50:380-6.
98. Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, J Huard J. Stem Cells for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. *Clin Sports Med*. 2009;28:1-11.
99. Remlinger NT, Gilbert TW, Yoshida M, Guest BN, Hashizume R, Weaver ML et al. Urinary bladder matrix promotes site appropriate tissue formation following right ventricle outflow tract repair. *Oganogenesis* 2013;9:149-60.
100. Righini S, Festa BM, Bonanno MC, Colombo V, Luca N. Dynamic tongue reconstruction with innervated gracilis musculocutaneous flap after total glossectomy. *Laryngoscope* 2019;129:76-81.
101. Rider P, Kačarević ŽP, Alkildani S, Retnasingh S, Barbeck M. Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *J Tissue Eng* 2018;9:2041731418802090.
102. Roh JL, Jang H, Lee J, Kim EH, Shin D. Promotion of oral surgical wound healing using autologous mucosal cell sheets. *Oral Oncol* 2017;69:84-91.

-
103. Rosario DJ, Reilly, GC, Ali Salah E, Glover M, Bullock AJ, Macneil S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regen Med* 2008;3:145-56.
104. Sambandham T, Masthan KM, Kumar MS, Jha A. The application of vizilite in oral cancer. *J Clin Diagn Res* 2013;7:185-6.
105. Sanders I, Mu L. A three-dimensional atlas of human tongue muscles. *Anat Rec (Hoboken)* 2013;296:1102-14.
106. Schaap MW, Uilenreef JJ, Mitsogiannis MD, van't Klosser JG, Arndt SS, Hellebrekers LJ. Optimizing the dosing interval of buprenorphine in a multimodal postoperative analgesic strategy in the rat: minimizing side-effects without affecting weight gain and food intake. *Lab Anim* 2012;46:287-92.
107. Seetheraman R, Mahmood A, Kshatriya P, Patel D, Srivastava A. An Overview on Stem Cells in Tissue Regeneration. *Curr Pharm Des* 2019;25:2086-2098.
108. Shanti M, Arlene AF. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2016;91:386-396.
109. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
110. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *Ca Cancer J Clin* 2017;67:51-64.

-
111. Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, Kuwajima D, Kodama S, Nishioka T et al. Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2019;54:283-294.
112. Sicari BM, Rubin JP, Dearth CL, Wolf MT, Ambrosio F, Boninger M et al. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. *Sci Transl Med* 2014;6:234ra58.
113. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics. 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:212-36.
114. Sivayoham E, Saunders R, Derby B, Woolford T. Current concepts and advances in the application of tissue engineering in otorhinolaryngology and head and neck surgery. *J Laryngol Otol* 2013;127:114-120.
115. Strauss RA, Kain NJ. Tongue flaps. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2014;26:313-25.
116. Song L, Murphy SV, Yang B, Xu Y, Zhang Y, Atala A. Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20:163-72.
117. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 2016;25:829-48.
118. Sung B, Krieger J, Yu B, Kim MH. Colloidal gelatin microgels with tunable elasticity support the viability and differentiation of mesenchymal stem cells under pro-inflammatory conditions. *J Biomed Mater Res A* 2018;106:2753-61.
119. Tanaka TI, Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *Dent Clin North Am* 2018;62:111-120.

-
120. Tong XJ, Tang ZG, Shan ZF, Guo XC. The anterolateral thigh flap for soft tissue reconstruction in patients with tongue squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 2016;14:213.
121. Udeabor SE, Rana M, Wegener G, Gellrich NC, Eckart AM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head Neck Oncol* 2012;4:28.
122. Urken ML, Moscoso JF, Lawson W, Briller HF. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1994;120:589-601.
123. Vahabzadeh-Hagh AM, Goel AN, Frederick JW, Berke GS, Long JL. Transplanted human multipotent stroma cells reduce acute tongue fibrosis in rats. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2018;3:450-456.
124. Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials* 2010;31:7475-84.
125. Vega C, León X, Cervelli D, Pons G, López S, Fernández M, et al. Total or subtotal glossectomy with microsurgical reconstruction: functional and oncological results. *Microsurgery* 2011;31:517-23.
126. Wang B, Zhang S, Yue K, Wang XD. The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chin J Cancer* 2013;32:614-8.
127. Wang JW, Liou AK, Ren ZH, Zhang L, Brown BN, Cui XT, et al. Neurorestorative effect of urinary bladder matrix-mediated neural stem cell transplantation following traumatic brain injury in rats. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12:413-25.

-
128. Watson RA, Tsakok MT. Oligodendrocyte progenitor cells: a missed opportunity. *J Neurotrauma* 2012;29:2593-4.
129. Weckx A, Riekert M, Grandoch A, Schick V, Zoller JE, Kreppel M. Time to recurrence and patient survival in recurrent oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2019;94:8-13.
130. Xu Q, Wang C, Li B, Kim K, Li J, Mao M et al. The impact of age on oral squamous cell carcinoma: A longitudinal cohort study of 2,782 patients. *Oral Dis* 2019;25:730-741.
131. Yang XD, Zhao SF, Zhang Q, Wang YX, Li W, Hong XV et al. Use of modified upper arm free flap for reconstruction of soft tissue defect after resection of oral cancer. *Head Face Med* 2016;12:9.
132. Zhang PP, Meng L, Shen J, Liu H, Zhang J, Xiang X, et al. Free radial forearm flap and anterolateral thigh flap for reconstruction of hemiglossectomy defects: A comparison of quality of life. *J Craniomaxillofac Surg* 2018;46:2157-2163.
133. Zhen Y, Wang JG, Tao D, Wang HJ, Chen WL. Efficacy survey of swallowing function and quality of life in response to therapeutic intervention following rehabilitation treatment in dysphagic tongue cancer patients. *Eur J Oncol Nurs* 2012;16:54-8.
134. Zhou L, Yang B, Sun C, Qiu X, Sun Z, Chen Y, et al. Coadministration of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor with bladder acellular matrix enhances smooth muscle regeneration and vascularization for bladder augmentation in a rabbit model. *Tissue Eng Part A* 2013;19:264-76.

135. Zhu WD, Xu YM, Feng C, Fu Q, Song LJ. Different bladder defects reconstructed with bladder acellular matrix grafts in a rabbit model. *Urologia* 2011;50:1420-5.

ANEXOS

8