



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
Área de Histología
Programa de Doctorado Biomedicina

**Volumetric skeletal muscle loss reconstructed by
tissue engineering**

***Reconstrucción por ingeniería tisular de pérdidas
volumétricas de músculo esquelético***

Fernando Leiva-Cepas

Córdoba, 15 de octubre de 2019

DIRECTORES: PROF. DR. D. JOSÉ PEÑA AMARO y DR. D. RAFAEL VILLALBA MONTORO

TITULO: *RECONSTRUCCIÓN POR INGENIERÍA TISULAR DE PÉRDIDAS
VOLUMÉTRICAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO*

AUTOR: *Fernando Leiva Cepas*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

De acuerdo con las Directrices para la obtención de la mención internacional en las tesis doctorales de la Universidad de Córdoba, en la presente Tesis Doctoral los siguientes apartados (o parte de ellos) han sido redactados en inglés:

-Summary

-Discusión: About abnormal histological features in the neo-muscle generated in the VML lesion, and Futures lines of research.

-Conclusions



TÍTULO DE LA TESIS: Reconstrucción por ingeniería tisular de pérdidas volumétricas de músculo esquelético.

DOCTORANDO: D. Fernando Leiva Cepas

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Desde el inicio por parte del doctorando de su Plan de Formación y Plan de Investigación en 2014 el doctorando viene desarrollando, compaginada con su formación médica especializada, una activa participación como miembro de Grupo de Investigación en Regeneración Muscular (REGMUS CTS-985) como se recoge en todas las memorias de seguimiento presentadas. Esta colaboración le ha permitido formarse en la metodología, instrumentación y técnicas específicas en el campo de la histología e histopatología del músculo esquelético. Su formación se ha perfeccionado en el aprendizaje en las técnicas de preparación de biomateriales para ingeniería tisular en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco Sectorial de Tejidos (Córdoba).

Su capacitación doctoral se ha completado con una estancia internacional de 3 meses en el *Dubowitz Neuromuscular Centre* (Institute of Neurology, University College of London, Great Ormond Street Hospital for Children. National Health System (NHS), UK) bajo la supervisión de Rahul Phadke, Consultant Neuropathologist.

El tema abordado en la tesis es, desde nuestro punto de vista, de una considerable importancia y puede ser de interés clínico por su traslacionalidad; hoy día cobran más importancia las estrategias terapéuticas que tienen como fundamento la medicina regenerativa.

La realización de esta tesis doctoral ha requerido de las autorizaciones pertinentes del Comité ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba y la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera, así como del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. El trabajo se ha desarrollado

satisfactoriamente y de forma coordinada dada la necesidad de la participación y/o colaboración en determinadas fases del desarrollo experimental y técnicas de estudio de otros especialistas.

El análisis de la información obtenida como consecuencia del estudio en el área temática y de los resultados obtenidos de las investigaciones desarrolladas en esta tesis doctoral ha permitido que se deriven las siguientes aportaciones:

Artículos

Leiva-Cepas F, Jimena I, Ruz-Caracuel I, Luque E, Villalba R, Peña-Amaro J. *Histology of skeletal muscle reconstructed by means of the implantation of autologous adipose tissue: an experimental study*. **Histology & Histopathology**. In press. Accepted 18-08-2019 Sep 12:18163. doi: 10.14670/HH-18-160. [Epub ahead of print]

Leiva-Cepas F, Benito-Ysamat A, Gil-Belmonte MJ, Ruz-Caracuel I, Jimena I, Luque E, Villalba R, Peña-Amaro J. *Experimental reconstruction of volumetric muscle loss: ultrasound and histological evaluations*. Submitted to **Muscle & Nerve**

Otros artículos relacionados con la temática y metodología de la tesis y desarrollados durante esta etapa:

Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, Peña-Toledo MA, Agüera-Vega A, Jimena I, Luque E, Peña J. *Laboratory methodology for the histological study of skeletal muscle*. **Archivos de Medicina del Deporte**. 35: 253-262. 2018

Resúmenes de comunicaciones publicados en revistas

- XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. III International Congress of Histology and Tissue Engineering. Albacete 2019,

I. Jimena, E. Luque, F. Leiva, A. Rubio, R. López-Martos, F. Martínez Baena, L. Jiménez-Reina, J. Peña. *Muscle reconstruction using a decellularized matrix scaffold: preliminary results*. **Histology & Histopathology**,24(S1): S111-S112. 2009

- Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) EU 2011 Annual Meeting. Granada 2011

I. Jimena, F. Leiva-Cepas, A. Rubio, E. Luque, R. Villalba, J. Peña. *Degree of histological recovery in skeletal muscle after reconstruction by adipose tissue implantation*. **Histology & Histopathology**, 26(S1): S430-431. 2015

- **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular / VI Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering /II Congreso Iberoamericano de Histología. Bilbao, 2015**

Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, Jimena I, Cámara-Pérez J, Villalba R, Villatoro A, Peña J
Regenerative response of skeletal muscle to the implant of Osteovit®: preliminary results. Histology & Histopathology, 30(S1): S17-18. 2015

- **XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. IV Congreso Iberoamericano de Histología. VII Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering. Santiago de Compostela, 2017**

F Leiva-Cepas, I Ruz-Caracuel, MA Peña-Toledo, MA Gómez-Luque, I Jimena, E Luque, R Villalba, J Peña. *Histological, histochemical, immunohistochemical and ultrastructural characteristics of normal and abnormal regenerating skeletal muscle fibers. Histology & Histopathology, 32(S1): 118. 2017*

- **30th European Congress of Pathology. Bilbao, 2018**

I Ruz-Caracuel, F Leiva-Cepas, MJ Gil-Belmonte, I Gómez-Cabello, J Cámara-Pérez, I Jimena, J Peña. *Histopathological lesions in a skeletal muscle regeneration model of adipose tissue implantation. Virchows Archives, 473(S1):S301. 2018*

- **World Muscle Society. Mendoza (Argentina), 2018**

M Aizpurua, L Feng, F Leiva-Cepas, A Sarkozy, A Manzur, F Muntoni, C Swery, R Phadke
Prevalence of cytoplasmic bodies in a large series of diagnostic paediatric muscle biopsies. Neuromuscular Disorders, 28: S43. 2018

- **XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. VI Congreso Iberoamericano de Histología. VIII Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering. Murcia, 2019**

F Leiva-Cepas, A Benito-Ysamat, I Ruz-Caracuel, MJ Gil-Belmonte, I Jimena, A Agüera-Vega, R Villalba-Montoro, J Peña-Amaro. *Reconstruction of muscle volumetric loss: histological and ecographic analysis. Histology & Histopathology, 34(S9): S101. 2019*

- **XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. VI Congreso Iberoamericano de Histología. VIII Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering. Murcia, 2019**

F Leiva-Cepas, I Ruz-Caracuel, MJ Gil-Belmonte, ME López-Espejo, J Osuna-Soto, I Jimena, J Peña-Amaro. *Fibrosis increased MyoD expression in regenerating muscle fibers. Histology & Histopathology, 34(S9): S52. 2019*

- **120th Meeting of the British Neuropathological Society. London (UK), 2019**

M.A. Gómez, L Feng, F Leiva-Cepas, A Sarkozy, A Manzur, F Muntoni, C Swery, R Phadke. *Prevalence of cytoplasmic bodies in a large series of diagnostic paediatric muscle biopsies. Neuropathology & Applied Neurobiology*, 45(S1): 38. 2019

Resúmenes de comunicaciones a Congresos publicados en Libro de Actas

- **IV Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba. 2013**

F. Leiva-Cepas, I. Ruz-Caracuel, I. Jimena, E. Luque, R. Villalba, J. Peña
Reconstructing a volumetric muscle loss by adipose tissue implantation. An experimental study.

- **European Neuroscience Conference by Doctor Students for Doctoral Students. ENCODS 2015. Sesimbra (Portugal). 2015**

Leiva-Cepas F, Peña J
Adipose tissue as a conductive element in a muscle regeneration.

- **7th IMIBIC Young Investigators Meeting. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Córdoba, 2016**

Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, Giovanneti-González R, Jimena I, Villalba R, Peña J.
Abnormalities in skeletal muscle fibers by a defective regeneration.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 25 de septiembre de 2019

Firma de los directores

Fdo.: José Peña Amaro

Fdo.: Rafael Villalba Montoro

Resumen/Summary	9
Abreviaturas	11
Introducción	13
Planteamiento general del tema	13
Hipótesis	21
Objetivos	21
Interés biomédico	22
Antecedentes bibliográficos	24
Histología de la regeneración muscular	26
La regeneración de la fibra muscular esquelética	28
<i>Fase de degeneración</i>	28
<i>Fase de regeneración</i>	30
<i>Fase de remodelación</i>	33
La regeneración del músculo esquelético como órgano ..	35
<i>La revascularización</i>	35
<i>La matriz extracelular y la reintegración mecánica</i> ..	36
<i>La reinervación</i>	39
Medicina regenerativa en el músculo esquelético	39
Conceptos básicos en medicina regenerativa	39
Células troncales empleadas en ingeniería tisular del	
músculo esquelético	41
Biomateriales	46
<i>Clasificación de los biomateriales empleados</i>	
<i>en medicina regenerativa</i>	48
<i>Biomateriales empleados en ingeniería tisular</i>	
<i>del músculo esquelético</i>	51
Factores de crecimiento en ingeniería tisular del músculo	
esquelético	62
Histología del músculo esquelético creado por ingeniería tisular	
en pérdidas volumétricas	63
Fibrosis muscular	64
Neoformación muscular	65
<i>Implante de scaffolds acelulares</i>	65
<i>Implante de scaffolds celulares</i>	67
<i>Trasplante autólogo de músculo troceado</i>	68
Material y métodos	71
Animales y diseño del estudio	72
Primer experimento	74
<i>Animales y grupos</i>	74
<i>Procedimientos experimentales</i>	74

Segundo experimento	76
<i>Animales y grupos</i>	76
<i>Procedimientos experimentales</i>	77
Evaluación ecográfica del músculo esquelético	80
Estudio histológico	81
Procesamiento muestras histológicas	81
Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas	82
Análisis histomorfométrico	85
Análisis estadístico	86
Resultados	87
Resultados histológicos	89
Primer experimento	89
<i>A los 7 días</i>	89
<i>A los 14 días</i>	91
<i>A los 21 días</i>	94
<i>A los 28 días</i>	95
<i>A los 60 días</i>	96
Resultados histológicos	99
Segundo experimento	99
<i>A los 21 días</i>	99
<i>A los 28 días</i>	106
<i>A los 60 días</i>	108
Resultados ecográficos	116
Discusión	121
Sobre la histología del músculo esquelético reconstruido mediante el trasplante de tejido adiposo autólogo	123
Sobre la histología de la lesión muscular por pérdida volumétrica reconstruida mediante la implantación con biomateriales acelulares	129
<i>About abnormal histological features in the neo-muscle generated in the VML lesion.</i>	134
Sobre la correlación ecográfica e histológica tras la reconstrucción experimental de la lesión por pérdida volumétrica	137
<i>Future lines of research</i>	140
Conclusions	141
Bibliografía	144
Indicios de calidad	186
Anexos	265

Resumen

La medicina regenerativa tiene como objeto sustituir, reparar o promover la regeneración de tejidos y órganos dañados o enfermos. En el músculo esquelético, la pérdida volumétrica de masa muscular (VML) es una lesión muy grave, que por sus características impide la regeneración, evolucionando irreversiblemente hacia la fibrosis.

Las técnicas de ingeniería tisular intentan ofrecer una alternativa terapéutica a la lesión VML, entre las que destacan el implante de *bioscaffolds* celulares y acelulares para estimular y potenciar la regeneración muscular. Dentro de estas, se han ensayado la combinación de *scaffolds* combinados con células mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Sin embargo, hasta el momento no se ha abordado la utilización directa del tejido adiposo.

El objetivo principal de este estudio fue determinar las características histológicas de un músculo esquelético reconstruido mediante el trasplante de tejido adiposo autólogo en una lesión VML inducida experimentalmente, y compararla con la implantación de diferentes *bioscaffolds* acelulares.

La lesión VML fue inducida mediante la extracción de un fragmento muscular del músculo tibial anterior de ratas Wistar. En el defecto, se injertó tejido adiposo subcutáneo inguinal de la misma rata. Los animales fueron sacrificados 7, 14, 21, 28 y 60 días después del trasplante. En otros grupos de ratas, la lesión se trató con diferentes implantes (matriz muscular descelularizada, Osteovit® e hidrogel de fibrina-agarosa). Previamente al sacrificio de los animales se realizó una evaluación ecográfica de los músculos. Las muestras musculares fueron procesadas para su estudio histológico. Se utilizaron técnicas histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y morfométricas.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que, al menos desde un punto de vista morfológico, el trasplante autólogo de tejido adiposo favorece la reconstrucción después de una pérdida volumétrica de músculo esquelético combinando la respuesta regenerativa inherente del propio órgano y la diferenciación miogénica de las células madre presentes en el tejido adiposo. Sin embargo, en nuestro estudio, el neomúsculo formado exhibió diferencias histológicas en comparación con el músculo esquelético normal. Ninguno de los *bioscaffolds* acelulares evaluados favoreció la reconstrucción muscular. Los resultados ecográficos estuvieron en buena correlación con las observaciones histológicas.

En nuestra opinión, los resultados obtenidos son relevantes desde un punto de vista clínico y tienen potencial traslacional, ya que podrían representar una alternativa al tratamiento de las lesiones VML.

Summary

Regenerative medicine is intended to replace, repair or promote the regeneration of damaged or diseased tissues and organs. In muscle, volumetric loss of muscle mass is a very serious injury, which due to its characteristics prevents regeneration, evolving irreversibly towards fibrosis.

The tissue engineering techniques attempt to provide an alternative therapy to injury VML, among which the implant cellular and acellular bioscaffolds to stimulate and enhance muscle regeneration. Within these, the combination of scaffolds combined with mesenchymal cells derived from adipose tissue have been tested. However, the direct use of adipose tissue has not been addressed so far.

The main objective of this study was to determine the histological characteristics of a reconstructed skeletal muscle by autologous adipose tissue transplantation in an experimentally induced VML lesion, and compare it with the implantation of different acellular bioscaffolds.

The VML injury was induced by removal of a muscle fragment tibialis anterior muscle of Wistar rats. In the hole, inguinal subcutaneous adipose tissue of the same rat was grafted. Animals were sacrificed 7, 14, 21, 28 and 60 days posttransplantation. In other groups of rats, the lesion was treated with different implants (decellularized muscle matrix, Osteovit® and fibrin-agarose hydrogel. Prior to the sacrifice of the animals an ultrasound evaluation of the muscles was performed. Histological, histochemical, immunohistochemical and morphometric techniques were used.

Our results support the hypothesis that, at least from a morphological point of view, autologous adipose tissue transplantation favors reconstruction following a volumetric loss of skeletal muscle by combining the inherent regenerative response of the organ itself and the myogenic differentiation of the stem cells present in the adipose tissue. However, in our study, the formed neo-muscle exhibited histological differences in comparison with the normal skeletal muscle. None of the acellular bioscaffolds tested favored muscle reconstruction. The ultrasound results were in good correlation with the histological observations.

In our opinion, the results obtained are of clinical relevance and have translational potential since they could offer an alternative to the treatment of VML lesions.

Abreviaturas

ADSCs	<i>Adipose Derived Stem Cells</i> (Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo).
AO	<i>Acridine Orange</i> . Se han mantenido las siglas en inglés (Naranja de acridina).
AT-SVF	<i>Adipose tissue stromal vascular fraction</i> (Fracción vascular del estroma del tejido adiposo)
BM-MSC	<i>Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells</i> (Células Troncales Mesenquimales de la Médula Ósea).
C2C12	Línea celular que se diferencia rápidamente formando miotubos contráctiles y expresando proteínas musculares características.
CS	Célula satélite.
CT	Célula troncal.
CTA	Célula Troncal Adulta.
CTM	Célula Troncal Mesenquimal.
ECM	Extracellular Matrix (Matriz extracelular).
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N9-etilcarbodiimida.
EGF	<i>Epidermic Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Epidérmico).
FC	Factores de Crecimiento.
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Fibroblástico).
FGF2	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> (Factor Básico de Crecimiento Fibroblástico).
GC	Grupo control normal.
GCN	Grupo control negativo.
GCR	Grupo control regenerativo.
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína verde fluorescente).
GIOS	Grupo de implante de Osteovit®
GIFA	Grupo de implante de fibrina-agarosa.
GIMD	Grupo de implante de matriz descelularizada.
GTAA	Grupo de trasplante de tejido adiposo autólogo.
GTAC	Grupo de trasplante de tejido adiposo congelado.
H-E	Hematoxilina-eosina.
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento de Hepatocitos).
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Insulínico).
IGF1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i> (Factor de Crecimiento Insulínico 1).
IL-1	Interleucina 1.
IL-6	Interleucina 6.
IL-8	Interleucina 8.
iPSC	<i>Induced Pluripotential Stem Cell</i> (Células Troncales Pluripotentes Inducidas).
MDSC	<i>Muscle Derived Stem Cells</i> (Células Troncales Derivadas de

	Músculo).
ME Músculo Esquelético.
MHC <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Mayor de Histocompatibilidad).
MRF <i>Myogenesis Regulated Factors</i> (Factores Reguladores de la Miogénesis).
MyoD Proteína de diferenciación miogénica.
Myf4 <i>Myogenic Factor 4</i> (Factor miogénico 4).
Myf5 <i>Myogenic Factor 5</i> (Factor miogénico 5).
NGF <i>Nerve Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Nervioso).
PCL Policaprolactona.
PDGF <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas).
PFC Plasma Fresco Congelado.
PGA Ácido poliglicólico.
PLA Ácido poliláctico.
PLLA/PLGA <i>Poly(lactide-co-glycolide)/poly(L-lactide)</i> .
SC <i>Stem Cell</i> (Célula troncal o “madre”).
SIS <i>Submucose Intestine Small</i> (Submucosa de Intestino Delgado).
SMTE <i>Skeletal Muscle Tissue Engineering</i> (Ingeniería tisular del músculo esquelético).
TGF-β <i>Transforming Growth Factor beta</i> (Factor de crecimiento transformante beta).
TNF-α <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Factor de Necrosis Tumoral alfa).
TNF-β <i>Tumor Necrosis Factor beta</i> (Factor de Necrosis Tumoral beta).
UMB <i>Urinary murine bladder</i> (vejiga urinaria murina).
UC-MSC <i>Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells</i> (Células Troncales Mesenquimales Derivadas del Cordón Umbilical).
VCAM-1 <i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i> (Proteína de Adhesión Celular Vascular-1).
VEGF <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular).
VML <i>Volumetric Muscle Loss</i> (Pérdida Volumétrica Muscular).
VSF <i>Vascular Stromal Fraction</i> (Fracción Vascular Estromal).
vWF Factor de von Willebrand.
ZC Zona central.
ZI Zona intermedia.
ZC Zona superviviente.

Introducción

Planteamiento general del tema

Hipótesis

Objetivos

Interés biomédico

Planteamiento general del tema

El músculo es un órgano constituido por tejido muscular esquelético, tejido conectivo, vasos y nervios, cuya función principal es la contracción y su transformación, de forma coordinada, en movimiento gracias a su relación mediante las uniones mioconectivas con tendones y fascias que le unen a los huesos (Peña y Luque, 2013; Peña y Jimena, 2013; Frontera y Ochala, 2015). Además de las enfermedades que le afectan (Pleasure, 2011; Shah y Al-Chalabi, 2019) éste órgano se ve implicado frecuentemente en un gran número de lesiones de carácter traumático (Järvinen *et al*, 2000; Järvinen *et al* 2005; Järvinen *et al*, 2007; Balius *et al*, 2018) lo que evidentemente tiene efectos, en mayor o menor grado, sobre su capacidad funcional. Sin embargo, el músculo esquelético posee una elevada potencia regenerativa frente a la lesión (Huard *et al*, 2002). Esta característica lo convierte no sólo en un excelente paradigma para el estudio de los procesos de degeneración y regeneración tisular sino también, como fundamento para la medicina regenerativa (Gayraud-Morel *et al*, 2009; Tajbakhsh, 2009). La gran capacidad de regeneración del músculo esquelético adulto viene dada por la existencia de una población de células troncales miogénicas conocidas como células satélites (Shi y Garry, 2006).

Aunque con importantes diferencias, la regeneración muscular es un proceso similar a la miogénesis embrionaria (Yusuf y Brand-Saberi, 2012). Una de ellas es que desde un punto de vista histoarquitectural la construcción del músculo se lleva a cabo después de que un andamiaje se haya establecido, formándose a continuación las fibras tipo 1, seguidas de las fibras tipo 2 e integrándose simultáneamente durante este período el tejido conjuntivo y la vascularización. A diferencia de esto, en la regeneración, las fibras musculares se vuelven a formar en una estructura natural previa, constituida por las láminas basales a modo de panal (Tajbakhsh, 2009).

Sin embargo, las lesiones graves de tipo traumático como heridas de guerra, accidentes de tráfico, extirpación quirúrgica de tumores, entre otras, conducen a una pérdida tisular tan severa que bloquea la capacidad regenerativa, originando

importantes déficits permanentes tanto funcionales como estéticos (Christ, 2016). Es lo que se conoce como pérdida volumétrica muscular (VML, *volumetric muscle loss*) y en la que, lógicamente, al fracasar la regeneración, la lesión evoluciona hacia la fibrosis muscular (Garg *et al*, 2014; Garg *et al* 2015a; Cholok *et al*, 2017). En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar estrategias en medicina regenerativa que estimulen la formación *de novo* de tejido muscular esquelético como tratamiento para las VML (Turner y Badylak, 2012; Cittadella Vigodarzere y Mantero, 2014; Sicari *et al*, 2014a; Grasman *et al*, 2015; Corona *et al*, 2016b).

En medicina regenerativa existen, básicamente, tres procedimientos terapéuticos: el implante o trasplante celular, la creación de órganos artificiales por medio de ingeniería tisular y la estimulación de la regeneración tisular (Stocum, 1998; Stocum, 1999; Stocum, 2002; Badylak y Nerem 2010; Atala 2012; González-Andrades *et al* 2013; Mao y Mooney 2015). En el caso del músculo esquelético se considera que, por sus características tisulares, reúne condiciones ideales para el desarrollo de las técnicas de terapia celular (Skuk y Tremblay, 2003), terapia génica (van Deutekom *et al*, 1998) y de ingeniería tisular (Wright *et al*, 2001). Pero también la estimulación de la propia potencia regenerativa del órgano, constituye un arma terapéutica esencial para incrementar la respuesta frente a diferentes situaciones patológicas (Bischoff y Heintz, 1990; Sicari *et al*, 2014a; Agüera *et al*, 2019)

Mediante técnicas de ingeniería tisular en músculo esquelético se han desarrollado estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que incluyen diferentes combinaciones de células troncales, biomateriales y factores de crecimiento (Qazi *et al*, 2015; Fuoco *et al*, 2016; Liu *et al*, 2018; Pantelin y Larkin, 2018; Kwee y Mooney, 2017). Por ejemplo, se ha recurrido a la implantación de mioblastos en mallas poliméricas en ratas para reconstruir defectos en la musculatura de la lengua, sembrando sobre la matriz descelularizada implantada células troncales derivadas de médula ósea (Merritt *et al*, 2010) o constructos formados por mioblastos y matriz acelular de vejiga de cerdo para reconstruir defectos de un 50% volumen muscular en músculo de ratón (Machingal *et al*, 2011) o hidrogeles expandidos de colágeno (Ward *et al*, 2015).

A pesar de los avances conseguidos hasta ahora, los músculos diseñados por ingeniería tisular no consiguen, especialmente en su grosor y fuerza, alcanzar la eficiencia volumétrica natural (Ostrovidov *et al*, 2014; Sicari *et al*, 2015) siendo limitada la capacidad para formar neomúsculo. Si bien algunas de las técnicas han permitido generar tejido muscular esquelético similar pero no idéntico al tejido nativo, este queda limitado a islas de fibras regenerativas aisladas (Aurora *et al*, 2015, Corona y Greising, 2016) o incipientes miofibras delgadas y cortas respecto a las fibras musculares nativas (Kesireddy, 2016) y siempre permanecen áreas de tejido fibroso y adiposo (Valentin *et al*, 2010). Por tanto, si pretendemos conseguir reconstruir una VML es necesario conseguir incrementar de manera importante la generación de nuevo tejido muscular. En nuestra opinión esto podría conseguirse combinado dos estrategias: *estimulando* la propia potencia regenerativa del músculo afectado e *implantando* en el defecto muscular un biomaterial o un constructo que generando señales mioinductivas favorezca la respuesta de regeneración.

Recientes estudios ponen de manifiesto que el empleo de matriz extracelular promueve el reclutamiento, movilización y acumulación de células troncales en el defecto tisular favoreciendo la formación de nuevo tejido muscular (Sicari *et al*, 2014b; Quarta *et al*, 2018). Se han empleado *bioscaffolds* han sido obtenidos de matriz extracelular derivada de submucosa intestinal, de vejiga y de matriz extracelular combinada con mioblastos (Pollot *et al*, 2016), pero no han sido evaluados los derivados de matriz extracelular acelular de músculo esquelético. El potencial promiogénico que se les atribuye (Perniconi *et al*, 2011) puede explicar la neoformación de fibras musculares en una matriz muscular descelularizada por probable migración de células miogénicas desde el músculo subyacente lesionado sobre el que se implantó esta matriz (Jimena *et al*, 2009). Otros tipos de biomateriales no ensayados en músculo esquelético, y que se emplean con éxito en ingeniería tisular de otros órganos, como la fibrina-agarosa (Alaminos *et al*, 2006) y la matriz de colágeno biomimética, podrían ser alternativas a evaluar a nivel muscular. En consecuencia es preciso analizar comparativamente la utilización de diferentes biomateriales que puedan favorecer o potenciar la capacidad regenerativa intrínseca

del músculo esquelético para conseguir la reconstrucción controlada y eficaz del defecto volumétrico.

En este sentido, una estrategia sería aprovechar las propias señales que se generan en el músculo esquelético en la lesión-regeneración. En los procesos regenerativos los cambios que ocurren en el microambiente tisular pueden ser requeridos para la migración, proliferación y diferenciación de las células progenitoras (Tottey *et al*, 2011) y resultan esenciales para maximizar la incorporación de las células implantadas en terapia celular (White y Grounds, 2003). De hecho, extractos musculares obtenidos a partir de músculos denervados tienen efectos miotróficos sobre músculos normales y atroficos estimulando, no sólo el crecimiento de las fibras musculares sino activando a la población de células satélites y otras células miogénicas ubicadas en el espacio intersticial (Jimena *et al*, 1993; Peña *et al*, 1995; Jimena *et al* 1998; Agüera *et al*, 2016; Agüera *et al*, 2019). Teniendo en cuenta que el músculo regenerativo genera una rica fuente de señales que podrían activar los precursores de células miogénicas (De Angelis *et al*, 1999), se debe de plantear que el músculo huésped, que ha sufrido una lesión y está regenerando, actúe como elemento potenciador de la miogénesis gracias al tipo de material implantado.

En esta línea un enfoque interesante para el tratamiento de VML se ha centrado en el uso de injertos de músculo autólogo troceado sobre la base de que el material trasplantado incluye células miogénicas del donante (Corona *et al*, 2013; Ward *et al*, 2015; Corona *et al*, 2017). Si bien estos procedimientos han logrado una notable regeneración muscular de *novo*, parece que la cantidad necesaria para reparar la VML constituye una limitación (Dunn *et al*, 2019). Además, como ya se ha señalado previamente (Acarturk *et al*, 1999), el trasplante de tejido muscular generaría problemas asociados tales como la necesidad de obtener una significativa masa de tejido muscular para trasplante (lo que ocasionaría una pérdida funcional y de volumen en el músculo donante), incrementaría el riesgo de infección en ese territorio y, teniendo en cuenta que el tejido transferido no está preparado para integrarse funcionalmente en su nuevo lugar, favorecería su deterioro evolucionando hacia la fibrosis.

Para resolver esta cuestión planteamos, en la presente tesis doctoral, que el trasplante de tejido adiposo autólogo podría constituir una alternativa a este problema. El tejido adiposo ofrece una serie de ventajas como son su fácil accesibilidad, disponibilidad y, muy importante, la presencia de células troncales mesenquimales con potencialidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo* hacia diferentes fenotipos y un alto grado de proliferación. Es bien conocido la existencia de células multipotentes con capacidad para diferenciarse *in vitro* hacia células adipogénicas, condrogénicas, osteogénicas y miogénicas, en el tejido adiposo humano obtenido a partir de lipoaspirados lo que las hace potencialmente útiles para aplicaciones en ingeniería tisular (Zuk *et al*, 2001; Mizuno *et al*, 2002; Aust *et al*, 2004; Helder *et al*, 2007; Vallée *et al*, 2009; Lin *et al*, 2010; Duscher *et al*, 2017).

Nuestro planteamiento obedece a los siguientes hechos:

1. Una de las fuentes postnatales de células troncales mesenquimales con aplicaciones en medicina regenerativa es el tejido adiposo (Mizuno *et al*, 2002; Gomillion y Burg, 2006; Schäffler y Büchler, 2007; Mizuno, 2009; Argentati *et al*, 2018). Existen evidencias *in vitro* de la conversión miogénica de células troncales derivadas del tejido adiposo (Di Rocco *et al*, 2006; Andersen *et al*, 2008) y también *in vivo* de que éstas células podrían contribuir a la regeneración muscular en ratones con distrofia muscular (*mdx*) y a la regeneración normal inducida por miotóxicos (Bacou *et al*, 2004; Andersen *et al*, 2008). Sin embargo, la combinación de células troncales derivadas del tejido adiposo (ADSC, *adipose-derived stem cells*) con *scaffolds* parece que contribuye de forma moderada a la formación de nuevas fibras musculares (Gilbert-Honick *et al*, 2018; Kesireddy, 2016).
2. Se ha demostrado que los mioblastos pueden invadir el tejido adiposo implantado en un área de lesión, a partir de los extremos del músculo seccionado, formando miotubos y nuevas fibras musculares en su espesor (Sato *et al*, 1992).

3. Por otro lado, las ADSC podrían potenciar la reconstrucción muscular ya que es conocido que el microambiente muscular tiene profundos efectos en el destino de las células residentes o implantadas (Long 2001; Peng y Huard, 2004; Ehrhardt y Morgan, 2005) y en que el músculo regenerativo constituye una rica fuente de señales que reclutan células hacia la miogénesis (De Angelis *et al*, 1999)

La histología de la VML reconstruida mediante la implantación de tejido adiposo autólogo fue comparada con la que presentaban VML en los que habían sido implantados dos materiales diferentes: matriz descelularizada y fibrina-agarosa. Existen evidencias de que algunos *scaffolds* poseen propiedades mioinductoras, como es el caso de aquellos procedentes de vejiga urinaria descelularizada (Sicari *et al*, 2014a; Kwee y Mooney, 2017; Liu *et al*, 2018) que inducen la formación de nuevo tejido muscular en VML tanto en ratas (Aurora *et al*, 2015) como en humanos (Dziki *et al*, 2016; Sicari *et al*, 2014b; Sicari *et al*, 2015). Por otro lado, si bien su potencial utilidad no ha sido ensayada en ingeniería tisular de músculo esquelético, la fibrina-agarosa (un biomaterial basado en la combinación de agarosa y fibrina humana) ha probado su utilidad en la construcción por ingeniería tisular de nervios periféricos gracias a su alta biocompatibilidad y permeabilidad que admite la migración celular y la revascularización en los conductos injertados (Carriel *et al*, 2013).

Cuando se reconstruye un órgano por ingeniería tisular, es importante conocer si su estructura es similar al órgano que pretende sustituir. La utilización de técnicas de imagen no invasivas es fundamental, no sólo como aproximación a las observaciones histológicas, sino como seguimiento del proceso de implantación. Algo que no sólo es útil en animales de experimentación, sino en la medicina traslacional, por la escasa morbilidad y mejor coste-beneficio. Por esta razón, y al objeto de conocer si la estructura muscular se había recuperado, los músculos fueron analizados previamente mediante ultrasonidos antes de realizar el estudio histológico. La ecografía es una herramienta muy importante en la valoración de la estructura del músculo esquelético tanto normal como patológico (Draghi *et al*, 2013; Selva Raj *et al*, 2017), el seguimiento

del proceso degenerativo y regenerativo en modelos experimentales de lesión muscular (Jiménez-Díaz *et al*, 2012) y para la toma de biopsias en humanos en el sitio de implantación de *scaffolds* para valorar las características del músculo neoformado (Sicari *et al* 2014b).

Hipótesis

Basándonos en la propia y gran capacidad regenerativa del músculo esquelético y en la demostrada utilidad de diferentes biomateriales para reconstruir tejidos y órganos, planteamos que:

“La implantación de un andamiaje biológico (*bioscaffold*) en combinación con la propia respuesta regenerativa del músculo esquelético permitiría reconstruir un defecto volumétrico con un nuevo tejido muscular generado desde el tejido lesionado circundante. Que el tejido adiposo autólogo podría favorecer la reconstrucción muscular al combinar la respuesta regenerativa inherente del órgano junto con la posible diferenciación miogénica de las células madre presentes en el mismo”.

Objetivos

Objetivo principal:

Comprobar el grado de reconstrucción histológica de un defecto volumétrico inducido experimentalmente en músculo esquelético utilizando el trasplante de tejido adiposo autólogo y diferentes tipos de *scaffolds*.

Objetivos secundarios:

Objetivo 1. Determinar en cada uno de los grupos la cantidad generada de tejido muscular frente a fibrosis.

Objetivo 2. Determinar el grado de normalidad histológica, histoquímica e inmunohistoquímica del tejido muscular neoformado.

Objetivo 3. Analizar las características de la respuesta miogénica generada en el músculo huésped.

Interés biomédico

La lesión VML es la pérdida traumática o quirúrgica del músculo esquelético con el deterioro funcional resultante (Groga y Hsu, 2013) y es muy frecuente en lesiones traumáticas en militares y civiles (Corona *et al* 2016). Se trata de un serio problema tanto por su abordaje médico como para la persona afectada ya que las lesiones son sustituidas por una cicatriz fibrosa lo que, generalmente, produce no sólo una deficiente restauración histológica sino también funcional (Calve *et al*, 2010). En estas situaciones los tratamientos habituales para la lesión muscular (Järvinen *et al*, 2005; Järvinen *et al*, 2007; Baoge *et al*, 2012; Grag *et al*, 2015) no resultan eficaces, requiriéndose de protocolos terapéuticos más complejos basados en medicina regenerativa y que tienen como objeto sustituir, reparar o promover la regeneración en tejidos y órganos dañados o enfermos (Corsi *et al*, 2007). Estas terapias están basadas en técnicas de ingeniería tisular que pueden combinar tres elementos: células troncales, scaffolds y factores de crecimiento (Grounds, 2000; Wright *et al*, 2001; Bach *et al*, 2004; Bian y Bursack, 2009; Tanzi *et al*, 2006; Stern-Straeter *et al*, 2007; Usas y Huard, 2007; Cittadella Vigodarzere y Mantero, 2014; Sicari *et al*, 2014a; Passipieri y Christ, 2016; Liu *et al*, 2018; Wang *et al*, 2019). Los resultados experimentales son variados y dispares, aunque ya se han llevado a cabo algunos ensayos en humanos que apuntan ciertos incrementos funcionales (Sicari *et al*, 2015) con resultados electromiográficos que sugieren mejoras fisiológicas en la función muscular (Han *et al*, 2016) y en el rendimiento isocinético (Mase *et al*, 2010).

Aunque la traslación clínica de estas investigaciones es relativamente viable (Mase *et al*, 2010), la optimización de la aplicación terapéutica futura hace necesaria la realización de estudios en modelos animales de mayor tamaño (Matthias *et al*, 2018), si bien experimentos realizados en perros no han dado resultados satisfactorios (Turner *et al*, 2012). Es posible que las dificultades estén ligadas, como señala Corona *et al* (2016b) a partir de los datos clínicos disponibles en humanos y en los estudios preclínicos en lesiones de VML, a posibles mecanismos de fuerza subóptima de la masa muscular restante sugestivos de una fisiopatología compleja que incluirían daño

nervioso intramuscular, perturbaciones arquitectónicas musculares y disminución de la transmisión de la fuerza, lo que determina la necesidad de establecer múltiples objetivos terapéuticos.

En este sentido es necesario que las técnicas *in vitro* o *in vivo* permitan o mejoren la inervación de las nuevas fibras musculares creadas en el defecto muscular para favorecer su crecimiento y maduración (Smith *et al*, 2016). La administración de factores de crecimiento exógenos en momentos críticos podría optimizar la capacidad regenerativa de los bioconstructos (Passipieri y Christ, 2016; Syverud *et al*, 2016), así como la necesidad de combinar estrategias de rehabilitación (Gentile *et al*, 2014) para mejorar o potenciar el crecimiento y ordenamiento paralelo de las nuevas fibras musculares (Greising *et al*, 2016) y la mejora biomecánica (Greising *et al*, 2018).

Por lo expuesto en los párrafos anteriores y atendiendo al hecho de que en ingeniería tisular una opción muy frecuente es el empleo de células estromales derivadas de tejido adiposo en combinación con diferentes *scaffolds* (Gilbert-Honick *et al*, 2018; Pantelic y Larkin, 2018; Grabowska *et al*, 2019), los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que el uso de tejido adiposo autólogo para trasplante en el defecto creado por una VML ofrecería importantes ventajas y reduciría algunos inconvenientes o desventajas del empleo de otros materiales. Además, considerando que uno de los principales inconvenientes o limitaciones actuales en ingeniería tisular de músculo esquelético es la elaboración de *scaffolds* biocompatibles lo suficientemente grandes como para facilitar la reparación clínica en las pérdidas volumétricas (Mertens *et al*, 2014) nuestro trabajo podría considerarse como una opción terapéutica.

Antecedentes bibliográficos

Histología de la regeneración muscular

La regeneración de la fibra muscular esquelética

Fase de degeneración

Fase de regeneración

Fase de remodelación

La regeneración del músculo esquelético como órgano

La revascularización

La matriz extracelular y la reintegración mecánica

La reinervación

Medicina regenerativa en el músculo esquelético

Conceptos básicos en medicina regenerativa

Células troncales empleadas en ingeniería tisular del músculo esquelético

Biomateriales

Clasificación de los biomateriales empleados en medicina regenerativa

Biomateriales empleados en ingeniería tisular de músculo esquelético

Factores de crecimiento en ingeniería tisular del músculo esquelético

Histología del músculo esquelético creado por ingeniería tisular en pérdidas volumétricas

Fibrosis muscular

Neoformación muscular

Implante de scaffolds acelulares

Implante de scaffolds celulares

Trasplante de músculo troceado autólogo

Histología de la regeneración muscular

El músculo esquelético es un órgano ampliamente distribuido en la economía humana y que supone aproximadamente un 40 % del peso corporal total. En condiciones de homeostasis se adapta de una forma excelente a las demandas fisiológicas. Aun así, está sujeto a sufrir una amplia variedad de lesiones, especialmente aquellas relacionadas con la actividad física, (Kalimo *et al*, 1997; Ekstrand *et al*, 2011; Järvinen *et al*, 2014) pero posee una gran capacidad de respuesta a la lesión siempre y cuando el volumen perdido en la lesión tenga unas proporciones determinadas (Ward y Corona, 2015). Este hecho tiene una gran importancia para la medicina clínica (traumatología, reumatología, neurología, rehabilitación y fisioterapia) por lo que conocer y entender los fundamentos de la regeneración del músculo esquelético permite aplicar los diferentes tratamientos de una forma racional y eficaz (Järvinen *et al*, 2005).

La regeneración tisular es un proceso coordinado de acontecimientos complejos consistente en la sustitución de células perdidas debido a enfermedad o lesión. Esto tiene lugar a partir de una población de células troncales que son activadas para preservar la estructura y función del órgano. Para que el proceso sea exitoso se precisan de una serie de requerimientos en el territorio donde tiene lugar ya que no todas las células, tejidos u órganos tienen la misma potencialidad para regenerar (Yannas, 2001).

El tejido muscular esquelético es uno de los que posee mayor capacidad regenerativa, gracias a la existencia de una población de células troncales miogénicas asociadas a las fibras musculares (Dumont *et al*, 2015). Esta característica biológica es la que permite al músculo esquelético, como órgano, recuperar su estructura y función como respuesta a la enfermedad o lesión. Por tanto, la respuesta regenerativa ocurre de manera fisiológica, en todas aquellas enfermedades que provocan necrosis muscular como es el caso de un gran número de miopatías –y ocasionalmente en algunas enfermedades neurogénicas crónicas–, así como en lesiones por agentes

externos como las provocadas por ejercicio intenso, contusiones, laceraciones, quemaduras o efectos de venenos y toxinas. En todos estos casos es habitual encontrar en el análisis histológico de las muestras musculares la presencia de fibras regenerativas aisladas o en grupos.

Mientras que habitualmente la regeneración muscular es eficaz y lleva a una completa recuperación funcional del tejido dañado, existen situaciones como ciertas enfermedades en las que se ve dificultada o impedida (Serrano *et al*, 2011) o lesiones traumáticas severas (Järvinen *et al*, 2014) en las que el proceso fracasa evolucionando hacia la fibrosis y a determinado déficit funcional. Los factores que influyen en el éxito o no de la respuesta regenerativa son variados e incluyen: el tipo de lesión (Hardy *et al*, 2016), la extensión del daño o lesión muscular (Turner y Badylak, 2012), la reducción, destrucción o disfunción de la población de células satélites (Relaix y Zammit, 2012), el diferente impacto que la lesión puede generar sobre los distintos tipos celulares que ocasione un desbalance en su respuesta (Ten Broek *et al*, 2010), así como la afectación y severidad de ésta sobre el tejido conectivo o matriz extracelular, vasos y nervios (Turner y Badylak, 2012) que puedan interferir en la correcta y adecuada regeneración. Sin embargo, la eficacia de la respuesta regenerativa parece también estar ligada al tipo de músculo esquelético –lento o rápido– (Zimowska *et al*, 2017), distribución intramuscular de tipos de fibras (Luque *et al*, 2001), diferencias intrínsecas de la población de células satélites (Lagord *et al*, 1998; Kalhovde *et al*, 2005) o en el mantenimiento de la integridad de la lámina basal (Bassaglia y Gautron, 1995).

Para introducirnos en el conocimiento de este proceso es necesario establecer la diferencia entre regeneración de la fibra muscular y regeneración del músculo esquelético. Se entiende por regeneración de la fibra muscular esquelética, la reconstitución de una fibra muscular, o de un segmento de ésta, después de la necrosis (Carpenter y Karpati, 2001). Sin embargo, por regeneración del músculo esquelético se debe entender no sólo la que afecta a las fibras musculares sino también a otros elementos constitutivos del músculo como órgano; esto son, la matriz extracelular, la vascularización y la inervación, ya que también pueden verse

involucrados en el proceso lesivo. De hecho, la completa recuperación estructural y funcional del músculo postlesión es resultado de un proceso que requiere de una acción coordinada de distintos tipos celulares (fibras musculares, células satélites, macrófagos, neutrófilos, precursores fibroadipogénicos, fibroblastos, células de Schwann y células endoteliales) y factores de crecimiento (Ten Broek *et al*, 2010), dirigida a la formación equilibrada de nuevas fibras musculares y de matriz extracelular en un microambiente adecuado de revascularización, reinervación y recuperación de la tensión.

A la regeneración postlesión también se la conoce como miogénesis secundaria ya que recapitula, en gran medida, el proceso de miogénesis embrionaria. Sin embargo, conviene recordar que se trata de procesos similares, pero no idénticos (Tajbakhsh, 2009). Independientemente de la causa de la lesión muscular, el patrón del proceso regenerativo es siempre el mismo, lo que ha permitido establecer las fases secuenciales (pero superponibles) del proceso: degeneración, regeneración y remodelación (Järvinen *et al*, 2005; Järvinen *et al*, 2007). Dentro de estas fases o etapas que están reguladas por citocinas y factores de crecimiento (Grounds, 1999; Bentzinger *et al*, 2010) se pueden distinguir a su vez otras subfases.

La regeneración de la fibra muscular esquelética

Fase de degeneración:

También conocida como fase de destrucción o de inflamación. Es la respuesta inmediata a la lesión muscular, en la cual se establece la autólisis de los componentes musculares seguida por la necrosis que conlleva la respuesta inflamatoria. Se distinguen así dos etapas secuenciales: la degeneración intrínseca de las fibras dañadas y, a continuación, la degeneración extrínseca mediada por células.

- *Fase de degeneración intrínseca:*

En esta primera fase, y como consecuencia generalmente de una lesión o rotura de la membrana plasmática, que implica la masiva entrada de Ca^{2+} extracelular, los diferentes elementos constitutivos de la fibra muscular sufren un proceso de destrucción. Mientras que las proteasas activadas por calcio, como la calpaína, conducen a la hipercontracción miofibrilar y después a su desintegración (Tidball, 2011). Las lipasas llevarían a cabo la destrucción de todas las organelas y elementos membranosos de la célula (retículo sarcoplásmico, mitocondrias, membranas, etc).

- *Fase de degeneración extrínseca o mediada por células:*

La inflamación que sigue a la lesión es la respuesta biológica natural y es de una importancia extrema en el proceso regenerativo. La activación de la cascada del complemento induce el reclutamiento quimiotáctico de neutrófilos, en primer lugar, seguidos de los macrófagos. Dos son las funciones generales que desempeña la inflamación: la digestión y retirada de los restos necróticos de las miofibras, y la liberación de citocinas que no sólo amplifican la respuesta inflamatoria, sino que activan a las células satélites en el lugar de la lesión.

Aunque su papel es menos conocido, la invasión por neutrófilos sirve como fuente de citocinas proinflamatorias (IL-8, IL-1 y $\text{TNF-}\alpha$), atrae a los macrófagos al lugar de la lesión regulando su contribución en cuanto a número y actividad (Bosurgi *et al*, 2011) e intervienen lisando las membranas (Nguyen *et al*, 2005). Por el contrario, la tarea que juegan los macrófagos en el proceso regenerativo es bien conocido y actualmente se sabe que estas células se corresponden con dos tipos bien distintos: por un lado, macrófagos proinflamatorios M1 cuya funciones son las de la fagocitosis de los restos necróticos de la fibra muscular y promover la proliferación de la células satélites mediante la secreción de factores de crecimiento (IGF, HGF, LIF, EGF, $\text{TGF-}\beta$ y PDGF) que actúan regulando la proliferación y diferenciación de los mioblastos derivados de las células satélites; de otro, macrófagos proregenerativos M2 que intervienen en la proliferación y diferenciación de los mioblastos, al mismo tiempo que liberan citocinas antiinflamatorias (Tidball, 2004; Tidball y Villalta 2010).

Fase de regeneración:

Basándonos en Plahgki (1985), en esta etapa podríamos distinguir tres: inicial, de maduración y de estabilización. Para entenderla es necesario saber que, en general, durante la degeneración de la fibra muscular dos elementos fundamentales para esta fase regenerativa se mantienen relativamente intactos (considerando los casos donde la estructura no se ve muy dañada): la lámina basal y la célula satélite.

La lámina basal que rodea a la fibra muscular, está íntimamente conectada al endomisio y compuesta fundamentalmente por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicano heparán sulfato (Gillies y Lieber 2011). En la fase degenerativa, la lámina basal se mantiene como un *filtro celular selectivo* (al mantener en su interior a las células satélites, excluir a los fibroblastos del tejido conectivo y permitir el paso de las células inflamatorias) y actúa como *andamiaje mecánico* en el que se establece un microambiente favorable para la proliferación de las células satélites y la formación de mioblastos y miotubos (Carlson, 2003). En una lesión que no altere significativamente el entramado estructural del tejido conectivo del músculo, todos los acontecimientos señalados en la regeneración de la fibra muscular se llevan a cabo en el interior de las láminas basales persistentes que actúan como andamiaje tisular para la correcta reconstrucción de la fibra muscular dañada. De esta manera la lámina basal garantiza que las células satélites proliferen dentro de sus límites, se diferencien hacia mioblastos y se fusionen entre sí para formar miotubos multinucleados y con las partes supervivientes de la fibra lesionada. Además, la lámina basal permite mantener un microambiente tisular favorable al mismo tiempo que impide que fibroblastos y fibras de colágeno interfieran en la formación y desarrollo de las nuevas miofibras, además de garantizar la reinervación de las fibras musculares regenerativas.

La célula satélite, localizada entre la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra muscular, es una célula troncal miogénica que ejerce una función como población celular de reserva del músculo esquelético adulto. Además de contribuir como fuente de nuevos mionúcleos en el crecimiento postnatal del músculo

esquelético y en la hipertrofia del músculo adulto, son esenciales en la regeneración de la fibra muscular (Luque *et al*, 2011). Su capacidad como CT supone un alto grado de resistencia a la agresión (Fukada, 2018); de hecho, cuando son eliminadas la regeneración no es viable (Relaix y Zammit, 2012). Sin embargo, son muchos los datos y evidencias que demuestran la existencia de diferentes tipos celulares, diferentes a la célula satélite, con potencialidad miogénica (Otto *et al*, 2009; Cosgrove y Blau, 2011).

La *fase inicial* consiste en la formación de las denominadas fibras regenerativas o miotubos regenerativos. Como resultado de la exposición de señales derivadas de las fibras musculares dañadas, comienza con la activación y proliferación de las células satélites, su diferenciación a mioblastos regenerativos y la fusión entre ellos y los extremos de la fibra muscular dañada permitiendo su reconstrucción. El segmento que se reconstruye es lo que se conoce como miotubo o fibra muscular regenerativa.

Tras la entrada en el ciclo celular, las células satélites proliferan expandiendo la población de mioblastos que se caracterizan por la expresión secuencial de los factores reguladores de la miogénesis (MRF) *MyoD* y *Myf5*, mientras que la diferenciación es determinada por la expresión de los MRF miogenina y MRF4 (Chargé y Rudnicki, 2004). Durante estos acontecimientos una parte de los mioblastos regresan al estado de quiescencia o reposo, manteniendo así una población de CS que permita al músculo esquelético hacer frente a una nueva lesión (Luque *et al*, 2011; Dumont *et al*, 2015).

La fusión de mioblastos es un fenómeno complejo que implica diferentes interacciones bioquímicas y biofísicas, así como cambios en la matriz extracelular (Grounds, 1998) y que incluye las etapas de migración, reconocimiento y adhesión, rotura de membranas y, finalmente, incorporación de los núcleos (Rochlin *et al*, 2010). Numerosas proteínas como M-cadherina, M-calpaína, mioferlina, disferlina y desmina, entre otras, intervienen en la fusión de los mioblastos durante la regeneración (Demonbreun *et al*, 2015), pero hay dos que juegan un papel específico –*myomarker* y *myomerger*– y necesario en la formación de los músculos (Sampath *et al*, 2018).

La actividad de las enzimas oxidativas se incrementa de forma importante cuando los mioblastos comienzan a fusionarse en miotubos, indicando que la biogénesis mitocondrial tiene lugar tempranamente (Wagatsuma *et al*, 2011), comenzando a reorganizarse en un sistema reticular interconectado (retículo mitocondrial) (Hood *et al*, 2006). Durante la regeneración, las isoformas de miosina de cadena pesada del desarrollo se expresan primero y luego tiene lugar un cambio a isoformas adultas bajo el control de la actividad nerviosa (Schiaffino y Reggiani, 2011).

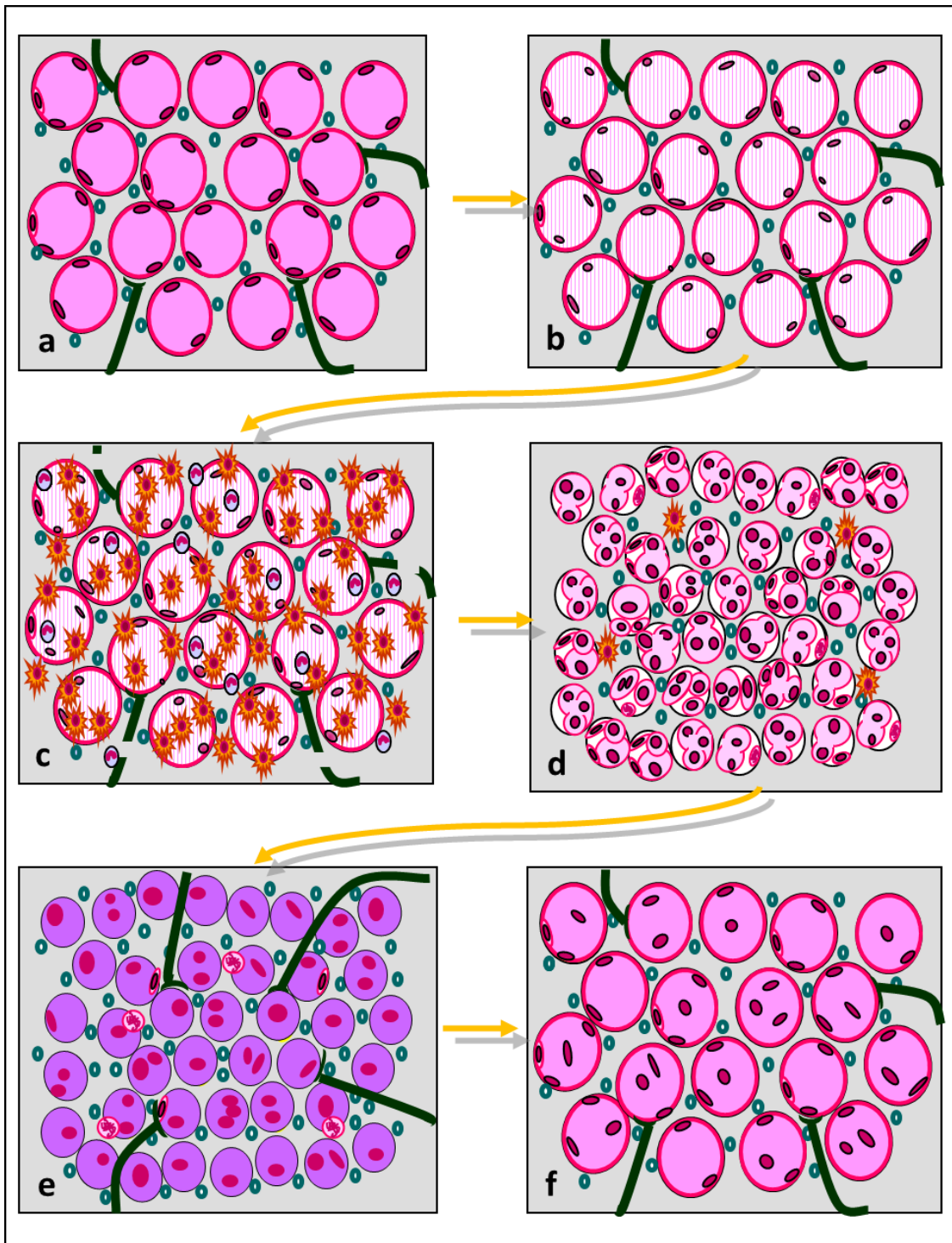
La *fase de maduración* consiste en la transformación de la fibra muscular regenerativa en fibra muscular madura. En consecuencia, tanto el aspecto histológico como los patrones de tinción con las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas es variable, lo que refleja el proceso de desarrollo y reorganización interna que experimenta la fibra muscular regenerativa durante su crecimiento hasta alcanzar la normalidad (Jimena *et al*, 1992; Bornemann y Anderson, 2000).

Durante esta fase la fibra muscular regenerativa experimenta una síntesis, maduración y reorganización interna de sus diferentes componentes subcelulares. Los mionúcleos, muy eucromáticos y con nucléolos evidentes, se sitúan característicamente en el centro de la fibra muscular regenerativa y dispuestos en cadena. Alrededor de ellos se disponen abundantes polirribosomas, lo que indica la síntesis de nuevas proteínas miofibrilares que se hace evidente por la característica basofilia y fluorescencia anaranjada de su sarcoplasma con naranja de acridina. Inicialmente se produce la isoforma de la miosina MHC, que progresivamente va siendo sustituida por miosinas adultas. Las primeras se forman en la periferia de la fibra y progresivamente van ocupando el centro al mismo tiempo que, simultáneamente con la miofibrillogénesis, se forman el sistema T y el retículo sarcoplásmico (Zhang y Dhoot, 1998). Por otro lado, el progresivo crecimiento en tamaño hasta alcanzar la madurez precisa de una continua incorporación de mionúcleos (ya que tras la fusión de mioblastos los núcleos adquieren carácter amitótico) lo que ocurre por nuevos ciclos mitóticos de las células satélites y de su fusión con la fibra regenerativa (Luque *et al*, 1996; Kuang *et al*, 2008).

La *fase de estabilización* se instaura cuando la fibra muscular regenerativa es ya similar en su estructura a la fibra muscular normal. Sin embargo, aunque los mionúcleos abandonan la cadena central y migran a la periferia marcando la transición de miotubo o fibra muscular regenerativa a fibra muscular regenerada, no todos lo hacen quedando algunos en posición interna; lo que convierte a este hallazgo en un marcador de regeneración muscular (Ikutomo *et al*, 2014).

Fase de remodelación:

Para que estas fibras musculares regenerativas se conviertan en miofibras totalmente funcionales con una completa maduración de un sistema y mecanismos competentes de excitación, acoplamiento, contráctiles y metabólicos (Relaix y Zammit, 2012) deben interrelacionarse necesariamente con la restitución de la unión neuromuscular, un suministro vascular intacto y la correcta integración con la matriz extracelular. Incluso, sin lesión nerviosa, hay una constante remodelación de la terminación de la fibra nerviosa durante la degeneración y regeneración del segmento de la fibra muscular postsináptica, ya que recuperar la conexión es indispensable para la recuperación funcional de la fibra muscular esquelética (Li y Thompson, 2011). Es entonces cuando la regeneración de la fibra muscular queda completada estructural y funcionalmente. Cuando la fibra muscular regenerada alcanza la madurez, normaliza la distancia respecto a los capilares (Ruz-Caracuel *et al*, 2013), recupera la diferenciación de su tipo histoquímico (Schiaffino y Reggiani, 2011) y restablece la población de células satélites asociada (Luque *et al*, 1996).



Esquema 1. Secuencia de acontecimientos celulares y tisulares durante la degeneración y regeneración del músculo esquelético. (a) músculo normal, (b) degeneración intrínseca, (c) fagocitosis por neutrófilos y macrófagos, (d) activación y proliferación de mioblastos (derivados de células satélite), (e) fusión de mioblastos en miotubos o fibras musculares regenerativas, (e) crecimiento y maduración de la fibras musculares regenerativas y (f) músculo regenerado. (Figura tomada, con autorización, de Peña y Jimena, 2008).

La regeneración del músculo esquelético como órgano

Mientras que las pequeñas lesiones musculares experimentan una rápida y completa regeneración, existen otras en las que se precisa la intervención de los llamados factores reintegrativos, esenciales para una óptima regeneración. Se trata de aquellas lesiones bien de gran tamaño o aquellas otras que combinan daño a grandes vasos, nervios, tendones o uniones mioconectivas. En estos tipos de lesión la regeneración suele ser deficiente y la fibrosis se instaura comprometiendo la función de los músculos afectados. De hecho, en casos de traumatismos o lesiones severas como las lesiones isquémicas, lesiones inciso-contusas, o más claramente en las pérdidas volumétricas de músculo esquelético, donde el suministro sanguíneo e inervación y uniones mioconectivas se ven muy afectadas, la capacidad regenerativa puede verse dificultada o impedida.

En definitiva, en estas situaciones, y simultáneamente a la regeneración de las fibras musculares, tendrían lugar la revascularización, la reinervación y la remodelación de la matriz extracelular que permite la reintegración biomecánica y funcional. Todo ello, en conjunto, constituye el proceso de regeneración del músculo esquelético.

La revascularización

La revascularización comienza ya en la etapa más temprana del proceso degenerativo-regenerativo por lo que la miogénesis y la angiogénesis ocurren de forma simultánea en espacio y tiempo (Scholz *et al*, 2003) y coordinados por factores de crecimiento comunes (Christov *et al*, 2007; Ceafalan *et al*, 2015). En base a estos hechos, la revascularización es esencial por diversos motivos:

- Para mantener una microvascularización estable que asegure una respuesta inflamatoria coordinada: por un lado la transmigración de leucocitos hacia el tejido dañado y de otro la liberación de citocinas y factores de crecimiento. Se sabe que en ausencia de macrófagos la regeneración muscular se ve disminuida (Lescaudron *et al*, 1999).

- Para la provisión de nutrientes y oxígeno necesarios para el apoyo metabólico que se precisa en la regeneración (Carlson, 2003). Sin una adecuada revascularización el músculo regenerativo se necrosa. Un objetivo importante es mantener la supervivencia celular en un entorno necrótico hostil para que la células satélites y otros tipos celulares proliferen, se diferencien y autorenewen (Tajbakhsh, 2009).

- Para el abastecimiento de otros precursores celulares musculares distintos a las células satélites que puedan contribuir a la regeneración muscular (Cossu y Biressi, 2005, Otto *et al*, 2009; Cosgrove y Blau, 2011; Forcina *et al*, 2019). Esto podría ser especialmente importante en las lesiones de gran tamaño donde la población de células satélites pudiera no ser suficiente.

- Para cubrir las necesidades de la fibra muscular regenerativa durante su maduración y crecimiento es necesario el suministro de oxígeno y nutrientes. De hecho, el incremento en tamaño de las fibras musculares regenerativas se acompaña de un aumento de la capilarización (Luque *et al*, 1992; Luque *et al*, 1995a). Sin embargo, esta mayor densidad capilar podría no estar ligada a unas mayores necesidades de oxigenación de las fibras musculares regenerativas en su fase inicial (Ruz-Caracuel *et al*, 2013). Es más, los capilares que rodean a las fibras musculares regenerativas en la etapa inicial, muestran rasgos ultraestructurales que sugieren que la función de suministro de oxígeno y nutrientes puede verse dificultada (Luque *et al*, 1995b).

La matriz extracelular y la reintegración mecánica

La matriz extracelular o tejido conectivo es esencial tanto para el desarrollo y mantenimiento de la histoarquitectura como para el funcionamiento del músculo esquelético adulto, ya que es el medio por el que se transmiten las fuerzas mecánicas musculares (Purslow, 2002). Básicamente, se organiza en epimisio, perimisio y endomisio (así como en uniones miotendinosas) y constituye el armazón que sostiene a las fibras musculares, vasos y nervios (Turrina *et al*, 2013; Peña y Jimena, 2013). En

condiciones normales, y simultáneamente al desarrollo y crecimiento de las nuevas fibras musculares, el tejido conjuntivo se reorganiza permitiendo la recuperación de la histoarquitectura normal del músculo esquelético: la restauración de la distribución fascicular, la correcta orientación de las fibras musculares, la disposición apropiada de vasos y nervios y la recuperación de las uniones miotendinosas.

El fibroblasto, principal tipo celular, se encarga de producir la mayoría de los componentes de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, metaloproteinasas y proteoglicanos), por lo que es el principal responsable del mantenimiento, reparación y regeneración de dicha matriz (Gillies y Lieber, 2011). Las fibras musculares se encuentran rodeadas por una lámina basal, íntimamente conectada al endomisio, y compuesta fundamentalmente por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicano-heparán sulfato (Peña y Jimena, 2013). En el caso de que las láminas basales sean destruidas como consecuencia de un daño severo, puede ocurrir que los fibroblastos ocupen las áreas afectadas, invadan el interior de los tubos de lámina basal creando bandas o puentes de tejido conectivo que impiden la reconstrucción de la fibra (Vaittinen *et al*, 2002). Aunque en los casos de lesión muscular el fibroblasto sigue desempeñando el principal papel secretor para producir los componentes de la matriz extracelular, las células satélites y las propias fibras musculares parecen secretar también componentes de la matriz extracelular (Gillies y Lieber, 2011). Conforme progresa el proceso regenerativo, se incrementa la expresión de diferentes componentes de la matriz extracelular en distintas ubicaciones en la zona lesionada como lámina basal (lamininas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ y colágeno IV), endomisio y perimisio (fibronectina) o unión miotendinosa (tenascina-C) así como proteínas de adhesión celular (VCAM-I y la integrina $\alpha 4\beta 1$) (Grounds *et al*, 1998). Además, se establece una interacción entre células inflamatorias, mioblastos y miotubos con las células residentes como las células fibroadipogénicas (Joe *et al*, 2010) que se activan para contribuir a la síntesis y remodelación de la matriz extracelular mediante la secreción de metaloproteinasas (Carmeli *et al*, 2004).

En la relación de las fibras musculares regenerativas con el tejido conectivo hay que considerar el restablecimiento de las uniones miotendinosas. En lesiones, como

las roturas musculares, las fibras musculares crecen en el espesor de la matriz extracelular, estableciéndose pequeñas uniones entre las terminaciones de las fibras musculares regenerativas y el tejido conectivo (Hurme y Kalimo, 1992; Kääriäinen *et al*, 2000).

Cuando en la lesión muscular se produce una alteración del entramado conectivo (especialmente endomisio y perimisio), se puede favorecer el desarrollo de la fibrosis ya que a través de él se aplican las fuerzas mecánicas (Carlson, 2003). También cuando la regeneración se desarrolla bajo un déficit de tensión, como el provocado por la tenotomía, el resultado es una regeneración anormal en la que no sólo se favorece la fibrosis (Luque *et al*, 2002) sino también el desarrollo de fibras musculares anormales (Peña *et al*, 2001; Peña *et al*, 2007). Recientemente, se ha puesto de manifiesto la importancia que juegan las tensiones mecánicas sobre el comportamiento de las células miogénicas y las propiedades mecánicas de la matriz extracelular o de actuaciones mecánicas extrínsecas en la progresión del proceso regenerativo y las implicaciones que se derivan de una desregulación del entorno biofísico de la matriz extracelular del músculo esquelético en la enfermedad y en el envejecimiento (Li *et al*, 2018).

La reinervación

Mientras que las etapas inicial y madurativa de la fase regenerativa se desarrollan en un ambiente aneural, la etapa de estabilización precisa de la inervación, necesaria para el crecimiento y maduración de la fibra muscular regenerativa. Esto implica que hasta esta etapa las fibras musculares regenerativas no muestran diferenciación en tipos histoquímicos. Está perfectamente establecido que la inervación, aparte de ser un factor trófico, es un factor regulador que controla la diferenciación terminal, la estabilidad del fenotipo diferenciado y la actividad funcional de las fibras musculares esqueléticas; por esta razón la presencia de una inervación intacta es crucial para la diferenciación y maduración final de las fibras musculares regenerativas (Sesodia y Cullen, 1991).

El proceso de reinervación depende del tipo de lesión, en base a si los nervios pueden verse afectados o no (Ceafalan *et al*, 2014). Si las fibras musculares regenerativas no son reinervadas, quedarían atróficas de manera irrecuperable (Noah *et al*, 2002). Sin embargo, como consecuencia de roturas de miofibras y la separación de los extremos por una cicatriz fibrosa, los segmentos distales que no presentan uniones neuromusculares, podrían ser reinervadas por brotes axonales (Ciciliot y Schiaffino, 2010). Recientes estudios experimentales demuestran la necesidad de combinar técnicas de reparación de nervios intramusculares al mismo tiempo que ocurre la reparación muscular al objeto de minimizar la atrofia y la fibrosis (Lim *et al*, 2006; Pessina *et al*, 2014).

Medicina regenerativa del músculo esquelético

Conceptos básicos en Medicina Regenerativa

La Medicina Regenerativa es una disciplina biomédica surgida a partir de los años 50 del siglo pasado por *“la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y las ciencias de la vida para la comprensión fundamental de las relaciones entre estructura-función de los tejidos de mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos”* (Viola *et al*, 2003).

Las estrategias a través de las cuales la Medicina Regenerativa tiene su expresión como entidad son fundamentalmente tres:

1. Ingeniería tisular. Emplea los principios de la ingeniería para la construcción de equivalentes tisulares, denominados *constructos* generados en un laboratorio (Campos, 2004).
2. Terapia celular. Utilización de células cultivadas *in vitro* para su aplicación terapéutica. Sus técnicas pueden aplicarse a nivel local *-in situ-* (terapia regenerativa postinfarto –Suárez de Lezo *et al*, 2007-) o de forma sistémica (trasplante de progenitores hematopoyéticos -Thomas *et al*, 1957-).
3. Estimulación de la capacidad regenerativa de los tejidos. Promueve la capacidad exhibida por algunos tejidos, por la que se pueden reparar pérdidas volumétricas

(Sicari *et al*, 2015) en determinados órganos. Son cada vez más los autores que sostienen que la incorporación de determinados biomateriales acelulares y no inmunogénicos permiten la estimulación de la capacidad regenerativa de algunos tejidos (Corona y Greising, 2016) sin tener que recurrir, generalmente, a las técnicas habituales de transferencia celular, entre otras.

Así mismo, existen diferentes elementos que en solitario o en combinación sirven para el desarrollo de cada una de las estrategias anteriormente citadas:

-Biomateriales. Es el material de soporte de las células en los sistemas biológicos y a partir del que se construye un armazón. Tiene como función el mantenimiento de la viabilidad tisular, así como el mantenimiento fenotípico celular y de síntesis de sustancias para la homeostasis tisular (Campos, 2004).

-Scaffolds (andamiaje o armazón en español). Es una estructura, generalmente de naturaleza biocompatible -fabricada a partir de biomateriales- que permite el adecuado soporte celular, y conducir la respuesta regenerativa en el sistema biológico adecuado.

-Biorreactores. Es un sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo, generalmente para el mantenimiento de un medio de cultivo celular en unas condiciones específicas y dinámicas

-Constructos. Estructura formada por los componentes requeridos para la construcción de un tejido artificial (células, biomateriales y biorreactor), que puede ser tisular (reproducción estricta de un tejido) o de órgano (reproduce la estructura de un órgano, y por tanto con grupos celulares distintos).

-Descelularización. Es el procedimiento mediante el cual se eliminan las células para obtener una matriz extracelular por combinación secuencial de procesos físicos, químicos y biológicos. De esta forma, se mantiene indemne la estructura del andamiaje celular para su utilización como componente bioactivo (Rana *et al*, 2017; Somuncu, 2019).

Los elementos que combinados entre sí, o en solitario se emplean en la ingeniería tisular del músculo esquelético incluyen: células troncales, biomaterials y factores de crecimiento.

Células troncales empleadas en ingeniería tisular de músculo esquelético

Una célula troncal (CT, también conocida de forma divulgativa como “*célula madre*”) es aquella que está dotada simultáneamente de la capacidad de autorrenovación y de originar células comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, que se convertirán finalmente por diferenciación en tipos celulares especializados (Vazin y Freed, 2010). Las CT, pueden ser clasificadas según su origen (embrionarias, fetales y adultas) o según su potencialidad (totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales) (Dakhore *et al*, 2018).

Las células troncales adultas (CTA) son células que residen en nichos tisulares específicos para el mantenimiento de la integridad celular en el individuo adulto y están, además, involucradas en la reparación directa y en la respuesta de esos tejidos frente a la lesión (Wang y Zhou, 2016). De forma general las CTA son uni o multipotenciales, aunque existen estudios que han demostrado que determinados tipos de células adultas pueden tener un comportamiento como CT pluripotenciales a través de un fenómeno conocido como *transdiferenciación* (Thowfeequ y Tosh, 2007; Eberhard *et al*, 2008).

Para garantizar la función celular, así como la histoarquitectura, los fenómenos de reparación de los tejidos implican el reemplazo de los tipos celulares dañados. Existen tres teorías para explicar aquellos procesos de reparación tisular: teoría de la desdiferenciación (Toole *et al*, 1971; Song y Stocum, 2010), teoría de la transdiferenciación (Thowfeequ y Tosh, 2007) y activación de células precursoras quiescentes (Bhartiya, 2017); es en éstas últimas donde el papel de las células progenitoras tisulares específicas, las células troncales de la línea germinal y las células troncales pluripotenciales derivadas de tejidos mesenquimales humanos es

fundamental en el ámbito de la investigación en medicina regenerativa (Ratajczak *et al*, 2011; Qiu *et al*, 2018).

Hasta ahora, se han indicado de manera general estos aspectos sobre células troncales, pero remitimos a los interesados a consultar las excelentes revisiones que se incluyen en el capítulo de referencias bibliográficas.

Actualmente las investigaciones en el terreno de la regeneración y medicina regenerativa muscular se centran en las siguientes estrategias:

- Aprovechamiento de la *biología de la célula satélite*, como elemento clave en la reconstrucción de la fibra muscular dañada y los factores físico-moleculares que la controlan (Forcina *et al*, 2019). La célula satélite ha sido empleada tanto *in vivo* como *in vitro* (Bischoff, 1986) en ingeniería tisular del músculo esquelético (Syverud *et al*, 2014) a partir de una biopsia muscular y tras el aislamiento, purificación, preservación, proliferación y diferenciación de estas células (Vogler *et al*, 2016).

Diversos estudios han sido realizados con el fin de obtener músculo esquelético a partir de la combinación de CS y diferentes *scaffolds*. Machingal *et al*, fueron los pioneros en la primera reparación muscular generada por ingeniería tisular empleando célula satélite; tras su cultivo se obtuvieron mioblastos que fueron implantados en submucosa de vejiga urinaria porcina descelularizada, en un biorreactor que ofrecía tensión mecánica promoviendo el alineamiento y la diferenciación hacia fibras musculares. Este experimento se ensayó en un modelo de VML de músculo dorsal ancho, donde se observó mejor recuperación funcional allí donde se empleó el constructo. Por otro lado, Corona, *et al* (2012 y 2014), perfeccionaron este modelo utilizando tiempos de implantación más largos en un modelo de VML en rata Lewis. Los animales tratados mediante técnicas de ingeniería tisular no mostraron más recuperación histológica que los no tratados; sin embargo, en los animales que se empleó células musculares diferenciadas en el constructo respondieron mejor. Por otro lado, VanDusen *et al* desarrollaron unidades musculares esqueléticas (las células

satélites fueron aisladas enzimáticamente, cultivadas en monocapas y se enrollaron en una estructura tridimensional, generando tensión pasiva) sin *scaffolds* y fueron implantadas en un modelo de VML. A 28 días postimplantación, se observó aumento significativo de la fuerza tetánica isométrica en los músculos con VML tratados, respecto a los no tratados.

Además, las CS liberan microvesículas/exosomas (Spinazzola y Gussoni, 2017) con efectos funcionales y fenotípicos en otras células en el músculo huésped, por lo que en combinación con otro tipo de células, como las ADSC, pueden estar implicadas en la respuesta miogénica tras la VML y la implantación de un *scaffold*.

Pese a estos avances, la utilización de CS tiene limitaciones relevantes que condicionan su empleo en SMTE. En primer lugar, el aislamiento de las CS es un proceso laborioso cuya eficacia no siempre implica una alta viabilidad celular. Así mismo, la obtención de la biopsia muscular no es un proceso exento de complicaciones. Es por esto, que es preciso explorar otras fuentes de células troncales (Pantelic y Larkin, 2018).

- Identificación y caracterización de otras poblaciones de células troncales diferentes a la CS residentes en músculo esquelético (Bautch, 2011; Muñoz-Cánoves *et al*, 2016) o de origen extramuscular.

Los pericitos son una población de células troncales que se encuentran en las paredes de los capilares, debajo de la lámina basal, tanto en músculo esquelético como en otros tejidos (Ruz-Caracuel *et al*, 2013; Bautch, 2011), y pueden ser tipo I y tipo II (Gautam y Yao, 2019). Los pericitos aislados de músculo esquelético, tejido adiposo blanco, páncreas y placenta tienen potencial miogénico (Crisan *et al*, 2012). Dellavalle *et al*, demostraron en ratón que los pericitos participan en el desarrollo normal del músculo esquelético postnatal al diferenciarse en fibras musculares e infiltrarse en el nicho de la CS para generar CS. De este modo, la capacidad miogénica del pericito es un proceso natural que ocurre durante el desarrollo y aumenta en respuesta a una lesión aguda. Las propiedades observadas en los pericitos los hacen

potenciales en la utilización en SMTE, ya que no sólo se pueden aislar del músculo esquelético, sino también de otros tejidos de mejor acceso quirúrgico y con menor riesgo de complicaciones (tejido adiposo). Así mismo, su baja expresión de MHC II, entre otras moléculas de adhesión como CD80 y CD86 que co-estimulan la clonalidad de linfocitos T, permiten su uso en el trasplante celular (Domev *et al*, 2014; Harrell *et al*, 2018). En el caso del modelo experimental que plantea esta tesis (VML), los pericitos no han sido utilizados. No obstante, hay evidencias en SMTE de que el aislamiento de pericitos y su cultivo con determinados biomateriales (polietilenglicol, fibrinógeno e hidrogeles) mejoran su potencial miogénico (Fuoco *et al*, 2014; Cathery *et al*, 2018), por lo que su utilización en el futuro en SMTE puede ser prometedor, ya que estudios recientes sugieren que los pericitos pueden servir como una fuente de miofibroblastos durante la fibrosis del músculo esquelético (Gautam y Yao, 2019).

Las células troncales mesenquimales de médula ósea (BM-MSC), poseen un papel inmunomodulador y de soporte de células troncales de la médula ósea (Muñiz *et al*, 2015), siendo una población con similitudes con las células troncales derivadas del tejido adiposo (ADSCs). Ambas tienen potencial miogénico y residen en las paredes vasculares de sus tejidos de origen (Boxal y Jones, 2012; Busser *et al*, 2015). Además, la menor expresión de MHC I y II las hace buenas candidatas para el trasplante celular por la menor inmunogenicidad (Jacobs *et al*, 2013; Sindberg *et al*, 2014). Actualmente, no existen evidencias en modelos de VML donde se empleen BM-MSC. Las BM-MSC podrían ser una terapia viable en el futuro en lesiones musculares esqueléticas, tanto por una mejor recuperación estructural y funcional de la actividad supresora de proteínas pro-inflamatorias, como la menor síntesis de TGF- β , que permite una menor fibrosis (Helal *et al*, 2016; Delaney *et al*, 2017).

Por el papel futuro que tienen las ADSC en medicina regenerativa y teniendo en cuenta la línea central de esta tesis, existen diferentes líneas de investigación en la aplicación de estas células, adonde remitimos al lector que desee ampliar sus conocimientos (Rivera-Izquierdo *et al*, 2019; Huri *et al*, 2018; Pantelic y Larkin, 2018).

Fue el grupo de Kesireddy *et al* (2016), quien demostró en un modelo de VML que las ADSCs no promueven el proceso de formación de neo-músculo de forma tan vigorosa como los progenitores musculares (SC); sin embargo, la vascularización fue mayor que en el modelo control, probablemente por el empleo de matriz extracelular descelularizada procedente de vejiga urinaria. Es por esto, que existen datos indirectos que hacen buenas candidatas a la ADSCs para su empleo en SMTE debido a su gran multipotencialidad y disponibilidad. Así mismo, cuando se combinan las ADSCs con otros biomateriales naturales, como la fibrina-electrohilado (también conocido como fibrina-electrospun), que mimetizan la estructura fibrilar del músculo se promueven *in vitro* las propiedades miogénicas en las ADSCs inducidas o no inducidas sin llegar a replicarse de manera total como pueden hacer los miotubos *in vitro*. Además, en la implantación en una VML, las fibras generadas se integran bastante bien en el tejido nativo, aumentando la supervivencia de las ADSCs trasplantadas, incrementando incluso la revascularización (Gilbert-Honick *et al*, 2019).

Estas ADSCs tienen capacidad de diferenciación a distintos tejidos de la línea mesodérmica, como se ha explicado previamente (Zuk *et al*, 2001; Zuk *et al*, 2002). Además en cultivo expresan poco MHC tipo I, por lo que donantes alogénicos o xenogénicos podrían eludir el sistema inmune del receptor, evitando respuestas inflamatorias similares a las de un rechazo tisular (Lin *et al*, 2012; Pelatti *et al*, 2016).

Las ADSCs secretan exosomas con efectos funcionales y fenotípicos sobre otras células (Wong *et al*, 2019), lo que sugiere que cuando éstas son implantadas en el músculo huésped deben de estar involucradas en la respuesta miogénica generada después de la implantación de tejido adiposo. Además, es interesante observar que los exosomas también se secretan durante la diferenciación de mioblastos humanos, lo que aumenta su utilidad como agente para la regeneración muscular (Choi *et al*, 2016).

Otro tipo celular empleado en la recuperación de VML son las células troncales mesenquimales derivadas del cordón umbilical (UC-MSCs), que tienen un elevado potencial de diferenciación (Wang *et al*, 2011; Beeravolu *et al*, 2017) orientado hacia la diferenciación miogénica (Gang *et al*, 2004; Jazedje *et al*, 2009). Estas células, han sido estudiadas en el campo de las distrofias musculares, con resultados a veces

contradictorios tanto *in vitro* como *in vivo* (Nunes *et al*, 2007; Zucconi *et al*, 2011), donde la fusión de los precursores para la formación de miotubos no está bien definida, pero sí la función inmunomoduladora de estas células. Por lo tanto, en un futuro su papel puede ser importante una vez que se conozcan de manera más precisa los mecanismos de diferenciación miogénica de las UC-MSCs para su aplicación en VML.

- En último lugar, mencionar las células troncales pluripotentes inducidas -iPSC- que son generadas *in vitro* e *in vivo* al cultivar células troncales adultas e inducir la regulación de los factores de transcripción que dan lugar a la pluripotencialidad (son capaces de auto-renovación ilimitada en cultivo). Estas células ofrecen ventajas respecto a otros tipos de CT (Tchao *et al*, 2013; Maffioletti *et al*, 2015; Shi *et al*, 2017; Wang *et al*, 2018). Pese a que no hay evidencias actuales del empleo de iPSCs en SMTE ante VML, sí se han utilizado estas células en modelos de distrofia muscular de Duchenne (mejoran la incorporación de distrofina a la fibra así como la contractilidad de la misma), lo que nos puede orientar hacia su comportamiento en modelos regenerativos (Maffioletti *et al*, 2018).

Biomateriales

Los biomateriales son compuestos de origen natural o sintético, sólidos o líquidos que están en contacto con sistemas biológicos para ser utilizados con fines biomédicos (Londono y Badylak, 2014). Se puede afirmar, de forma general, que farmacológicamente son inertes y se incorporan o se implantan dentro de un sistema biológico para el reemplazo o restauración de alguna función, permaneciendo en contacto permanente o intermitentemente con los fluidos corporales o los tejidos humanos (Hutmacher *et al*, 2007).

El campo de investigación sobre biomateriales ha tenido en los últimos años un crecimiento exponencial. La generación de estos nuevos biomateriales ha constituido en biomedicina un proceso multidisciplinar donde convergen los principios de la

química, la ingeniería, la física y las ciencias de los materiales (Grodzinski *et al*, 2006; Wheelton *et al*, 2016).

La construcción de tejidos bioartificiales, de naturaleza conectiva, por medio de ingeniería tisular como cartílago, dermis o músculo esquelético requieren la utilización de materiales que actúen como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo y que permitan una adecuada orientación de los elementos constitutivos del mismo (Ma *et al*, 2005; Hubbell, 2014; Wheelton *et al*, 2016), empleándose para esto varios tipos de biomateriales.

Los biomateriales actúan simulando una matriz extracelular, promoviendo la proliferación, la diferenciación y la biosíntesis celular. Los compuestos que constituyen los biomateriales son de diferente tipo y han de cumplir los siguientes principios básicos:

- No ser tóxicos.
- Biocompatibilidad.
- Ausencia de potencial carcinogénico.
- Tolerancia a la esterilización para el uso.
- Poseer propiedades mecánicas: permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad para poder generar estructuras sólidas tridimensionales (Yang *et al*, 2001; Hutmacher *et al*, 2001).
- Permitir la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento (Walgenbach *et al*, 2001; Kwan *et al*, 2007).
- Deberán de servir de vehículo para el transporte de las células utilizadas en el sitio de implantación del tejido u órgano receptor (Walgenbach *et al*, 2001; Kwan *et al*, 2007).

Clasificación de los biomateriales empleados en medicina regenerativa

Los biomateriales que se utilizan en ingeniería tisular se pueden clasificar en tres grupos principales según su origen: biológicos (o biogénicos), sintéticos y semisintéticos (Dunn *et al*, 2019; Liu *et al*, 2018; Porzionato *et al*, 2018).

El biomaterial ideal para la SMTE debe cumplir con los siguientes criterios: 1) coincidir con la complianza del tejido nativo para resistir el estrés unidireccional sin fatiga de materiales; 2) biodegradarse a una velocidad que coincida con la velocidad de regeneración del tejido, proporcionando un apoyo continuo durante todo el proceso de reparación, y permitir la reabsorción gradual; 3) poseer una organización espacial 3D y porosidad para permitir la infiltración e integración con el tejido huésped; y 4) poder generarse de forma reproducible y con facilidad de manejo (Nakayama *et al*, 2019). Dependiendo del grado lesional y su ubicación anatómica, y las características biofísicas, la estrategia de tratamiento y el enfoque terapéutico pueden variar.

Los materiales biológicos incluyen las matrices acelulares generadas a partir de colágeno, agarosa, glucosaminoglucanos y fibrina (Saadeh *et al*, 2001; Bumgardner *et al*, 2003; Seol *et al*, 2004; Solchaga *et al*, 2002). Los sintéticos incluyen el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, polidimetil-siloxano; los de tipo aromático de base de poliéter como el poliuretano termoplástico; entre varios hidrogeles (Neuss *et al*, 2008, Behravesht *et al*, 1999). Por último, los semisintéticos son una combinación de los otros dos (Munirah *et al*, 2008).

En función de la estructura de los biomateriales, se pueden también clasificar como fibrosos, poliméricos y mixtos:

- **Biomateriales fibrosos.** Los más empleados y conocidos son el colágeno y la fibrina.
 - i. El *colágeno tipo I* es un biomaterial fibroso soluble en medios ácidos. Sintetizado por los fibroblastos y uno de los constituyentes más abundantes de la matriz extracelular del tejido conectivo, es

totalmente biocompatible, permitiendo el crecimiento celular en su interior y en su superficie. Los geles de colágeno tipo I, polimerizables, han sido utilizados en oftalmología, dermatología y la odontología (Reichl y Muller-Goymann, 2003).

- ii. La *fibrina* es un producto generado a partir del fibrinógeno (componente del plasma sanguíneo y participante en la hemostasia primaria). Dado su carácter autólogo y su biocompatibilidad es muy útil para su uso en biomedicina (Meana *et al*, 1998; Alaminos *et al*, 2006).
- *Biomateriales poliméricos*. Los más empleados son los que constan de cadenas de monómeros de hidratos de carbono (glucosa). Algunos de ellos son:
- i. La *agarosa*, que se obtiene a partir de la pared celular de ciertas algas marinas del grupo de *Rhodophyceae*, sobre todo *Gracillaria* sp. y *Gellidium* sp, es utilizada en ingeniería tisular en traumatología (Stevens *et al*, 2005; Kumar *et al*, 2018) fundamentalmente a nivel de cartílago y hueso (Hasan *et al*, 2019); además existen avances esperanzadores a nivel nervioso en lesiones medulares (Gao *et al*, 2013; Has *et al*, 2018).
 - ii. La *gelatina* es un material fácilmente purificable a partir de ciertos tejidos animales, especialmente del colágeno del que tras una hidrólisis parcial se obtiene un material soluble en agua procedente de uno insoluble y fibroso (Gómez-Guillén *et al*, 2011). Esta propiedad ha hecho que se haya empleado como vehículo para la liberación de sustancias, así como para permitir el reclutamiento de proteínas necesarias para la angiogénesis en combinación con otros biomateriales como la policaprolactona (PCL) (Jiang *et al*, 2017; Ghasemkhah *et al*, 2019).
 - iii. El *quitosán* se obtiene a partir de la quitina existente en el exoesqueleto de crustáceos marinos -heteropolisacárido- (Sacco *et al*, 2018). En su interior, sí se produce un crecimiento adecuado de las células, pero su integración en humanos es mucho más compleja

dado el origen filogenético distinto, teniendo un comportamiento como biomaterial muy restringido. Sin embargo, los avances en combinación con otros biomateriales mixtos como hidrogeles y alginato son alentadores (Tithito *et al*, 2019; Ducret *et al*, 2019).

- iv. Existen otros biomateriales como el *ácido hialurónico* o el *alginato*, que pese a su biocompatibilidad se degradan por el organismo de forma no enzimática. Aun así, han mostrado su utilidad en determinados tejidos, especialmente en combinación con otros elementos constitutivos de la matriz extracelular, por el papel relevante en la regulación e inmunomodulación celular (Goldman *et al*, 2018; Sun *et al*, 2018; Kenar *et al*, 2019; Ruvinov *et al*, 2019).
- *Biomateriales mixtos*. Cuando se combinan distintos biomateriales, en función de sus propiedades se pueden controlar algunas de las desventajas que el biomaterial posee de manera aislada. En el campo de la medicina regenerativa las combinaciones más relevantes son:
 - i. La fibrina-agarosa (Campos *et al*, 2017) con demostrada utilidad en la generación de tejidos humanos artificiales para su uso clínico en nervio (Carriel *et al*, 2017), vejiga (Jaimes-Parra *et al*, 2016) y hueso (Liceras-Liceras *et al*, 2017).
 - ii. Alginato-gelatina (Nabavinia *et al*, 2019).
 - iii. Quitosán-gelatina (Ji *et al*, 2015).
 - iv. Compuestos de gelatina y polisacáridos, ya que los *scaffolds* de gelatina combinada se están imponiendo con fuerza por la similitud estructural a algunos de los componentes de la matriz extracelular, lo que permite que la fuente de obtención de estos materiales no sea limitada, el hecho de ser un biomaterial natural ofrece unas ventajas muy peculiares desde el punto de vista tanto inmune como biomecánico (Zhang *et al*, 2016; Echave *et al*, 2017; Afewerki *et al*, 2018; Gattazzo *et al*, 2018).
 - v. Elementos de la matriz extracelular y diferentes biomateriales que de manera aislada o no, colaboran en la reparación tisular o son degradados por el sistema biológico al no incorporarse como

biomaterial (ácido hialurónico y alginato, por ejemplo) (Basiri *et al*, 2019; Siqueira *et al*, 2019). Además, se están explorado otras combinaciones como estrategias en ingeniería tisular.

Biomateriales empleados en ingeniería tisular del músculo esquelético.

Dada la amplia distribución del músculo esquelético en el organismo, la posibilidad de un traumatismo muscular es muy frecuente. Estas lesiones pueden ser causadas por contusiones durante la actividad deportiva, laceraciones y/o compresiones en traumatismos y accidentes de distinto mecanismo de producción (heridas de guerra, accidentes de tráfico) o como resultado de una intervención quirúrgica (resecciones tumorales amplias) (Kwee y Mooney, 2017). El conocimiento adquirido en biomateriales empleados en SMTE ha sufrido un gran avance por el aumento de la sofisticación de los materiales empleados, mejorando la biocompatibilidad, inmunogenicidad y la degradación del biomaterial cuando deja de ser útil en el lugar de implantación (Nair y Laurencin, 2007; Hubbell, 2009). A estos aspectos hay que añadir la aplicación de diferentes técnicas físico-químicas, de impresión 3D y de biomimetismo muscular para conseguir una adecuada proliferación, migración y asentamiento de los precursores musculares (Chen *et al*, 2015; Hejbøl *et al*, 2017; Casanellas *et al*, 2018; Nakayama *et al*, 2019).

Los *scaffolds* para la regeneración del músculo esquelético se han obtenido de una variedad de materiales que van desde polímeros sintéticos como ácido poliglicólico (PGA) (Saxena *et al* 1999; Kim *et al*, 2006) y policaprolactona (PCL) (Choi *et al*, 2008), a materiales procedentes de matriz extracelular descelularizada (Sicari *et al*, 2014; Sicari *et al*, 2015), polímeros naturales como el alginato (Borselli *et al*, 2010), el colágeno (Kroehne *et al*, 2008; Beier *et al*, 2009; Chen *et al*, 2015) y la fibrina (Page *et al*, 2011; Kesireddy, 2016; Gilbert-Honick *et al*, 2019). Además del uso de una variedad de biomateriales como *scaffolds* acelulares, las estrategias empleadas para la medicina reparativa del músculo esquelético han incluido distintos tipos celulares, factores de crecimiento o biomateriales en combinación de los otros elementos mencionados para generación de constructos (Liao y Zhou 2009; Dunn *et al*, 2019; Liu *et al*, 2018). La

incorporación de células a éstos *scaffolds* ha aumentado significativamente la supervivencia de las células implantadas en la lesión, que en trabajos iniciales no superaba el 5% (Hill *et al*, 2006; Thorrez *et al*, 2008).

Distingamos ahora las distintas estrategias y avances recientes para la recuperación de pérdidas volumétricas musculares centrándonos en los biomateriales empleados:

- Polímeros sintéticos. Son una variedad de biomateriales que se han utilizado para la regeneración del músculo esquelético como PGA (Saxena *et al*, 1999), ácido poliláctico (PLA) (Cronin *et al*, 2004), sus copolímeros (PLLA/PLGA) (Lesman *et al*, 2011; Shin *et al*, 2015; Wright *et al*, 2015; Zhao *et al* 2016), y PCL (Choi *et al*, 2008; Kim *et al*, 2010). Estos materiales sintéticos ofrecen varias ventajas respecto a los polímeros naturales, como su capacidad para aunar con precisión las propiedades mecánicas y estructurales que se pueden adaptar a cada aplicación de ingeniería de tejidos (Williamson *et al*, 2006). Los polímeros sintéticos se pueden fabricar fácilmente en una variedad de geometrías tales como fibras individuales o mallas con orientación alineada o aleatoria de nanofibras (Ostrovidov *et al*, 2014), añadiendo además factores de crecimiento que se liberen en la zona de la lesión. Los mioblastos de rata (las células que mayor rendimiento han mostrado en su combinación con estos biomateriales) (Browe y Freeman, 2019), por su inherente bioactividad existen muchas estrategias para hacer funcionales las superficies de los constructos poliméricos sintéticos, como la adición de colágeno o matriz extracelular descellularizada para modular las respuestas tisulares, especialmente las inmunogénicas (Choi *et al*, 2008; Wolf *et al*, 2014). Así mismo, la PCL remedia el alineamiento muscular, como ocurre en *scaffolds* alineados uniaxiales en estructura 3D (Wang *et al*, 2013; Yang *et al*, 2019).

La principal limitación de los materiales sintéticos es que típicamente estimulan una respuesta de cuerpo extraño caracterizada por un aumento de células gigantes (Wolf *et al*, 2015), induciéndose una respuesta

inflamatoria prolongada, razón por la que se utilizan en combinación mayoritaria con polímeros naturales, así como una polarización sostenida de los macrófagos M1. La bioactividad limitada de estos biomateriales restringe su utilidad para el tratamiento de pérdidas volumétricas de músculo esquelético, además que dificultan en el proceso de angiogénesis tan importante para la viabilidad del implante.

- *Biomateriales descelularizados.* Las matrices descelularizadas que se han empleado se obtienen de distintos tejidos como intestino delgado, vejiga urinaria, dermis, incluso pericardio y músculo esquelético. Su empleo como biomaterial se debe a la presencia de proteínas de la matriz y factores de crecimiento fundamentales para la regeneración de tejidos en su lugar de origen (Badylak, 2007; Badylak *et al*, 2009; Brown y Badylak, 2014), pese a que en el proceso de descelularización se pueden dañar algunos de estos elementos al desnaturalizarse. Según la bibliografía no existen ventajas concretas respecto al lugar de implantación de la matriz extracelular descelularizada y sus aplicaciones en el músculo esquelético (Urciolo y De Coppi, 2018; Porzionato *et al*, 2018). Aunque estos constructos son angiogénicos, al existir resultados contradictorios en el empleo de matrices descelularizadas, son necesarios más estudios (Alvarèz-Fallas *et al*, 2018). La adición de BM-MSM a estos constructos permite una recuperación funcional respecto a los constructos acelulares (Merrit *et al*, 2010; Valentin *et al*, 2010). Las matrices de vejiga descelularizada que fueron sembradas con células derivadas de músculo diferenciadas antes de la implantación, permitieron la recuperación funcional de la VML dos meses después de la lesión respecto al músculo no lesionado (Machingal *et al*, 2011; Corona *et al*, 2012). Sin embargo, en tiempos más largos (entre 3 y 6 meses) postlesión, la matriz vesical urinaria y submucosa intestinal descelularizadas, permiten una mejor remodelación muscular, por las propiedades estabilizadoras de estos *scaffolds* (Teodori *et al*, 2014; Corona *et al*, 2014). Corona *et al* observaron un aumento del peso muscular a los 2 meses respecto a los 6 meses, lo que puede sugerir la formación de fibrosis

muscular (Corona *et al*, 2013a; Corona *et al*, 2014). En ensayos clínicos en seres humanos el empleo de submucosa intestinal o matriz vesical ha permitido una recuperación parcial de la funcionalidad mecánica (Mase *et al* 2010). Estos materiales descelularizados tienen la capacidad de dirigir una respuesta regenerativa, procedente de los bordes de la VML, en un periodo de tiempo mayor. Una estrategia alternativa al uso de la matriz descelularizada podría ser utilizar una lámina fina de músculo esquelético no descelularizado. Se ha observado en un estudio, que un fragmento muscular implantado en VML permite hasta un 55% de recuperación del déficit (Corona *et al* 2013b). Sin embargo, el empleo de matriz descelularizada procedente de músculo esquelético (tibial anterior murino) pueden ser ventajosa para su uso allí donde el tejido dañado todavía está presente, pero no para aquellos VML donde el tejido muscular estaba destruido o perdido. Sin embargo, el ambiente promiogénico, permite la formación de nuevas fibras musculares derivadas del huésped (Perniconi *et al*, 2011).

Recientemente se ha propuesto el desarrollo de injertos de músculo esquelético diseñados a partir de ECM homólogas y células autólogas para reemplazar las pérdidas musculares volumétricas (Porzionato *et al*, 2018). Muchos de estos trabajos se han realizado con modelos animales (Urciuolo y De Coppi, 2018), mientras que no se han hecho muchos estudios en humanos. El grupo de Porzionato (2018), tiene experiencia en músculo esquelético humano procedente de amputación (músculo tibial anterior y recto anterior del abdomen) que fue descelularizado sin ser recelularizado *in vitro*, pero sí *in vivo* en modelos animales de VML (conejo), encontrándose a las 3 semanas migración de células progenitoras musculares hacia la periferia del implante. Por otro lado, Wilson *et al* (2016), describieron la descelularización del recto femoral y los músculos supraespinosos demostrando que la edad del donante es un factor limitante para el proceso descelularizador y que las propiedades biológicas también se ven condicionadas por el tipo de músculo (aspecto importante, ya que los

scaffolds biológicos han de poder degradarse dentro del biorreactor en el que han sido implantados). Sin embargo, la edad no interfiere de manera especial en la respuesta regenerativa tras la VML (Kim *et al*, 2016).

- Polímeros naturales. El alginato, quitosán, el colágeno o la fibrina se han utilizado en SMTE (Borselli *et al*, 2010; Guo *et al*, 2019; Kroehne *et al*, 2008; Beier *et al*, 2006 y 2009). A diferencia de los polímeros sintéticos, los naturales poseen señales intrínsecas bioactivas y pueden formar complejos con los carbohidratos, formando proteoglicanos de la familia de los heparán-sulfato que permiten una mejor conexión con los factores de crecimiento potenciando la migración, proliferación o diferenciación celular (Walters y Stegemann, 2014).

El alginato por sus propiedades químicas favorece la adhesión celular, empleándose cada vez más como constructo en SMTE (Wang *et al*, 2014). Así mismo, los geles de alginato enriquecidos con HGF y FGF2 han aumentado significativamente la viabilidad de los mioblastos dentro del constructo, y la migración de mioblastos fuera de éste (Hill *et al* 2006). Cuando estos geles incorporan la presencia de VEGF y IGF1 (Borselli *et al*, 2010) en un modelo de lesión muscular por isquemia, se evidencia una mejora de la vascularización temprana del constructo y la supervivencia de los mioblastos en el lugar del defecto volumétrico (Borselli *et al* 2010; Shvartsman *et al*, 2014), así como el aumento de la fuerza muscular respecto a los controles.

El quitosán, en ocasiones, combinado con otros materiales, en modelos de VML y en forma de hidrogeles permiten mioconducción celular así como biodegradación del material, siendo candidatos potenciales para el desarrollo celular y para la reparación del músculo esquelético (Guo *et al*, 2019).

Los constructos generados con colágeno tipo I han tenido una gran cantidad de aplicaciones en ingeniería tisular: piel, cartílago, hueso, tendón, nervio y músculo esquelético (Chattopadhyay y Raines, 2014; Parenteau-Bereil *et al*, 2010). En los geles de colágeno, procedente de piel, empleados

en la regeneración del músculo esquelético se ha observado muerte de los mioblastos implantados, y una fusión parcial, a veces inexistente, por lo que la recuperación muscular es mucho peor (van Wachem *et al*, 1999) que la observada con otros biomateriales empleados. Las matrices acelulares de colágeno promueven una reparación no ordenada de grandes defectos musculares, apareciendo tejido fibroso entre las 12-24 semanas postlesión, limitando por tanto la recuperación funcional (Kin *et al*, 2007). Para que el proceso regenerativo muscular sea más ordenado, con alineación de las fibras musculares regenerativas, se han ideado geles de colágeno con poros que facilitan que los miotubos se alineen en la dirección del poro. Pero, esta respuesta regenerativa no es tan potente como era esperada, y se añadieron moléculas derivadas de heparina para potenciar una liberación controlada de factores de crecimiento en el lugar de la lesión (van Wachem *et al*, 2001). La adición de otros factores como HGF, IGF1, y FGF2 a los geles de colágeno no ha dado los resultados adecuados ya que sólo en fases iniciales del proceso regenerativo han potenciado una recuperación funcional (Ju *et al*, 2014).

La fibrina, por su bioactividad intrínseca y su papel en la reparación de las heridas a través de la vía hemostática, ha sido muy utilizada como constructo en modelos musculares regenerativos (Brown y Barker, 2014). Se trata de un polímero microfibrilar ramificado formado cuando se activa la trombina al escindirse en dos pequeños péptidos. Los geles de fibrina se han utilizado como matriz para la siembra *in vitro* en defectos musculares esqueléticos, en geles (Matsumoto *et al*, 2007) y posteriormente *in vivo* en VML (Matthias *et al*, 2018). Su degradación es temprana (unas 3 semanas), pero favorece la supervivencia y diferenciación de mioblastos hacia miofibras y la integración con el tejido no lesionado cuando los mioblastos se implantan en una región vascularizada (Beier *et al*, 2006; Gerard *et al*, 2012). Todo ello resulta, en la formación de un constructo vascularizado y funcional tras tres semanas postimplantación (Borschel *et al*, 2006; Matthias *et al*, 2018). En modelos de ingeniería tisular realizados a partir de

constructos con células endoteliales asociados a fibrina-PLLA/PLGA, a los que se han añadido también fibroblastos y mioblastos, se demostró que la utilización de múltiples tipos celulares asociados a un biomaterial concreto permiten aumentar la estabilidad del *scaffold* de fibrina (Lesman *et al*, 2011). Además, para que la tasa de actividad proteolítica descienda se ha añadido polietilenglicol al constructo de fibrina para modular las propiedades estructurales y permitir que factores de crecimiento como el IGF1, mejoren la respuesta regenerativa (Hammers *et al*, 2012). El empleo de microhilos de fibrina facilita en el proceso regenerativo la alineación a lo largo del eje longitudinal del material, remedando el nivel jerárquico de organización del músculo esquelético (Cornwell y Pins, 2007; Grasman *et al*, 2012). En el caso de la fibrina, la combinación con carbodiimida junto a la modificación del pH del microambiente tisular del constructo permite la atenuación de los microhilos de fibrina dando mas garantía de estabilidad al resultado final funcional (Grasman *et al*, 2014).

Los intentos de generar nuevos biomateriales han sido muy exitosos, especialmente debido a la facilidad de creación de éstos teniendo en cuenta geometrías tisulares muy variadas y con unas condiciones de fabricación muy controladas. Sin embargo, existen diferentes puntos débiles que deben de ser explorados: potenciar una mejor adhesión celular y evitar la respuesta de cuerpo extraño exagerada, son dos de los objetivos fundamentales y hacia donde se dirigen la mayoría de los estudios (Duong *et al*, 2009; Page *et al*, 2011; Chung *et al*, 2016).

Está establecido que las matrices descelularizadas dan unos resultados funcionales de mayor calidad respecto al defecto muscular, pero la integración entre el tejido sano y el lesionado es mucho más difícil en relación al tamaño del defecto (Garg *et al*, 2014; Aurora *et al*, 2015 y 2016). Sin embargo, los *scaffolds* naturales son mucho más bioactivos que los sintéticos lo que permite una mejor estabilización del mismo y unos resultados a medio y largo plazo más prometedores.

Por otro lado, algunos de los modelos de lesión del músculo esquelético utilizan isquemia, miotóxicos o lesiones inducidas por aplastamiento. Estos modelos no eliminan la lámina basal, lo que permite el reclutamiento de CT en el lugar de la lesión por el quimiotactismo evidente de la lámina basal, permitiendo una recuperación *ad integrum* en un corto plazo de tiempo (Chargé y Rudnicki, 2004; Järvinen *et al*, 2007). Por el contrario, en lesiones con VML al perderse la lámina basal, se elimina el andamiaje biológico preciso para que las células satélites guíen la reconstrucción muscular.

Corona *et al* en 2017 fragmentaron músculo esquelético que fue implantado en una VML, para intentar demostrar que las células derivadas de injerto fragmentado contribuían de manera directa en el proceso regenerativo muscular. La regeneración del tejido muscular promovida por injertos fragmentados no mejoró la fuerza muscular del músculo con VML, pero sí demostraron la contribución directa de las CT miogénicas derivadas de injertos musculares, en la recuperación de las fibras musculares en la VML y suponen una utilidad más de las terapias con CT miogénicas autólogas para esta indicación. Una limitación importante de este enfoque es la disponibilidad de fuentes de tejido muscular autólogas y la morbilidad del sitio donante, asociada con la obtención del volumen de tejido requerido para una reparación VML del 100% de defectos musculares relativamente grandes, como los músculos del cuádriceps (Goldman *et al*, 2018).

Hasta la fecha, los *scaffolds* acelulares empleados mejoran los datos de recuperación funcional y de la fuerza muscular, sin generar más fibras musculares que otros modelos (Aurora *et al*, 2015b). Desde el punto de vista de la ingeniería tisular, la combinación de biomateriales y células para dirigir el crecimiento del tejido y permitir una adecuada respuesta regenerativa ante la pérdida volumétrica muscular es la estrategia más empleada pero con resultados desiguales (Cittadella Vigodarzere y Mantero, 2014; Liu *et al*, 2018). Éste es el objetivo prioritario y el hilo

conductor de los grupos de investigación que emplean biomateriales en modelos regenerativos musculares. En consecuencia, es preciso analizar comparativamente la utilización de diferentes biomateriales, no ensayados hasta el momento, a partir de la respuesta regenerativa intrínseca del músculo esquelético para conseguir la reconstrucción controlada y eficaz del defecto volumétrico. Se trata, en definitiva, de buscar nuevas posibilidades terapéuticas en el campo de la medicina regenerativa del músculo esquelético que permitan la traslacionalidad clínica.

Una adecuada estrategia para la reparación de VML es la administración conjunta de biomateriales mioconductores de manera concomitante al músculo fragmentado (Ward *et al*, 2015; Kasukonis *et al*, 2016; Goldman y Corona, 2017). Es decir, un material de andamiaje que proporciona un aumento en volumen, y que permite una regeneración muscular funcional mediada por el injerto muscular fragmentado, que es autólogo, y evita el rechazo (Garg, *et al*, 2014). Es conocida como se modula la respuesta regenerativa muscular, sin embargo, un proceso inflamatorio desmesurado no es un microambiente tisular muy recomendable para una regeneración muscular eficaz y eficiente (Järvinen *et al*, 2014; Corona *et al*, 2016; Greising *et al*, 2017). En base a esta premisa, no es descabellado imaginar que hay determinados biomateriales que ofrecen señales celulares y moleculares que condicionen ese ambiente y que de manera mioinductiva y mioconductora se integren conjuntamente con el músculo esquelético fragmentado, aprovechando tanto la respuesta miogénica procedente de los bordes de la lesión, como la potencialidad de los progenitores musculares del músculo fragmentado (Huard *et al*, 2016; Mahdy, 2019). La laminina-111 es un componente presente en el desarrollo embrionario del músculo esquelético que facilita la migración y proliferación de células satélite (Silva-Barbosa *et al*, 2008; Zou *et al*, 2014). Diversos estudios han evaluado hidrogeles sintéticos, existiendo evidencias sólidas en las que el empleo de ácido hialurónico y laminina-111 aportan un adecuado soporte mioconductor. El ácido hialurónico es antiadhesivo y antiinflamatorio (Shu

et al, 2004; Petrey y De la Motte, 2014) y parece proteger el músculo fragmentado de la respuesta inflamatoria tras la VML. Así mismo, el ácido hialurónico es difícil de eliminar del lugar de implantación al ser muy estable por reaccionar biológicamente mal con otras moléculas (Shu *et al*, 2004; Silva García *et al*, 2019). En base a estos supuestos, se han obtenido buenos resultados funcionales a nivel neuromuscular cuando el volumen muscular fragmentado es menor al perdido. Es probable que se necesite potenciar la inclusión de células satélite para interactuar con las respuestas inmunitarias apropiadas para lograr la regeneración de la fibra muscular de *novo* (Tidball, 2004; Goldman *et al*, 2018).

Es preciso indicar que el empleo de biomateriales para la generación de constructos o como elementos acelulares mioinductivos y/o mioconductores ha supuesto un gran avance en la ingeniería tisular del músculo esquelético por su flexibilidad para adaptarse a la VML y para la integración celular añadida (con modificaciones teniendo en cuenta la estirpe celular -Dunn *et al*, 2019-), facilidad de construcción evitando que el material empleado produzca una excesiva respuesta inflamatoria o reacción de cuerpo extraño (Yang *et al*, 2014). Hay evidencia suficiente que sostiene que los biomateriales descelularizados (matriz extracelular) mejoran significativamente los resultados funcionales en los defectos de VML. Sin embargo, no parecen lograr una alineación completa entre el tejido muscular sano y el regenerado, probablemente debido al volumen del defecto muscular. Mientras que los *scaffolds* naturales suelen ser más bioactivos que los materiales sintéticos no modificados, los *scaffolds* que se forman a través de la polimerización de proteínas al azar no generan un alineamiento celular uniforme. Se ha demostrado que los modelos experimentales de lesión muscular que dejan intacta la lámina basal, regeneran mucho mejor que los de VML ya que existen factores quimiotácticos en la lámina basal que promueven un mejor reclutamiento celular de aquellos precursores musculares presentes en el proceso regenerativo muscular inducido por la lesión (Grasman *et al*, 2015).

Recientemente, para mejorar la regeneración del músculo esquelético, se han desarrollado esponjas biomiméticas con diferentes componentes: colágeno, gelatina y laminina-111 entrecruzadas con N-(3-dimetilaminopropil)-N9-etilcarbodiimida, EDC) (Haas *et al*, 2019; Marcinczyk *et al*, 2019). Estas esponjas presentan mejoras en el microambiente tisular respecto a las simples constituidas por colágeno (Beier *et al*, 2009). El colágeno y laminina-111 son componentes cruciales de la matriz extracelular del músculo esquelético (impiden la bioactividad), mientras que la gelatina y la EDC se han utilizado para proporcionar resistencia mecánica al *scaffold*. La evaluación morfológica y mecánica de las esponjas mostró una estructura porosa adecuada para la viabilidad de mioblastos C2C12 durante 5 días de cultivo. Los mioblastos produjeron niveles más altos de factores de crecimiento como VEGF, IL-6 e IGF-1 y mostraron una mayor expresión de marcadores miogénicos como *MyoD* y miogenina. Las esponjas biomiméticas se implantaron en un modelo murino con VML, a la que llegan por infiltración células satélites, endoteliales e inflamatorias, ofreciendo una limitada regeneración de miofibras 2 semanas después de la lesión (Haas *et al*, 2019). Por otro lado, Gattazzo *et al* (2018) han empleado *genipin* (una aglicona derivada de un glucósido iridoide - genipósido- presente en la fruta de *Gardenia jasminoides*) con gelatina para la generación de un *scaffold* que reproduce las propiedades mecánicas del músculo esquelético, permitiendo de la superficie de este *scaffold* pueda modelarse topográficamente para impulsar la diferenciación de células miogénicas (línea celular C2C12) con orientación unidireccional tanto *in vitro* como *in vivo* (músculo tibial anterior de ratón).

En definitiva, el empleo de métodos y técnicas de ingeniería tisular que aprovechen la capacidad de los *scaffolds* acelulares para reparar y regenerar el tejido muscular esquelético perdido tras una VML ha de ser considerado como una alternativa importante en la clínica (Porzionato *et al*, 2015; Liu *et al*, 2018). Incluso ante la existencia de fibrosis, ésta puede ser

orientada de una manera funcional (Corona *et al*, 2013) al mejorar los resultados de producción de fuerza (Sicari *et al*, 2014).

Factores de crecimiento (FC) en ingeniería tisular del músculo esquelético

Las estrategias empleadas para la reconstrucción de músculo esquelético a partir de técnicas de ingeniería tisular han requerido de forma genérica la utilización de células troncales y andamiajes con biomateriales, especialmente *in vitro* (Passipieri y Christ, 2016). Sin embargo, dada la importancia de establecer situaciones reales *in vivo* que permitan la traslacionalidad de los modelos experimentales a la clínica, han de identificarse señales moleculares y químicas en el ambiente tisular de la regeneración muscular que promuevan la adecuada diferenciación miogénica, inmunomodulación así como el desarrollo fenotípico para la obtención de músculo no sólo a nivel histológico, sino también funcional (Sakar *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2015).

En base a esto, conocer los factores reguladores y de crecimiento implicados en la miogénesis es básico para tener claro qué aspectos del crecimiento muscular *in vitro* pueden modificarse para condicionar el tejido muscular resultante. Sin embargo, el análisis profundo de algunos detalles que modulan de manera significativa el crecimiento muscular *in vitro* como medios de cultivo, antibioterapia o concentración de glucosa (Allen *et al*, 1997; Khodabukus y Baar, 2015) no es determinante para las estrategias actuales en SMTE. Son varios los FC implicados en el efecto de diferenciación miogénica de las células en cultivo o en el ambiente tisular. FGF, PDGF y HGF promueven la activación y proliferación de las CS (Allen *et al*, 1995; Husmann *et al*, 1996; Kuang *et al*, 2008). Por el contrario, la presencia de TGF- β típicamente tiene una influencia negativa *in vitro*, suprimiendo ligeramente la proliferación e inhibiendo drásticamente la diferenciación a músculo (Allen y Boxhorn, 1989; Husmann *et al*, 1996; Maley *et al*, 1995). Sin embargo, a nivel funcional de TGF- β , que puede mejorar la contractilidad del músculo diseñado mediante la promoción de la síntesis de colágeno tipo I en la matriz extracelular, apoyando el desarrollo de miofibras y la transmisión de fuerza (Weist *et al*, 2013), así como la regulación negativa de la

miogénesis por la inducción de células satélite quiescentes (Li *et al*, 2009; Rathbone *et al*, 2011).

Respecto a VEGF, está demostrada su actividad en la activación y proliferación de las células satélites y en la migración y supervivencia de los mioblastos (Arsic *et al*, 2004; Montarras *et al*, 2013). Por su actividad angiogénica, fomenta la migración, proliferación endotelial (Ferrara, 2002; Huey, 2018) y tiene propiedades neuroprotectoras que influyen positivamente en la reinervación tisular tras la lesión muscular (Llado *et al*, 2013; Shvartsman *et al*, 2014). Por último, NGF que regula la diferenciación, supervivencia y mantenimiento neuronal (Micera *et al*, 2007), potencia la fusión de mioblastos, permite la reinervación y angiogénesis del nuevo músculo formado (Chevrel *et al*, 2006; Deponti *et al*, 2009; Karatzas *et al*, 2013).

Histología de los músculos generados por ingeniería tisular en VML

El desarrollo de músculos por ingeniería tisular obedece a la necesidad de reconstruir importantes pérdidas de masa muscular que son imposibles de repararse por la propia capacidad regenerativa del músculo esquelético. Las diferentes técnicas de ingeniería tisular que se emplean en músculo esquelético tienen como fundamento el proceso regenerativo (Juhas y Bursac, 2013). De hecho, se ha adoptado un modelo en el que lo que se trasplanta o se inserta en el defecto volumétrico son los componentes aislados de los elementos básicos de la regeneración (Corona *et al*, 2013b), en combinación entre ellos o con *scaffolds* artificiales (Sicari *et al*, 2013).

El objetivo fundamental del empleo de la ingeniería tisular en el campo de la medicina regenerativa del músculo esquelético es la creación de un músculo funcional tanto desde el punto de vista anatómico, histológico como mecánico. En este apartado, revisamos brevemente las características histológicas que presenta el tejido muscular neoformado, en mayor o menor medida, en una lesión VML tras el implante

de algunos de estos materiales. Aunque se pueden utilizar otras técnicas (resonancia magnética, técnicas de imagen en tres dimensiones, tomografía computarizada) para valorar los resultados de diferentes procedimientos de ingeniería tisular en músculo esquelético, actualmente la técnica *gold standard* es la histología (Appel *et al*, 2016); es la mejor forma de ver si estos procedimientos terminan con éxito formando músculo esquelético. Sin embargo, aunque la mayoría de los estudios incorporan análisis microscópicos que suelen incluir técnicas, histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas, la información que ofrecen está, en general, superficialmente descrita y con una interpretación limitada, centrándose en la respuesta funcional.

Fibrosis muscular

La lesión VML sin tratamiento evoluciona hacia la fibrosis (Aguilar *et al*, 2018). Por otro lado, tanto en los modelos experimentales como en los estudios llevados a cabo en humanos, la fibrosis es el resultado histológico más habitual en los tratamientos por ingeniería tisular de las lesiones VML (Grogan y Hsu, 2011; Corona 2013a; Corona *et al*, 2016). Se presenta, en mayor o menor grado, dependiendo de los diferentes elementos o materiales implantados en el defecto y, por tanto, se combina también con un mayor o menor grado de neoformación muscular. Por ejemplo, cuando se implantan matrices acelulares o desvitalizadas, la lesión evoluciona hacia la fibrosis, quedando la respuesta regenerativa limitada a los bordes de la lesión (Corona *et al*, 2013a; Garg *et al*, 2014; Aurora *et al*, 2015; Aurora *et al*, 2016), mientras que cuando se implantan constructos enriquecidos con células troncales se favorece la miogénesis e inhibe la fibrosis (Matthias *et al*, 2018; Wang *et al*, 2019). Es de destacar que el músculo restante, preservado o superviviente después de la lesión VML no presentan signos degenerativos (Corona *et al*, 2017a).

Un reciente estudio experimental analiza la influencia de la edad en la efectividad de la reparación regenerativa para el tratamiento de la lesión VML, empleando matrices musculares descelularizadas alogénicas junto con músculo troceado ha demostrado por pérdida muscular volumétrica (VML) (Kim *et al*, 2019). Sus resultados muestran la importancia de considerar la edad, ya que con ésta

aumentó el desarrollo de la fibrosis disminuyendo la capacidad regenerativa en los animales de 18 meses de edad, en comparación con los de 3 meses.

Neoformación muscular

Una cuestión importante es la fuente u origen del nuevo tejido muscular que ocuparía el defecto volumétrico en caso de resolución favorable. Básicamente debemos considerar dos orígenes principales: la primera sería que las nuevas fibras musculares se desarrollarían a partir de precursores miogénicos ubicados en la zona limítrofe del músculo con la lesión, cuando lo que se implanta son *scaffolds* acelulares y, en la segunda, habría que considerar además el papel que desempeñan en la neomiogénesis las células progenitoras incorporadas a los *scaffolds*, cuando lo que se implantan son constructos.

Implante de scaffolds acelulares

En el modelo de *scaffold* celular, la neoformación de fibras musculares se fundamenta en la respuesta de regeneración que se desencadena en el propio músculo a la lesión VML. Como es bien conocido, la capacidad regenerativa recae en la existencia de la población intrínseca de células satélites (Dumont *et al*, 2015) así como de otros tipos celulares potencialidad miogénica (Otto *et al*, 2012; Sicari *et al*, 2013). Por tanto, uno de los objetivos que se persiguen en ingeniería tisular es implantar en las lesiones VML *scaffolds* mioinductores, capaces de estimular la migración de células miogénicas desde territorios preservados hacia la zona del implante para formar fibras musculares. El crecimiento centrípeto de las nuevas fibras musculares hacia los *scaffolds* se observa en la mayoría de los ensayos, aunque existen diferencias en la cantidad de músculo generado (Zhao *et al*, 2013)

Puesto que la matriz extracelular juega un papel determinante en los procesos regenerativos, especialmente en el músculo esquelético, se han desarrollado técnicas de ingeniería tisular basadas en *scaffolds* biomiméticos. Una de las estrategias plantea

utilizar matrices descelularizadas de músculo esquelético ya que el mantenimiento, tras la descelularización, de la estructura tridimensional de la matriz extracelular, favorecería la recolonización desde el músculo preservado al crecer y penetrar las fibras musculares, vasos y fibras nerviosas por las láminas basales preexistentes. En un interesante estudio Pozzionato *et al* (2015), emplean músculo esquelético humano descelularizado para obtener *scaffolds* biológicos que implantaron en un defecto de la pared abdominal en conejos. Sin embargo, el estudio histológico mostró que la mayoría del *scaffold* implantado fue sustituido por fibrosis y una moderada reacción inflamatoria, limitándose la presencia de fibras musculares regenerativas a la periferia del implante, sugiriendo una migración y crecimiento miogénico limitado desde la zona periférica del músculo.

Otro planteamiento se basa en la capacidad mioinductora de la matriz extracelular. Merrit *et al* (2010), en músculo gastrocnemio indujeron una VML e implantaron una matriz descelularizada de vejiga urinaria. Cuarenta y dos días después, fue evidente el crecimiento de vasos sanguíneos (VW+) y miofibras desmina+ en el *scaffold*, pero no se produjo la restauración de la VML. Perniconi *et al* (2011) trasplantaron en ratones *wt* diferentes tipos de *scaffold* de músculos tibial anterior y EDI descelularizados, demostrando que son estables durante varias semanas (músculo TA y EDL descelularizado) mientras que son colonizados por células inflamatorias y troncales.

En un estudio en humanos se ha observado que hay mejoras funcionales, pero el análisis de biopsias tomadas mediante ultrasonografía guiada muestra que las fibras neoformadas forman pequeñas islas discontinuas inmersas en el tejido conectivo circundante (Sicari *et al*, 2014b). En otro estudio constituido por 13 pacientes a los que se les realizaron biopsias musculares ecoguiadas de los lugares de implantación, en diferentes tiempos de evolución (6-8, 10-12 y 24-28 semanas), Dizki *et al* (2016) comprobaron la presencia, en combinación con la respuesta inflamatoria, de nuevo tejido muscular cuya cantidad aumentaba en relación con el tiempo de biopsia. Las nuevas fibras musculares eran desmina+ y se localizaban próximas al borde del músculo sano y, aunque separadas, también en centro de lugar de implantación del

scaffold, lo que indica más en una neoformación que en la penetración e integración de fibras musculares desde la región sana del músculo huésped junto con células perivasculares CD146+ que migraban desde los vasos. El estudio histológico también reveló a los 6 meses, células+ para tubulina β -III, implicadas en la inervación de las nuevas fibras musculares.

Implante de scaffolds celulares

La formación de músculo se ve favorecida cuando la matriz desvitalizada se combina con células troncales. Kesireddy (2016), quien implanta en la lesión VML un *constructo* de vejiga urinaria de cerdo con células ADSC, encuentra signos de formación de nuevo tejido que incluye fusión de mioblastos, formación de miotubos, remodelación del *scaffold*, así como elementos vasculares que garantizarían la supervivencia e integración del nuevo músculo. En este caso, la tinción inmunohistoquímica positiva para el factor de von Willebrand en las estructuras vasculares sugiere un papel regulador de la vascularización por parte de las ADSC.

A diferencia de lo que ocurre *in vitro*, la capacidad promiogénica de las células ADSC se mantiene cuando se implantan en combinación con haces de microfibras de fibrina en un modelo de VML murino (Gilbert-Honick *et al*, 2019). Estos autores observan una fibrosis mínima y un mayor número de células positivas para miosina embrionaria en las microfibras de fibrina combinadas con ADSC en comparación con las acelulares a 1 y 3 meses después del trasplante. También un constructo de células troncales derivadas de músculo en combinación con *scaffold* de colágeno tipo I aplicado sobre una pérdida volumétrica (5 mm) en el músculo cuádriceps de ratones C57BL/6J da lugar a la formación de nuevas fibras musculares y una escasa fibrosis (Wang *et al*. 2019). En concreto observan nuevas fibras formadas positivas para miosina, alineadas con las fibras musculares nativas, como muestra la tinción frente a laminina. Además, la tinción verde fluorescente fue escasa en las fibras neoformadas lo que indica que la mayor parte de la miogénesis procede de los precursores musculares del huésped.

El *scaffold* compuesto de colágeno asociado con mioblastos puede crear un injerto muscular 3D in vitro que puede emplearse para reparar el tejido muscular defectuoso in vivo Ma *et al* (2011). El estudio histológico demuestra la presencia de una mayor cantidad de fibras musculares regenerativas inervadas y vascularizadas (presencia de fibras distrofina, miosina de cadena pesada y CD31 positivas).

Matthias *et al* (2018), demostraron que las MDSC pueden trasplantarse y formar nuevas miofibras en VML cuando se funden con gel de fibrina, y aumentar significativamente la masa muscular (fibras positivas para laminina, *Pax7*, *Myf5*, miogenina y miosina de cadena pesada). Esto también fue acompañado por una reducción significativa del tejido fibrótico en los músculos donde se implantó el biomaterial. Además, las células trasplantadas también contribuyeron a la formación de nuevos vasos y de células satélite. Estos resultados confirman el potencial terapéutico de las MDSC y la viabilidad de la fusión directa *in situ* del constructo MDSC y fibrina para reparar VML.

La gelatina, reticulada con genipina, permite crear un hidrogel que reproduce las propiedades mecánicas características del músculo esquelético, no perjudica el proceso regenerativo y estimula la diferenciación de las células miogénicas y la orientación unidireccional (Gattazzo *et al*, 2018). El ácido hialurónico, el alginato y la queratina, también han sido ensayados en modelos de VML, sin embargo, han mostrado una pobre aportación a la generación de un nuevo músculo. Su utilidad terapéutica futura radica en que estos materiales son moldeables y pueden ajustarse a volúmenes concretos, permitiendo adaptarse a las variadas formas de los VML. Sin embargo, están limitados por la variabilidad en la composición química, y que algunos componentes pueden plantear problemas con la inmunogenicidad (Qazi *et al*, 2015).

Trasplante autólogo de músculo troceado

Aunque la respuesta fibrótica se mantiene (Li *et al*, 2013), los mejores resultados en cuanto a la generación de músculo en lesiones VML han sido obtenidos

cuando se emplea el trasplante de músculo troceado autólogo (Corona *et al*, 2013b; Ward *et al*, 2015; Ward *et al*, 2016; Corona *et al*, 2017; Corona *et al*, 2017a). A las dos semanas ya hay evidencia de formación de nuevas fibras musculares dentro del área del defecto, lo que se manifiesta por la presencia de fibras miosina+ además de macrófagos CD68+ y formación de nuevos vasos vWF+; a la octava semana la regeneración seguía activa y 16 semanas después, las fibras mostraban núcleos centrales llegando a alcanzar un tamaño normal, aunque no quedaron orientadas correctamente (Corona *et al*, 2013b).

Diferentes estudios experimentales han combinado el empleo de diferentes biomateriales con músculo troceado obteniendo resultados dispares. Cuando se combina músculo autólogo troceado con un hidrogel de colágena, las fibras musculares neoformadas son más pequeñas y aparecen en menor número que cuando no se emplea el hidrogel (Ward *et al*, 2015). La combinación de músculo troceado autólogo con matriz acelular de vejiga urinaria, a pesar de la mejora funcional, no se acompaña de una mayor evidencia histológica de neoformación muscular, observándose abundante tejido fibrótico que envuelve a grupos aislados de fibras regenerativas (Goldman y Corona, 2017).

Kasukonis *et al* (2016) han encontrado que la combinación de matriz muscular descelularizada y músculo troceado en el tratamiento de la lesión VML, da lugar a una reducción en la formación de colágena y un incremento significativo en la expresión de MyoD en comparación con la sola utilización de matriz descelularizada. Es interesante señalar que, Boennelycke *et al* (2011) mostraron que fragmentos de músculo autólogo sobre un *scaffold* biodegradable implantado en tejido subcutáneo abdominal de rata formó, a las 8 semanas, músculo como reveló la tinción para desmina. Sin embargo, el mismo *scaffold* combinado con células autólogas derivadas de músculo y cultivadas *in vitro*, se desintegró sin generar fibras musculares. La terapia que combina músculo troceado con un hidrogel de laminina-111 suplementado con ácido hialurónico, si bien produce una mejora funcional esta no está acompañada de una importante respuesta regenerativa en el área del defecto; pero en la zona de músculo preservado si ocurre

un incremento en la población de células satélites y de fibras musculares regenerativas, lo que explicaría la mejora funcional (Goldman *et al*, 2018).

También se ha combinado el tratamiento de la lesión VML con músculo troceado autólogo de forma combinada a la liberación de células mononucleadas de la médula ósea marcadas con proteína verde fluorescente (GFP+); sin embargo, los resultados muestran, desde el punto de vista histológico, una contribución limitada en la neoformación de fibras musculares (Goldman *et al*, 2017a).

Material y métodos

Animales y diseño del estudio

Primer experimento

Animales y grupos

Procedimientos experimentales

Segundo experimento

Animales y grupos

Procedimientos experimentales

Evaluación ecográfica del músculo esquelético

Estudio histológico

Procesamiento de las muestras histológicas

Técnicas

Histológicas

Histoquímicas

Inmunohistoquímicas

Análisis histomorfométrico

Análisis estadístico

Animales y diseño del estudio

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de 100 ratas Wistar macho de 350 ± 50 g de peso. Los animales fueron mantenidos en el animalario de la Facultad de Medicina y Enfermería (perteneciente al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba) en jaulas individuales, sometidos a ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y alimentados con pienso y agua *ad libitum*, con una temperatura ambiente constante de 22°C.

El uso de estos animales y los protocolos experimentales se llevaron a cabo siguiendo la legislación vigente en materia de experimentación animal a nivel nacional y europeo, obteniendo las resoluciones positivas por parte del Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba con fecha 21 de febrero de 2017 (número 2017IP/05) y la Delegación General de Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía con fecha 15 de septiembre de 2017 (Ref. SSA/SIS/MD/jv número de Proyecto: 07/09/2017/121).

Todos los procedimientos quirúrgicos del primer y segundo experimento fueron realizados bajo condiciones asépticas (depilación y desinfección cutánea con clorhexidina, previa a la cirugía). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (*Imalgene*® 100mg/ml, Merial Laboratorios. Boehringer Ingelheim. España) y medetomidina (*DOMTOR*® 1mg/ml. Esteve. España) a una dosis de 7,5 mg ketamina - 0,05 mg medetomidina /100 g peso vía intraperitoneal.

En los dos experimentos, los lechos quirúrgicos de ambos miembros posteriores se limpiaron, desinfectaron y suturaron finalmente con agrafes metálicos, y a cada rata se le administró por vía oral 20 mg/kg de ceftriaxona posquirúrgica que fue disuelta en su agua.

Los animales fueron distribuidos de la siguiente manera: un total de 64 animales se emplearon en el primer experimento, y 36 en el segundo experimento.

Primer experimento

Animales y grupos

Los animales (n=64) se clasificaron en cuatro grupos: (i) grupo control normal compuesto por ratas normales (n=4) que no se sometieron a ninguna intervención (GC); (ii) grupo control regenerativo compuesto por ratas (n=20) a las que se les inyectó una miotoxina en el músculo tibial anterior y se usó como control del proceso regenerativo normal (GCR) (Biérink y Sebille, 2008); (iii) grupo compuesto por ratas (n=20) a las que se les trasplantó en un defecto de VML inducido en su músculo tibial anterior, tejido adiposo autólogo (GTAA); y (iv) grupo compuesto por ratas (n=20) a las que se les trasplantó en un defecto de VML inducido en su músculo tibial anterior, tejido adiposo congelado (GTAC) y se utilizó como grupo de comparación para el grupo anterior; en este caso el tejido adiposo autólogo fue sometido a congelación y descongelación previa al trasplante para lograr la destrucción total de las células (Shier, 1988). Este procedimiento consistió en 3 ciclos repetitivos de inmersión directa en nitrógeno líquido (-196°C), en un tiempo de aproximadamente tres minutos.

Procedimientos experimentales

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia y en condiciones asépticas. Para inducir la degeneración-regeneración del tejido muscular en el grupo GCR, se inyectaron 100 µl de clorhidrato de mepivacaina al 2% (Scandinibsa; Inibsa, Barcelona, España) en el área central del músculo tibial anterior a través de una aguja fina (agua subcutánea de 25G) (Fig. 1). Para inducir el defecto VML en los grupos GTAA y GTAC, se expusieron los músculos tibial anterior y se usó un *punch* estéril (6 mm de diámetro y 5 mm de longitud) para realizar una biopsia, obteniendo un fragmento cilíndrico de tejido de la parte central del vientre del músculo TA izquierdo (Fig. 2). El tejido adiposo subcutáneo obtenido de la región ínguinoabdominal de la misma rata se implantó en el defecto muscular. La cantidad extraída del tejido adiposo autólogo fue similar al fragmento muscular (aproximadamente 0,07 g).

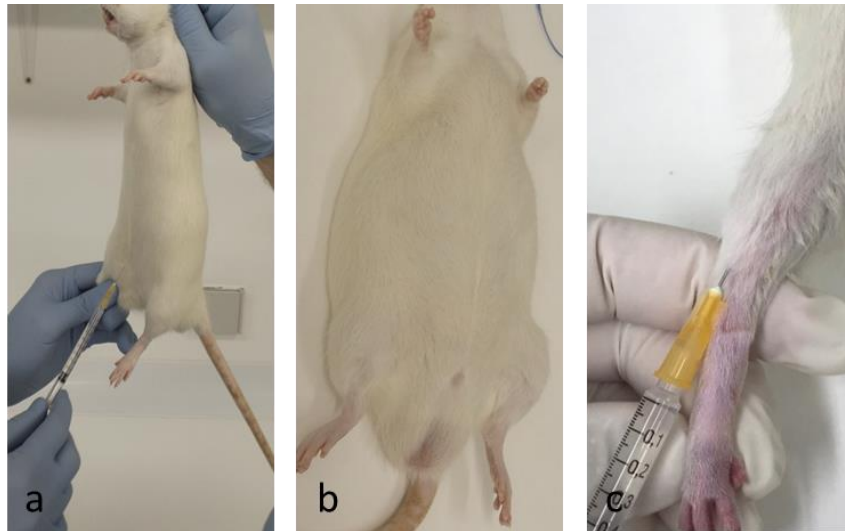


Fig. 1. Grupo GCR. Procedimiento para inducir la degeneración-regeneración en el músculo tibial anterior. (a) Anestesia del animal. (b) Animal anestesiado en decúbito supino. (c) Inyección intramuscular del miotóxico.

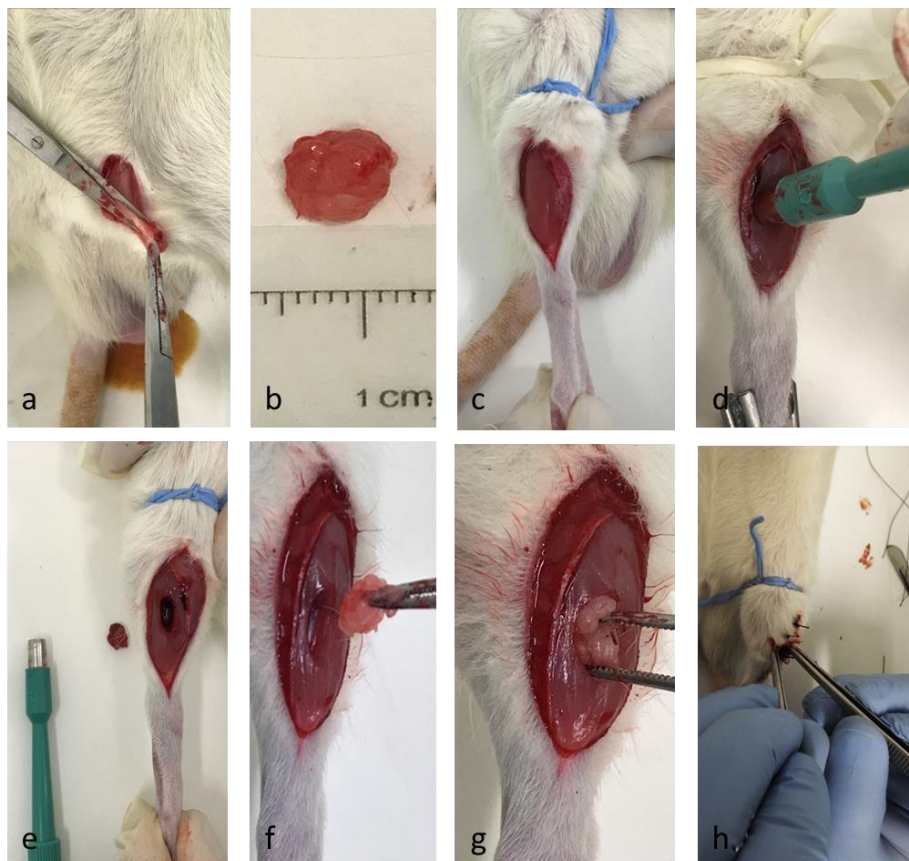


Fig. 2. Grupo GTAA. Procedimiento seguido para la reconstrucción de un área de VML inducida en el músculo tibial anterior usando un trasplante de tejido adiposo autólogo. (a) Extracción del tejido adiposo de la región inguinal. (b) Fragmento de tejido adiposo. (c) Exposición de la cara anterior del músculo tibial anterior. (d) Extracción mediante *punch* del fragmento muscular en el tercio medio del músculo e) Defecto VML causado en el tercio medio del músculo. (f) Introducción del tejido adiposo. (g) Tejido adiposo trasplantado en el defecto VML. (h) Cierre por sutura de la zona quirúrgica.

Los animales se sacrificaron posteriormente a los 7, 14, 21, 28 y 60 días después de la inyección (grupo de regeneración normal) y después del trasplante (tejido adiposo y tejido adiposo congelado). Los músculos tibial anterior se extrajeron y procesaron para realizar análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos.

Segundo experimento

Animales y grupos

Para este experimento se emplearon 36 ratas. Los animales se clasificaron los siguientes grupos (Fig. 2):

- Grupo control **(GC)** compuesto por ratas normales (n=4) que no se sometieron a ninguna intervención y que fueron los mismos que los empleados en el primer experimento.
- Grupo control regenerativo **(GCR)** utilizado como modelo control regenerativo normal, siguiendo el mismo procedimiento que el explicado en el primer experimento y compuesto por ratas (n=8) procedentes del primer experimento.
- Grupo de trasplante de tejido adiposo autólogo **(GTAA)** a las que se les trasplantó tejido adiposo autólogo en un defecto de VML inducido en los músculos tibial anterior, siguiendo el mismo procedimiento que el explicado en el primer experimento y compuesto por ratas (n=8) procedentes del primer experimento.
- Grupo control negativo **(GCN)** constituido por ratas (n=8) con el objetivo de crear el defecto VML sin implante. En el defecto se insertó una esponja hemostática reabsorbible de celulosa oxidada (GELITA-SPON standard®, GELITA-Medical®, Eberbach, Alemania).
- Grupo de implante con matriz descelularizada heteróloga de músculo esquelético **(GIMD)** constituido por ratas (n=8) a las que se les implantó matriz descelularizada heteróloga en un defecto de VML inducido en los músculos tibial anterior.

- Grupo de implante con Osteovit® (**GIOS**) constituido por ratas (n=8) a las que se les implantó Osteovit® en un defecto de VML inducido en los músculos tibial anterior.
- Grupo de implante con fibrina-agarosa (**GIFA**) formado de ratas (n=8) a las que se les implantó un hidrogel de fibrina-agarosa en un defecto de VML inducido en los músculos tibial anterior.

Procedimientos experimentales

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron también bajo anestesia y en condiciones asépticas.

La lesión de VML se generó de la misma manera que en el primer experimento. Tanto para el grupo GCR (Fig. 1) cómo para el grupo GTAA (Fig. 2) se siguieron los mismos procedimientos descritos para el primer experimento. En el grupo GCN se insertó en la VML un fragmento de 10x5x1 mm esponja hemostática enrollada por su lado más corto (Fig. 3).

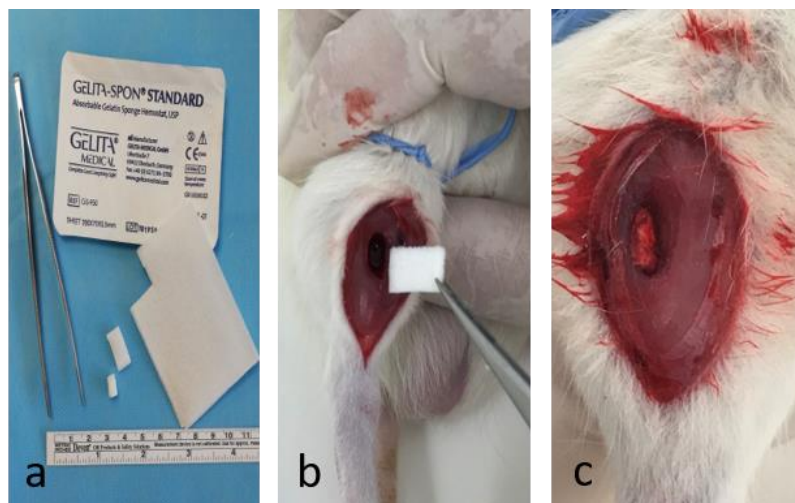


Fig. 3. Grupo GCN. (a) Esponja hemostática GELITA-SPON standard®. (b) Introducción de la esponja hemostática. (c) VML con esponja hemostática.

En el grupo GIOS para la implantación se tomó un cilindro de Osteovit® similar al tamaño del fragmento muscular extraído en la VML (Fig. 4). Se trata de una matriz

porosa biológica -biomaterial- estéril de colágeno de origen óseo bovino, de la que se han eliminado los antígenos, materias grasas, minerales, enzimas y constituyentes no colagénicos tras un proceso físico-químico y que ha sido empleado con éxito en cirugía ortopédica y cirugía maxilofacial para la regeneración de defectos óseos (Pradel y Lauer, 2012), por lo que dada su estructura porosa, y su biocompatibilidad puede ser útil en nuestro modelo experimental.

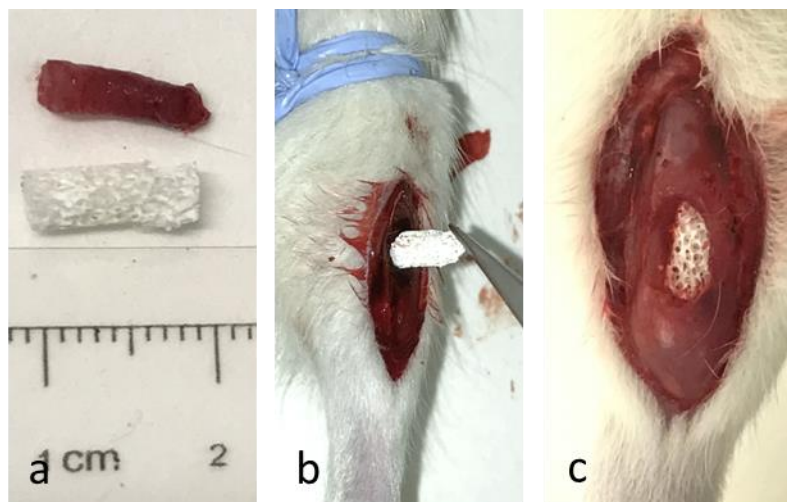


Fig. 4. Grupo GIOS. (a) Fragmento muscular extraído y fragmento de Osteovit®. (b) Introducción del fragmento de Osteovit®. (c) VML con implante de fragmento de Osteovit®.

Para llevar a cabo el grupo GIMD, hubo previamente que proceder a la obtención de matrices heterólogas descelularizadas. Para ello se emplearon 4 ratas Wistar macho a las que, previa anestesia general, se les extrajo los músculos sóleo de ambos miembros posteriores. A continuación, los animales fueron sacrificados en campana de CO₂, siguiendo el procedimiento establecido en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba. Los músculos extraídos fueron sometidos a un proceso de descelularización validado (Gilbert *et al*, 2006; Gilbert, 2012; Urciuolo y De Coppi, 2018; Guruswamy Damodaran y Vermette, 2018) teniendo en cuenta un protocolo experimental previo patentado (Cryolife, Inc. 1655 Robert Boulevard, N.W. Kennesaw, Georgia 30144, US, 1998) adaptado a nuestro modelo y en

el que nuestro grupo tiene experiencia previa (Jimena *et al*, 2009). Esta matriz fue insertada en la VML creada en el músculo tibial anterior (Fig. 5).

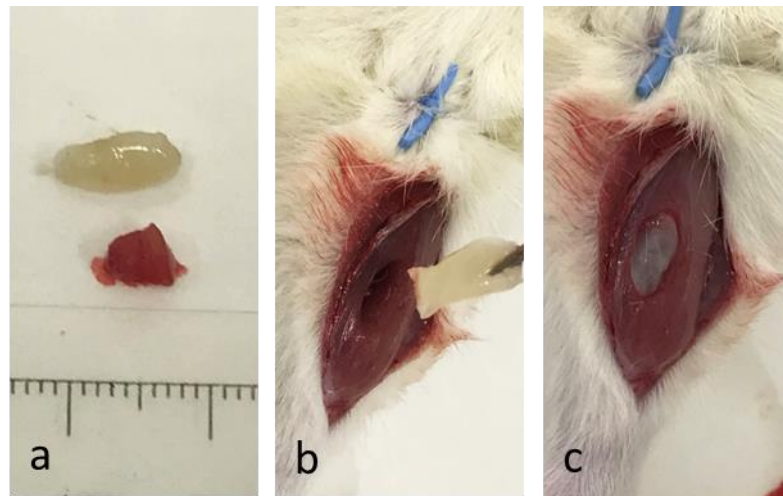


Fig. 5. Grupo GIMD. (a) Fragmento muscular extraído y matriz descellularizada. (b) Introducción de la matriz. (c) VML con implante de matriz descellularizada.

Los geles de fibrina-agarosa han sido empleados con éxito para la recuperación de defectos tisulares en piel, cirugía escleral y nervio periférico (Garzón *et al*, 2013; Carriel *et al*, 2019; Chato-Astrain *et al*, 2018). Para su utilización en esta tesis doctoral se adaptó un protocolo acelular respecto al patentado por la Universidad de Granada (ver anexo), de la cual se ha obtenido la pertinente autorización. Asimismo, dada la utilización de plasma fresco congelado (PFC) para la gelificación del *scaffold* (PFC, 3 unidades de 200 ml cada una de ellas, con número de albarán de distribución 0001000196366 procedente del Banco de Tejidos de Córdoba) se ha obtenido del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía el Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación con fecha 19 de marzo de 2018 y código de solicitud 32180004, del Comité de Ética de la Investigación de Córdoba a fecha del 7 de marzo de 2018 con Acta nº 274, ref. 3762 de la reunión celebrada el 26 de febrero de 2018 y código de protocolo: REGMUS_2018 Protocolo 1 de 11/01/2018 las autorizaciones correspondientes para la utilización con fines investigadores de muestras biológicas.

Tras la obtención de los geles, éstos fueron almacenados durante menos de 24 h en espera de su implantación a 4°C. Previamente a ésta, se nanoestructuró el gel de

fibrina-agarosa (Brown *et al*, 2005) y fueron implantados en la VML creada mediante *punch* en el músculo TA (Fig. 6).

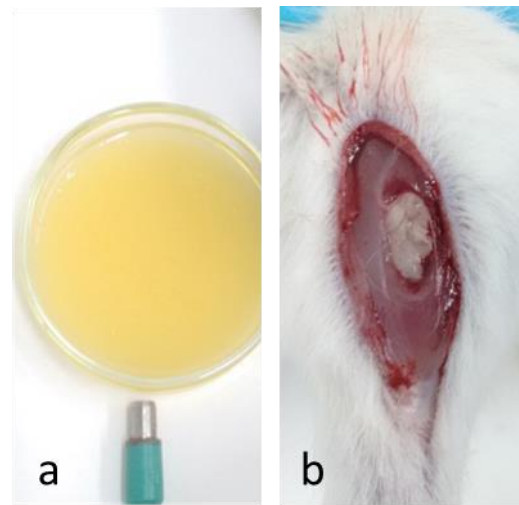


Fig. 6. Grupo GIFA. (a) Gel de fibrina-agarosa. (b) Introducción de la fibrina agarosa una vez nanoestructurada. (c) VML con implante de fibrina-agarosa.

Los animales se sacrificaron posteriormente a los 21, 28 y 60 días después de la inyección (grupo de regeneración normal) y después de la implantación (tejido adiposo, tejido adiposo congelado, matriz descelularizada, Osteovit®, gel de fibrina-agarosa y GELITA-SPON standard®). Los músculos tibial anterior se extrajeron y procesaron para realizar análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos.

Evaluación ecográfica del músculo esquelético

Bajo anestesia general (siguiendo el mismo procedimiento anestésico previo autorizado), las ratas fueron exploradas mediante ecografía muscular a los 60 días postimplantación (Fig. 7). Tras la anestesia, los animales fueron colocados en posición de decúbito prono, se afeitó la zona de exploración ecográfica y finalmente se administró antiséptico local (clorhexidina) previa a la ecografía (Jiménez-Díaz *et al*, 2012).

Se empleó un ecógrafo portátil General Electrics LOGIQ e BT12, con una sonda plana de alta frecuencia (8-18 MHz). Se evaluó la región anterior del miembro

posterior del animal, de manera bilateral, obteniéndose imágenes en los planos transversal y longitudinal en modo B y con Doppler de potencia (power Doppler) ajustando el foco al área de interés. En modo B, la región mencionada fue explorada analizando los siguientes parámetros: frecuencia de imagen armónica (THI) de 16 MHz, ganancia 32, mejora 3, promedio 2 y rango dinámico 96 dB. Posteriormente, la misma región, se evaluó mediante Doppler de potencia con los parámetros: frecuencia de 10 MHz, ganancia de 12, frecuencia de repetición de pulso 0.8 kHz y filtro de pared de 89Hz. El análisis ecográfico se realizó de forma cegada por un radiólogo especialista, subespecializado en musculoesquelético con 10 años de experiencia (ABY).



Fig. 7. Realización del análisis ecográfico con el animal anestesiado e inmovilizado.

Estudio histológico

Procesamiento de las muestras histológicas

El procesado histológico se realizó de acuerdo a las recomendaciones establecidas para este tipo de muestras, siguiendo protocolos en los que nuestro laboratorio tiene experiencia (Leiva-Cepas *et al*, 2018). La parte central del vientre muscular donde se realizó el implante fue montado sobre OCT compound®, congelado en isopentano (para producir un descenso gradual de la temperatura evitando la lisis celular por microcristales), previamente enfriado en nitrógeno líquido

En un criostato (Leica CM1850 UV, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) se obtuvieron secciones seriadas de 8 μm de grosor (Fig. 8) que fueron almacenadas hasta su posterior tinción con técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas a -20°C .



Fig. 8. (a) Criostato para la obtención de cortes en frío. (b) Bloque de congelación con las superficies de corte de los músculos tibial anterior en los que se aprecian zonas más pálidas (flechas) correspondientes a los materiales implantados.

Técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas

Las diferentes técnicas utilizadas se realizaron siguiendo los protocolos habituales para el estudio del tejido muscular esquelético (Sarnat, 1983; Cumming *et al*, 1994; Hofecker *et al*, 2007; Dubowitz *et al*, 2013)

• Técnicas histológicas:

Hematoxilina-eosina (H&E): utilizada para el análisis morfológico general, permite valorar fundamentalmente las formas y dimensiones de las fibras musculares, localización de mionúcleos, junto con la presencia de fibras basófilas, necróticas, atróficas, etc. También permite identificar con claridad la respuesta de las células inflamatorias en relación con las fibras musculares, vasos sanguíneos. Los nervios también se identifican fácilmente.

Tricrómico de Gomori modificado (TGm): esta técnica define de forma clara aquellas zonas donde prolifera el tejido conectivo, así como los cambios de la fibra muscular en relación a su arquitectura celular, trastornos sarcotubulares, inclusiones intrasarcoplasmáticas y agrupaciones mitocondriales. Los nervios son claramente reconocibles al teñirse las fibras mielínicas de rojo.

Tricrómico de Masson: esta técnica permite la identificación del tejido conectivo en general y principalmente el colágeno tipo I por su color azul.

Técnica de Verhoeff-van Gieson: facilita el reconocimiento del tejido conectivo al teñirlo de color rojo (colágena) que contrasta con el color amarillo de las fibras musculares y el azul oscuro de los núcleos. Las fibras de reticulina se pueden identificar por su color negro.

- *Técnicas histoquímicas enzimáticas y no enzimáticas:*

Nicotinamida dinucleótido tetrazolio reductasa (NADH-tr): se trata de una técnica muy útil en histología y patología neuromuscular. Con ella podemos marcar el patrón intermiofibrilar de la fibra muscular esquelética gracias al marcaje de la enzima oxidativa nicotinamida dinucleótido deshidrogenasa tetrazolio reductasa. Además de permitir el reconocimiento de tipos de fibras, identifica el sistema sarcotubular así como los acúmulos de mitocondrias. Ayuda a reconocer cambios citoarquitecturales no identificados con las técnicas histológicas (fibras *core*, apolilladas *moth-eaten*, fibras en anillo, fibras en cola de serpiente *snake coil*, etc.).

Adenosín-trifosfatasa miofibrilar (ATPasa): es la reacción más importante para el reconocimiento de los tipos básico y subtipos de fibras musculares, junto la inmunohistoquímica para las miosinas. La reacción puede realizarse a diferentes pre-incubaciones de pH (9.4, 4.6 y 4.2). Permite también el reconocimiento de la red vascular.

Fosfatasa ácida: la identificación de esta enzima (por su color rojo) no revela prácticamente actividad en condiciones de normalidad, pero si es muy útil para el reconocimiento de macrófagos, fibras musculares necróticas y fibras musculares regenerativas.

Naranja de acridina (AO): es un método de tinción específico para ácidos nucleicos que requiere del empleo de un microscopio de fluorescencia. ADN y ARN se marcan con una intensa fluorescencia amarilla y naranja respectivamente. Es muy útil para la identificación de fibras musculares regenerativas y de fibras musculares hipertróficas al revelar áreas intracelulares con incremento de síntesis proteica. También marca cualquier otro tipo celular con incremento de actividad de síntesis.

Ácido periódico de Schiff (PAS): esta técnica es empleada para mostrar el glucógeno en músculo esquelético, permitiendo reconocer aquellas acumulaciones anormales de éste en fibras musculares. Los tipos de fibras pueden ser diferenciados con esta técnica, al teñirse con más intensidad las fibras tipo II que las fibras tipo I.

Oil red O y Sudán Negro: estas técnicas permiten demostrar la existencia de adipocitos, al teñirse la gota lipídica de estos de color rojo y negro respectivamente.

- *Técnicas Inmunohistoquímicas:*

Desmina (Dako®, monoclonal anti-rat, clone D33, dilución 1:100). El anticuerpo antidesmina se emplea como marcador para detectar in vivo precursores de células musculares activados en fases tempranas (Lawson-Smith y McGeachie, 1998; Rantanen *et al*, 1995) y fibras musculares regenerativas (Smythe *et al*, 2001).

MyoD (Dako®, monoclonal anti-rat, clone 58A, dilución 1:50). Es el factor regulador miogénico de diferenciación (*Myogenic Differentiation 1: MyoD1*) y se emplea para el marcaje de células satélites activadas (Yoshimura y Harii, 1999; Ishido *et al*, 2004; Zammit, 2017; Baghdadi y Tajbakhsh, 2018).

Miogenina (Dako®, monoclonal anti-rat, clone F5D, dilución 1:100): es el factor regulador miogénico relacionado con el inicio y diferenciación terminal de los mioblastos, su fusión entre sí en miotubos o en con fibras preexistentes (Chargé y Rudnicki, 2004; Ishido *et al*, 2004; Weise *et al*, 2006).

Laminina (Dako®, monoclonal anti-rat, clone 4C7, dilución 1:50): es una glucoproteína que forma parte de la lámina basal y que se presenta asociada al colágeno, atraviesa todas las capas de la lámina basal. Permite perfilar el contorno de las fibras musculares al identificar la lámina basal en condiciones de normalidad y en los procesos degenerativos-regenerativos (Hurme y Kalimo, 1992; Huijbregts *et al*, 2001).

Vimentina (Dako®, monoclonal anti-rat, clone V9, dilución 1:100): se trata de una proteína que permite el marcaje del componente fibroso, concretamente el citoesqueleto de los fibroblastos, entre otros (Srikuea y Hirunsai, 2016).

Brevemente, después de una fijación de acetona de 5 minutos, los anticuerpos primarios se incubaron durante 2 horas. La visualización se realizó utilizando el sistema LSAB + System-HRP (K0979, Dako, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante (Taylor y Rudbeck 2013). Los controles negativos se realizaron en paralelo sin anticuerpos primarios. Los núcleos se contrastaron con hematoxilina de Mayer.

Análisis histomorfométrico

Las micrografías se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse E1000 (Nikon, Tokio, Japón) que incorpora una cámara de video en color Sony DXC-990P (Sony, Tokio, Japón). Las imágenes de fluorescencia de las muestras teñidas con AO se tomaron utilizando un microscopio Leitz Orthoplan, con una cámara digital incorporada Moticam 10 (10.0 MP) (MoticEurope, Barcelona, España).

Las imágenes obtenidas para el análisis morfométrico se transfirieron luego a un ordenador equipado con el software de análisis de imágenes *Image-ProPlus 6.5* (Media Cybernetics, Bethesda, MA, EE. UU.). En cortes transversales, se fotografiaron

en cada músculo cinco áreas dentro del sitio de implantación en los grupos de 60 días con un objetivo de 40x. En cada una de estas áreas (83188,840 μm^2) se evaluaron parámetros indicativos de los grados de regeneración y de fibrosis:

- Área transversal de las fibras musculares (μm^2).
- Diámetro menor de las fibras musculares (μm)
- Área total de la imagen ocupada por tejido conectivo (μm^2)
- Número de fibras musculares / área.
- Número de fibras musculares con núcleos centrales o internos / área.
- Número de fibras desorientadas (no transversales) / área.

Mediante un análisis semicuantitativo fue evaluada la respuesta miogénica a los 21 días, en secciones transversales empleando los siguientes parámetros, diferenciando entre zona intermedia (ZI) y zona central (ZC). Se asignó la siguiente gradación: (-) ausencia; (+) pocas o aisladas células o núcleos; (++) número moderado o pequeños grupos de células o núcleos; (+++) gran número o grandes acúmulos de células o núcleos en cinco áreas cortes transversales. Los parámetros evaluados fueron:

- Fibras musculares y células desmina+/ área (con la tinción inmunohistoquímica para Desmina).
- Núcleos MyoD+/ área (con la tinción inmunohistoquímica para MyoD).
- Núcleos Myf4+/ área (con la tinción inmunohistoquímica para Myf4).
- Fibras con fluorescencia anaranjada/ área (con la tinción AO en microscopía de fluorescencia).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico *SigmaStat 3.1*. Para realizar el análisis estadístico, se calculó la media de las cinco áreas para cada muestra, y luego se obtuvo la media \pm desviación estándar para cada grupo. Se utilizó la prueba *t* de Holm-Sidak o la prueba de Dunn dependiendo de si los datos superaban o no la prueba de normalidad. Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0.05$.

Resultados histológicos

Primer experimento

A los 7 días

A los 14 días

A los 21 días

A los 28 días

A los 60 días

Segundo experimento

A los 21 días

A los 28 días

A los 60 días

Resultados ecográficos

Resultados histológicos

Primer experimento

A los 7 días

Dentro de este período, se evidenciaron tres zonas diferentes en la sección transversal de los músculos de las ratas correspondientes a los grupos GCR, GTAA y GTAC: zona central (ZC), zona intermedia (ZI) y zona de supervivencia (ZS) (Fig. 9a). La ZC de los músculos del grupo GCR estaba ocupada por fibras musculares necróticas y degeneradas (datos no mostrados). En los grupos GTAC (datos no mostrados) y GTAA, el tejido adiposo implantado estaba rodeado por un número significativo de células inflamatorias con alta actividad de fosfatasa ácida (Fig. 9b).

En la proximidad de la ZS, la ZI contenía variable densidad de fibras musculares regenerativas (GCR: 95%; GTAA: 49%; y GTAC: 4.4%) y con distintos comportamientos tintoriales entre los diferentes grupos con las técnicas histológicas (Fig. 10 a,b,c), histoquímicas (Fig. 11 a,b,c,d) e inmunohistoquímicas (Fig. 12 a,b,c,d). Mientras que en el grupo GCR la tinción para desmina y laminina reveló un patrón altamente organizado de regeneración y persistencia de las láminas basales respectivamente (Fig. 12 a,b), en el grupo GTAA fueron observadas células mononucleares desmina-positivas intercaladas entre el tejido implantado y la ausencia de láminas basales (Fig. 12 c,d).

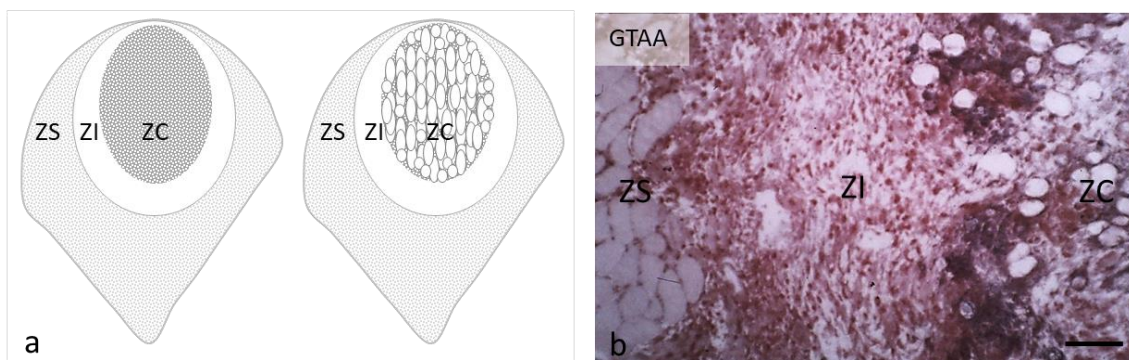


Fig. 9. Zonificación del sitio de implantación. (a) Representación esquemática de secciones transversales del músculo tibial anterior que muestran las tres zonas observadas a los 7 días en el grupo GCR (izquierda) y el grupo GTAA (derecha). (b) Sección transversal de un músculo correspondiente al grupo GTAA en el que la presencia de macrófagos se destaca por su actividad de fosfatasa ácida principalmente en ZI. ZS: zona sobreviviente; ZI: zona intermedia; ZC: zona central. Barra de escala: 120 μ m.

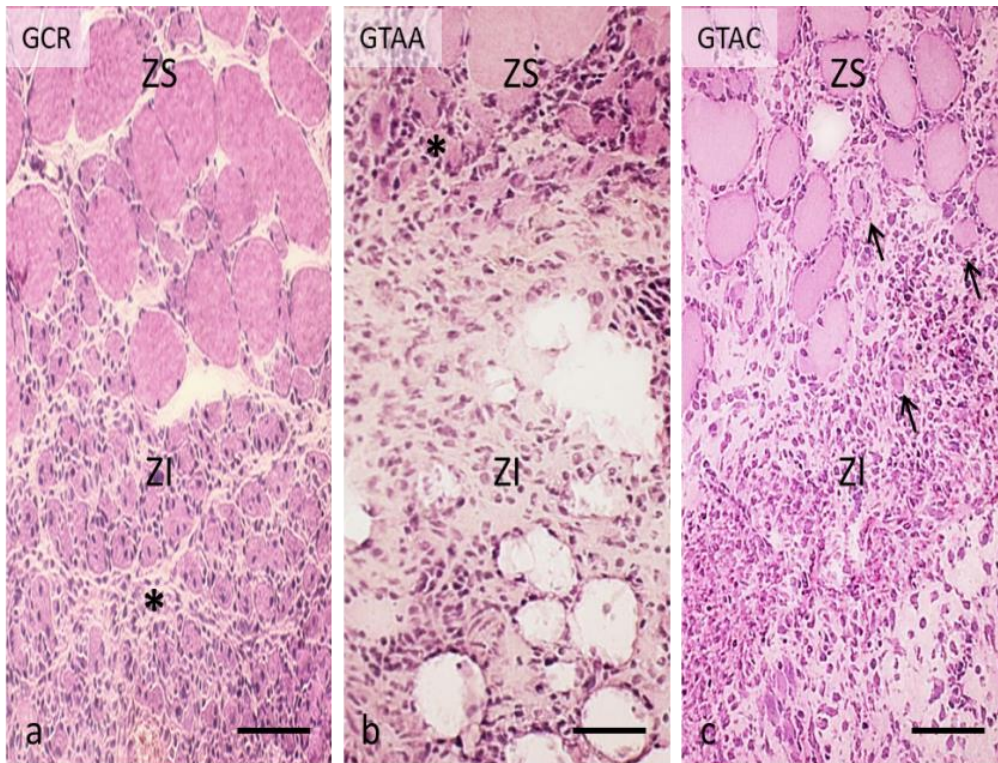


Fig. 10. Micrografías representativas de la histología de la zona intermedia (ZI). (a) Grupo GCR: la ZI está ocupada por una densa masa de fibras musculares regenerativas, pequeñas, basófilas, con núcleos centrales (asterisco). (b) Grupo GTAA: la densidad de las fibras regenerativas es mucho menor, y las fibras se ubican en las proximidades de la ZS (asterisco) mientras que el resto de la ZI está ocupada por células inflamatorias y adiposas. (c) Grupo GTAC: la ZI está invadida por células inflamatorias, y sólo se observan unas pocas fibras musculares regenerativas intercaladas entre las fibras musculares aparentemente normales de la ZS (flechas). H-E [a,b,c] . Barras de escala: 50 μ m.

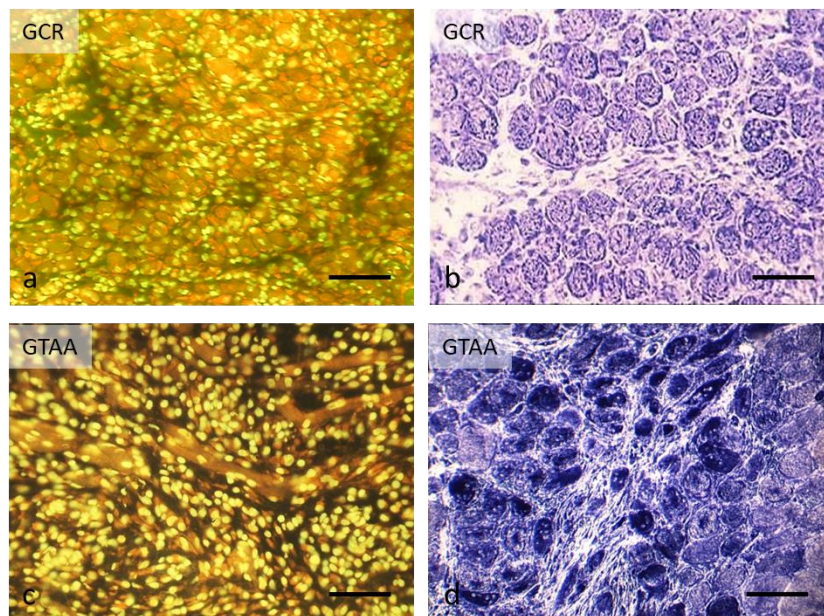


Fig. 11. Comparación de las características histoquímicas a los 7 días entre las fibras regenerativas de GCR y los grupos GTAA. Grupo GCR: secciones transversales que revelan fibras musculares regenerativas con (a) fluorescencia naranja y (b) un patrón reticular uniforme de alta actividad oxidativa. Grupo GTAA: secciones transversales de fibras musculares regenerativas con (c) baja fluorescencia naranja y (d) tinción heterogénea de actividad oxidativa sin un patrón reticular. AO [a, c] NADH-tr [b, d]. Barras de escala: 50 μ m (a, c, d); 20 μ m (b).

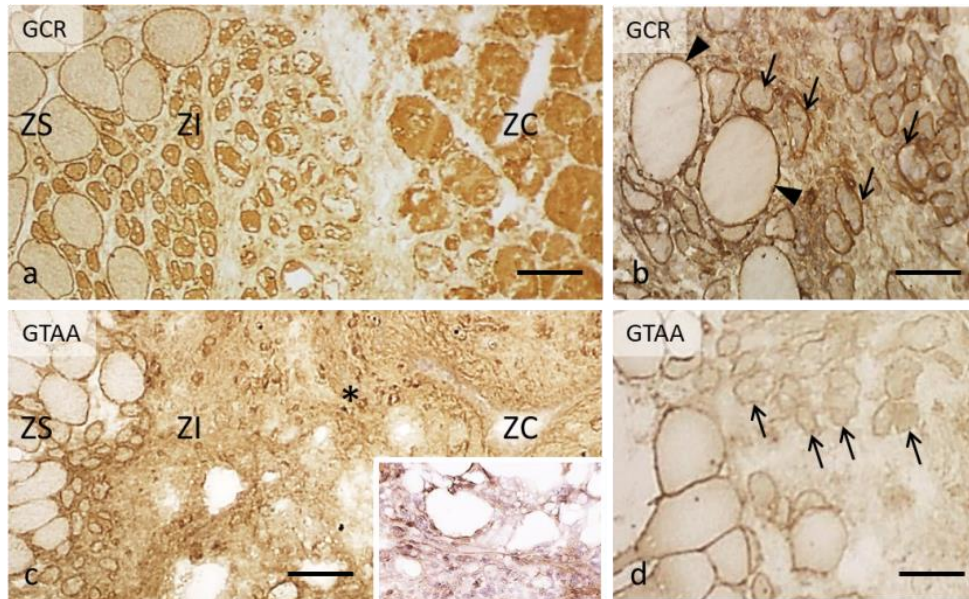


Fig. 12. Análisis inmunohistoquímico de desmina y laminina en grupos GCR y GTAA. Grupo GCR: secciones transversales que revelan fibras musculares regenerativas con (a) tinción fuerte y homogénea para desmina dispuesta de manera ordenada en la ZI y (b) láminas basales marcadas con anti-laminina en fibras normales (puntas de flecha) y fibras musculares regenerativas (flechas). Grupo GTAA: secciones transversales de fibras musculares regenerativas con (c) baja tinción anti-desmina intrasarcoplasmática, marcada a lo largo de la periferia, y abundantes células mononucleares positivas para desmina (asterisco) dispuestas de manera desordenada en la ZI próxima a las células adiposas. Insertado: observe cómo las pequeñas células desmina-positivas rodean a los adipocitos. (d) Ausencia de marcaje de láminas basales con anti-laminina en fibras musculares regenerativas (flechas). Anti-desmina [a, c, insertado]; anti-laminina [b, d]. Barras de escala: 100 μm (a, c); 50 μm (b, d).

A los 14 días

En el grupo de GCR, se observó que la ZI estaba ocupada por fibras musculares regenerativas de mayor tamaño, con menos basofilia (Fig. 13a), y que ya mostraban tipos de fibras diferenciadas con la técnica histoquímica NADH-tr (Fig. 13b). Sin embargo, en el grupo GTAA, se encontró que las fibras eran heterogéneas en términos de su grado de madurez (variaciones de tamaño y distribución intrasarcoplasmática de la basofilia) (Fig. 13d). Muchos de ellos tenían características indicativas de regeneración anormal (acumulaciones nucleares, desorientación interna y agrietamiento) (Fig. 13d) o cambios citoarquitectónicos del tipo targettoide (indicativos de denervación-reinervación) en forma de áreas centrales de fuerte actividad oxidativa (Fig. 13e). La observación más notable fue la presencia de miotubos aislados o formando pequeños grupos dispersos en las ZI y ZC. Estas estructuras tenían características histológicas variables que indicaban que se encontraban en diferentes etapas de madurez y con patrones de tinción desmina variables, siendo la presencia de alteraciones citoarquitectónicas el hallazgo más notable, en contraste con el grupo

GCR (Fig. 13c, f). En el grupo GTAC, las fibras regenerativas parecían estar sufriendo cambios degenerativos y estaban rodeadas por una importante respuesta inflamatoria (Fig. 13 g-i).

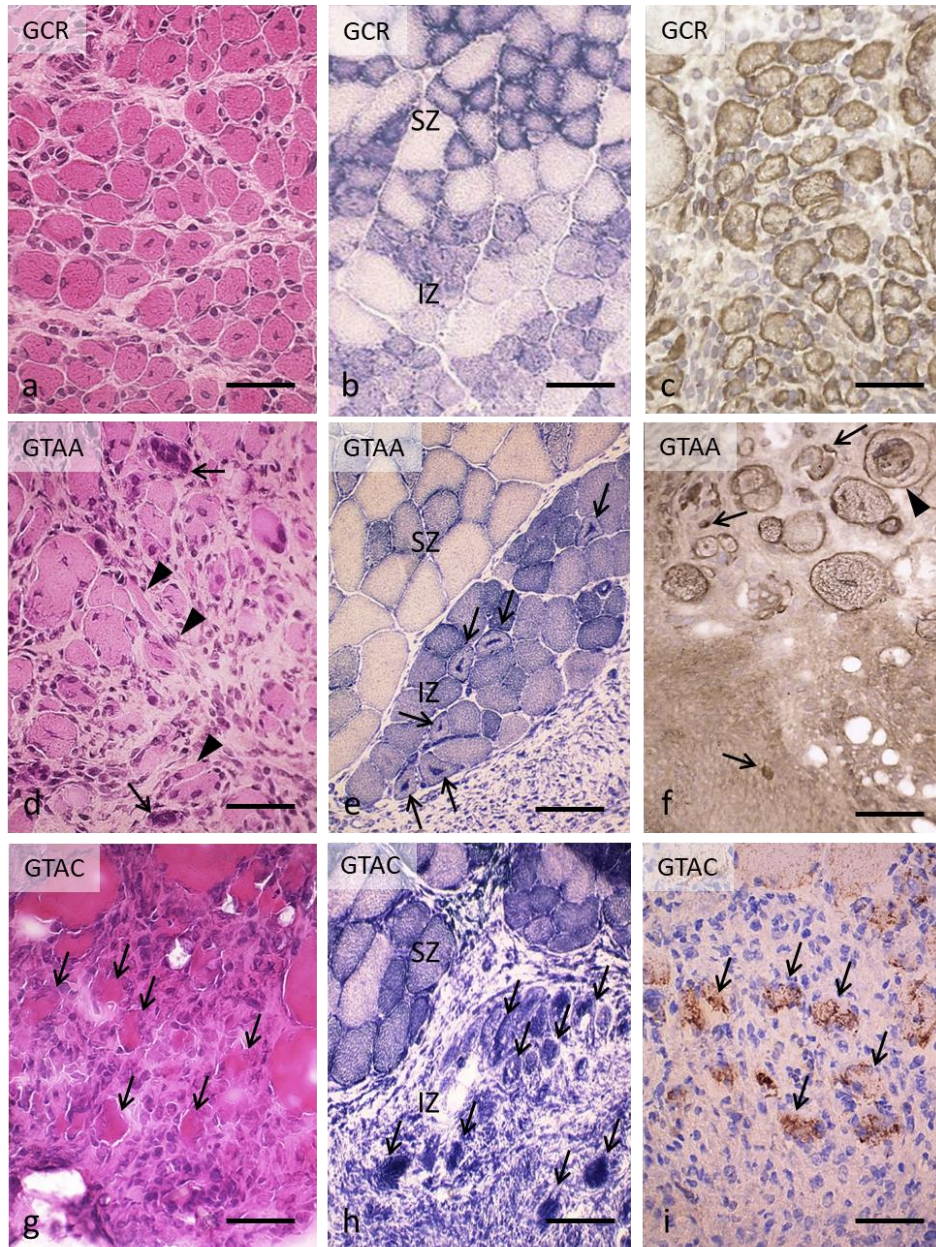


Fig. 13. Características microscópicas a los 14 días de las fibras musculares regenerativas ubicadas en la ZI de los grupos GCR, GTAA y GTAC. Grupo GCR: fibras musculares regenerativas con (a) basofilia moderada y un tamaño homogéneo, (b) diferenciación en tipos histoquímicos, y (c) un patrón de tinción reticular homogéneo para desmina. Grupo GTAA: fibras musculares regenerativas de (d) tamaño y morfología variables, algunas desorientadas (puntas de flecha) y otras con acumulación de núcleos (flechas); (e) no hay una tipificación clara de las fibras musculares, y varias tienen áreas centrales de alta actividad oxidativa (flechas); (f) fibras musculares con patrones de tinción heterogéneos, que incluyen una fibra en cola de serpiente (punta de flecha); también observamos células mononucleares desmina positivas (flechas). Grupo GTAC: (g) fibras regenerativas pequeñas de aspecto degenerativo que muestran morfología irregular, acidofilia y sin núcleos centrales (flechas), rodeadas de células inflamatorias. (h) fibras musculares con patrones anormales de tinción oxidativa (flechas). (i) varias fibras que muestran alteración del inmunomarcaje de desmina (flechas) H-E [a, d, g]; NADH-tr [b, e, h]; anti-desmina [c, f, i]. Barras de escala: 50 μ m (a, c, d, f, g, i); 100 μ m (b, e, h).

En el grupo GTAA, la tinción de ATPasa reveló la existencia de vascularización en las tres zonas (Fig. 14a). Esto indicó que el tejido adiposo implantado parecía estar integrado por revascularización desde el SZ. Por el contrario, en el grupo GTAC, el tejido adiposo implantado mostró signos de destrucción por congelación y fue aislado por una banda de células inflamatorias (Fig. 14b, c). En este grupo, la respuesta regenerativa en el borde de la lesión fue residual.

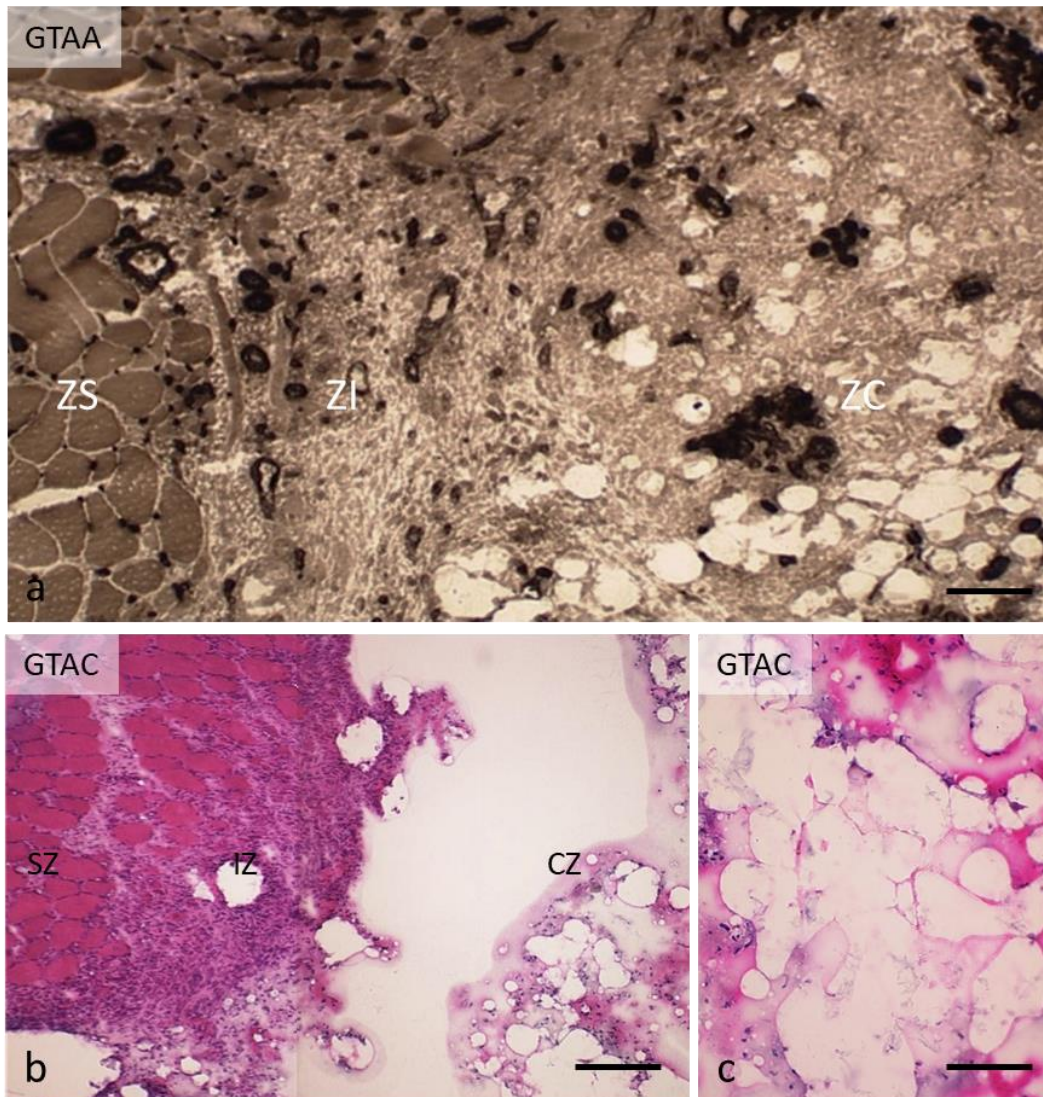


Fig. 14. Micrografías representativas de la integración vascular del tejido adiposo implantado en el músculo huésped en el grupo GTAA y de la no integración en el grupo GTAC. Grupo GTAA: (a) imagen que muestra vascularización visible en las tres zonas con bajo aumento. Los vasos sanguíneos están teñidos de negro. Grupo GTAC: (b) sección transversal en la que se observan las tres zonas. La ZI está ocupada por una gran reacción inflamatoria y el tejido adiposo congelado de la ZC se retrae. (c) Detalle del aspecto degenerativo del tejido adiposo congelado. Los adipocitos están rotos y los núcleos son picnóticos. ATPasa, pH 9.4 [a]; H-E [b, c]. Barras de escala: 100 μ m (a); 50 μ m (b, c).

A los 21 días

En el grupo de GCR, el sitio de la lesión fue reconocido por la presencia de fibras musculares regeneradas con núcleos internos y tamaños discretamente variables. La diferenciación en los tipos de fibra ya era evidente en este momento, y no se detectaron características prominentes en el análisis inmunohistoquímico (Fig. 15a). En el grupo GTAA, las ZI y ZC eran aún evidentes. Los hallazgos más notables en este grupo fueron la presencia de fibras musculares con núcleos internos, de tamaños marcadamente variables y desorientadas (Fig. 15b). También se observó que algunos fascículos contenían fibras en anillo (Fig. 15c). Este patrón alterado fue muy evidente con la tinción de desmina (Fig. 15d). Se observaron núcleos positivos para MyoD tanto en las fibras regenerativas de la ZI como entre los adipocitos de la zona central en el grupo GTAA (Fig. 16 a, b). Por el contrario, en el grupo GTAC, no se observaron núcleos positivos para MyoD ni al nivel de las escasas fibras regenerativas ni entre los restos del tejido adiposo (Fig. 16c, d).

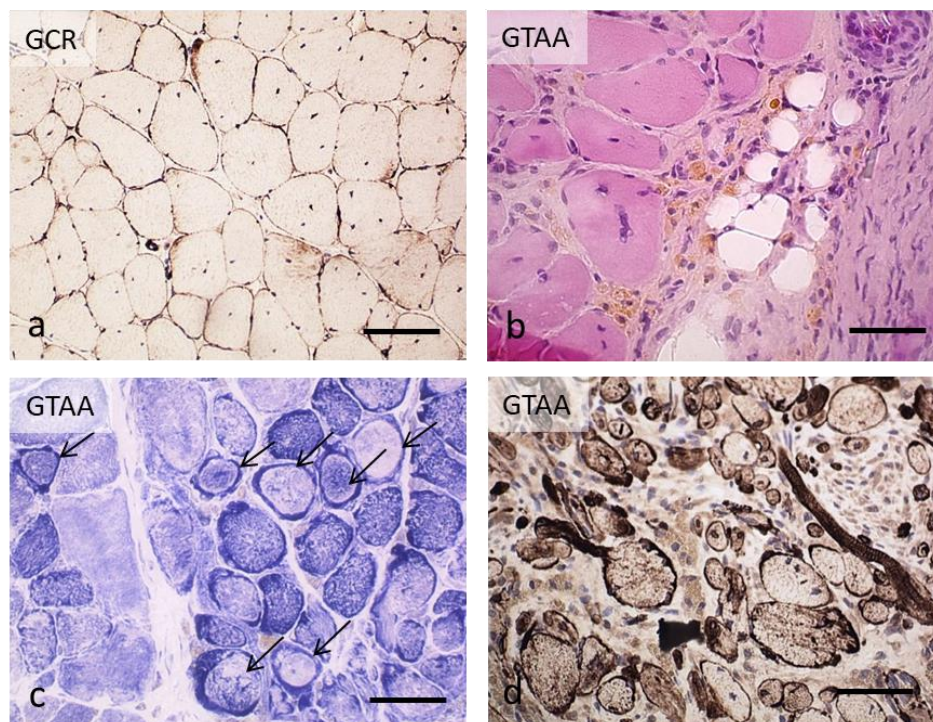


Fig. 15. Características microscópicas de las fibras musculares regenerativas a los 21 días en los grupos GCR y GTAA. Grupo GCR: (a) fibras musculares regeneradas con núcleos internos y sin expresión de desmina, excepto a nivel subsarcolemal. Grupo GTAA: (b) Fibras musculares de tamaño variable, con núcleos internos junto a un foco de fibrosis con adipocitos y macrófagos con hemosiderina. (c) Las fibras muestran diferenciación en los tipos, y algunas corresponden a fibras en anillo (flechas). (d) Fibras musculares con gran variabilidad en tamaño, expresión de desmina y orientación. Desmina [a, d]; H-E [b]; NADH-tr [c]. Barras de escala: 50 μ m (a); 100 μ m (b, c, d).

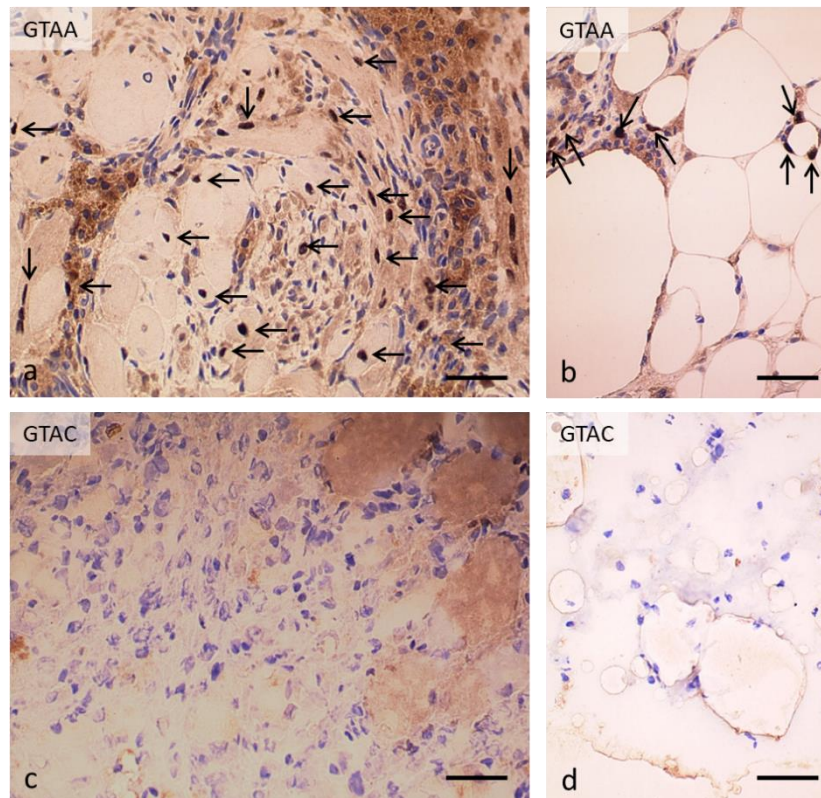


Fig. 16. Inmunolocalización de núcleos MyoD en grupos GTAA y GTAC. Grupo GTAA: (a) Zona intermedia: sección transversal que revela fibras musculares regenerativas orientadas y desorientadas que contienen núcleos positivos para MyoD (flechas). (b) Zona central: núcleos positivos para MyoD (flechas) dispersos entre adipocitos (flechas). Grupo GTAC: (c) Zona intermedia: no se observan núcleos marcados con MyoD. (d) Zona central: las células adiposas están rotas y no se observan núcleos marcados con MyoD. Barras de escala: 30 μ m.

A los 28 días

En general, las observaciones realizadas dentro de este período de tiempo fueron similares a las realizadas a los 21 días. En el grupo de GCR, las fibras musculares habían regenerado por completo y no exhibieron anomalías al usar las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, siendo el hallazgo más notable la presencia de núcleos internos (datos no mostrados). Por otro lado, se observó en el grupo GTAA una destacable variabilidad en el tamaño de las fibras musculares y en su orientación (Fig. 17 a, b). El comportamiento de estas fibras con las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas fue similar al observado durante el período anterior, y se confirmó la presencia de anomalías citoarquitecturales. En el grupo GTAC, el área de implantación fue ocupada por tejido conectivo y se mantenía una respuesta inflamatoria persistente (Fig. 17c). Entre esta área y el ZS, se observan ocasionalmente

pequeñas fibras musculares (probablemente fibras regenerativas que habrían permanecido atroficas) (Fig. 17 c, d).

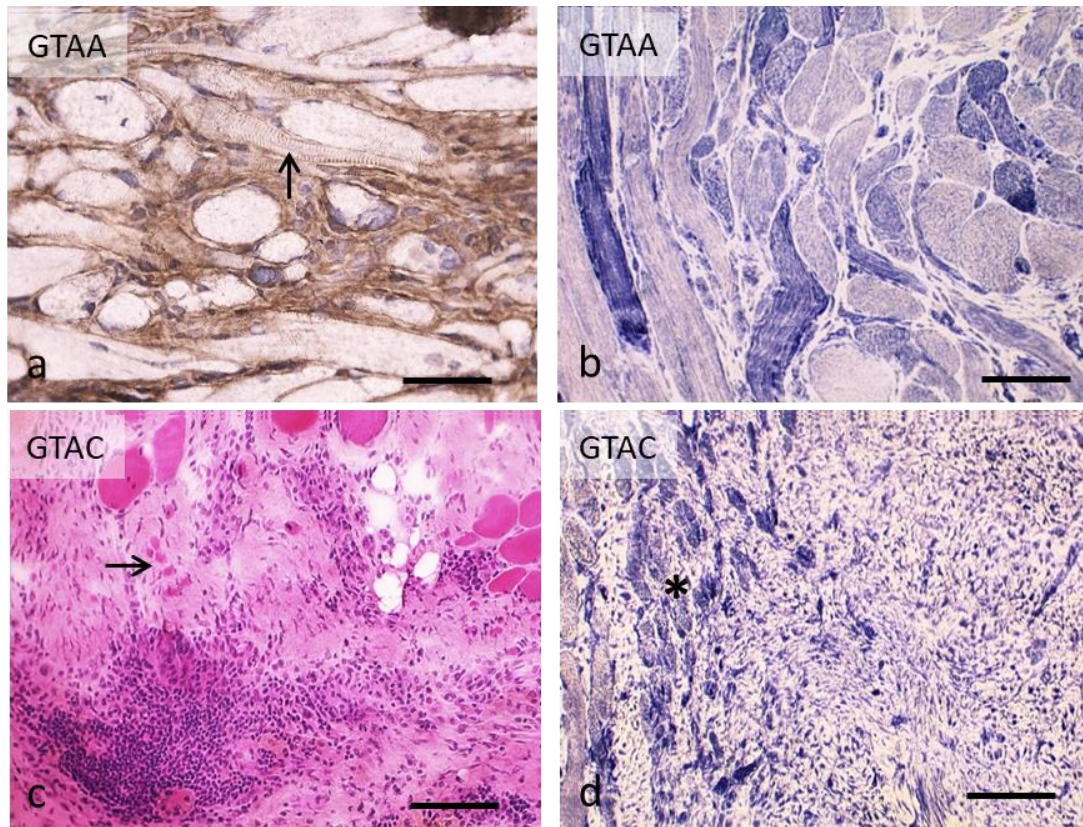


Fig. 17. Características microscópicas de las fibras musculares regenerativas a los 28 días en los grupos GTAA y GTAC. Grupo GTAA: (a) Fibras musculares de tamaño y morfología variables, completamente desorientadas. En algunas fibras, las estrias transversales son evidentes (flecha). (b) A pesar de su anormal histoarquitectura, las fibras musculares muestran diferenciación en los tipos de fibra histoquímica. Grupo GTAC: (c) Focos de células inflamatorias y pequeñas fibras aisladas (flecha) en el espesor del tejido conectivo. (d) A la izquierda de la imagen, se observa el límite del área superviviente, junto con pequeñas fibras sin diferenciación de los tipos histoquímicos (asterisco). A la derecha, toda el área del implante se caracteriza por la ausencia de fibras musculares. Anti-desmina [a]; NADH-tr [b, d]; H-E [c]. Barras de escala: 50 μ m (a, b); 100 μ m (c, d).

A los 60 días

En este momento, las características de la histoarquitectura muscular variaron significativamente entre los diferentes grupos (Fig. 18a, b, c, d), un hallazgo que fue confirmado por el análisis histomorfométrico. Hubo diferencias significativas en el porcentaje del área ocupada por el tejido conectivo entre todos los grupos: mientras

que en un músculo normal (GC) representó el $2.89 \pm 0.25\%$, en el grupo GCR fue de $5.80 \pm 0.52\%$, $19.57 \pm 3.47\%$ en el grupo GTAA y $59.50 \pm 1.47\%$ en el grupo GTAC (Fig. 19). Por lo tanto, era evidente que en el grupo GTAA, el 80% del tejido adiposo autógeno implantado fue reemplazado por tejido muscular. Si bien la presencia de fibras con núcleos internos fue la característica más común en los tres grupos experimentales, las principales características histológicas de las fibras musculares recién formadas en el grupo GTAA fueron la desorientación y la variabilidad en sus tamaños (Tabla 1). Mientras que en el grupo GCR las fibras musculares regeneradas habían recuperado su organización en fascículos de manera similar a un músculo normal, esta recuperación no se produjo en el grupo GTAA (Fig. 18).

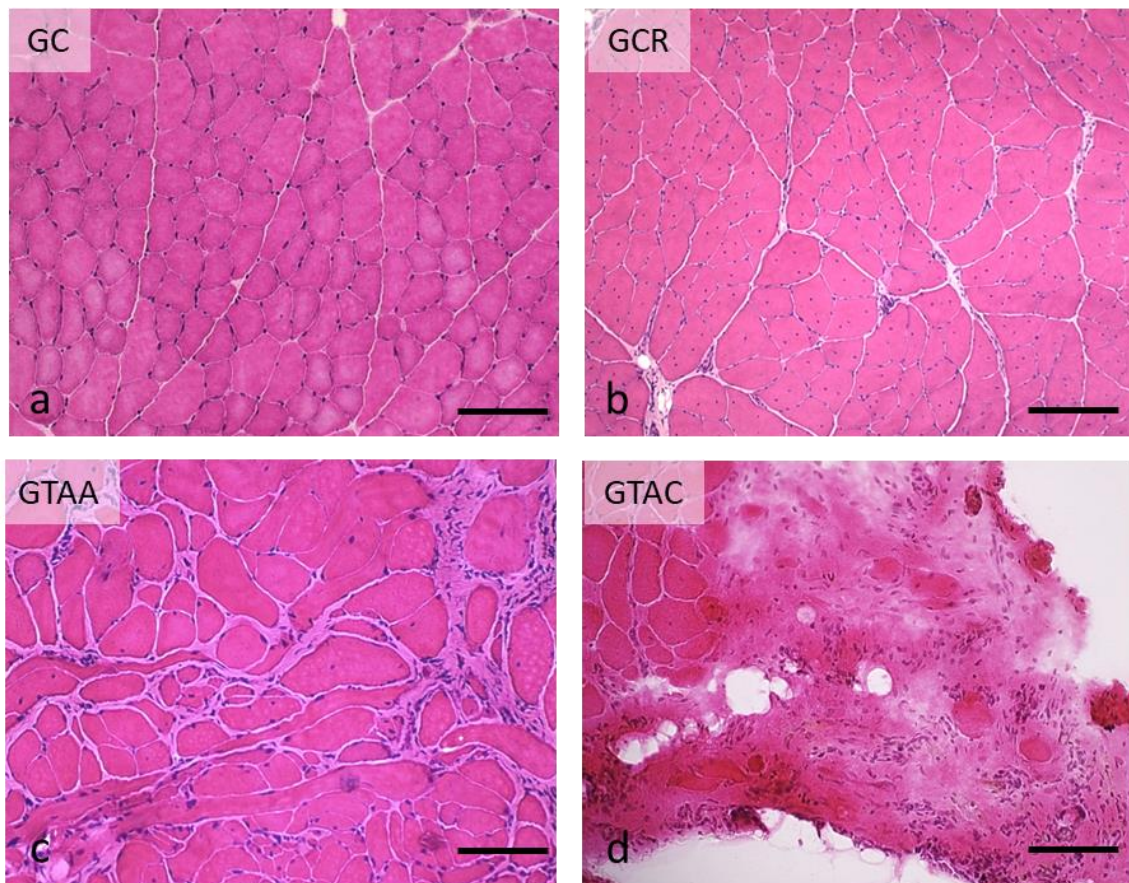


Fig. 18. Micrografías representativas de histoarquitectura muscular a los 60 días de los grupos GC, GCR, GTAA y GTAC. Secciones transversales de músculos correspondientes a: (a) Grupo GC: fibras musculares normales, con morfología poligonal y núcleos periféricos, dispuestos en fascículos. (b) Grupo GCR: fibras musculares regeneradas, con morfología poligonal y núcleos internos, dispuestos en fascículos. (c) Grupo GTAA: fibras musculares de morfología y tamaño variables, desorientadas y algunas con núcleos internos. Obsérvese la fibrosis endomisial y la falta de organización en los fascículos. (d) Grupo GTAC: el área está ocupada por abundante tejido fibroso, células inflamatorias y fibras musculares aisladas. H-E. Barras de escala: 100 μm .

Tabla 1. Resultados histomorfométricos a los 60 días

Grupo	área transversal de las fibras	número de fibras musculares/área	número de fibras con núcleos internos /área	número de fibras desorientadas / área
GN	3400.6±184.4	14.8±0.7	4.2±1.6	0.01±0.01
GCR	3514.8±157.8	14.8±0.4	68.8±3.4*	0.87±0.07*
GTAA	2385.0±541.0*†	16.8±1.7	62.3±5.1*	23.9±3.0*†
GTAC	463.6±411.0*†§	6.7±0.4*†§	70.2±9.0*	0.34±0.5*†§

Todos los valores están expresados como $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs grupo GN; † $P < 0.05$ vs grupo GCR; § $P < 0.05$ vs grupo GTAA.

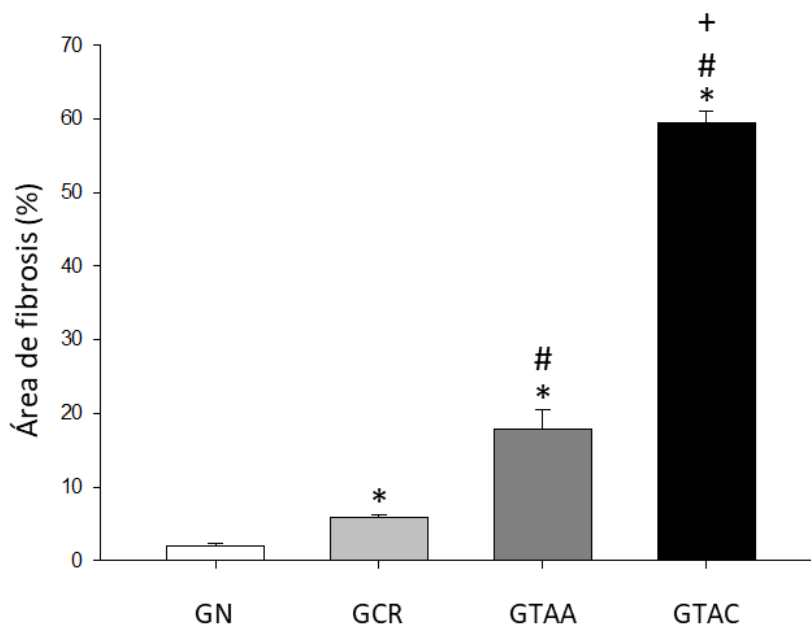


Fig. 19. Comparación de porcentaje de fibrosis área entre los diferentes grupos a los 60 días. * $p < 0.05$ vs GC; # $p < 0.05$ vs GCR; + $p < 0.05$ vs GTAA.

Resultados histológicos

Segundo experimento

A los 21 días

En este tiempo, los músculos esqueléticos presentaron algunas diferencias en las características de la respuesta regenerativa dependiendo del grupo de estudio (Tabla 2).

En el grupo GCR la regeneración está prácticamente completada y prácticamente no había distinción entre las diferentes zonas (ZS, ZI y ZC). Las dos últimas se reconocen en una única al estar ocupadas por fibras musculares con mionúcleos de localización interna o centralizada, aunque también se vieron fibras de pequeño tamaño y algunas fibras rajadas (*split fibers*). Ocasionalmente fueron observadas algunas pequeñas fibras diseminadas con incremento en su tinción para desmina, pero no se vieron núcleos marcados con MyoD o Myf4, ni tampoco incremento de ARN con la tinción AO (Fig. 20 a-d).

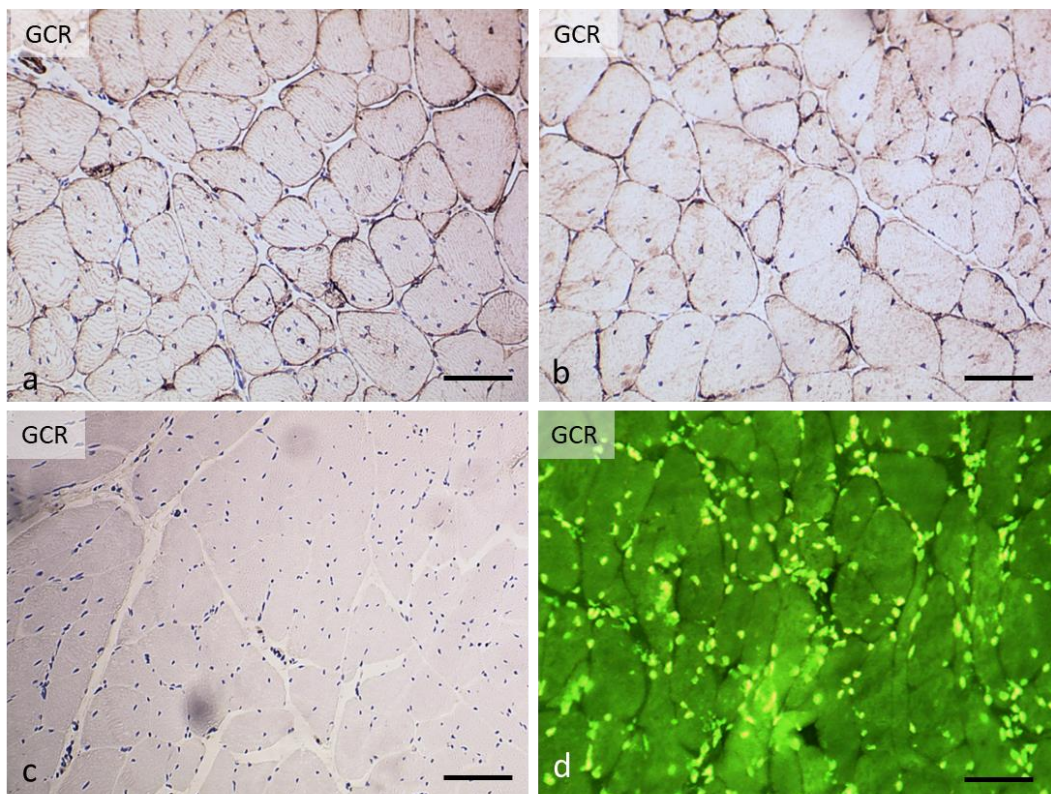


Fig. 20. Respuesta miogénica en el grupo GCR a los 21 días. Secciones transversales en las que se observan fibras musculares regeneradas con ausencia de (a) positividad para desmina, (b) MyoD, (c) Myf4 y (d) fluorescencia anaranjada la tinción AO. Barras de escala: 50 μ m.

En el grupo GCR destaca, en torno a la ZC ocupada por tejido fibroso, la presencia de fibras musculares de pequeño tamaño teñidas intensamente con antidesmina, algunas de las cuales contienen núcleos MyoD+ y, muy ocasionalmente, Myf4+ (Fig. 21 a-c). Con la tinción AO, algunas de estas fibras mostraban fluorescencia anaranjada indicativa de activa síntesis proteica.

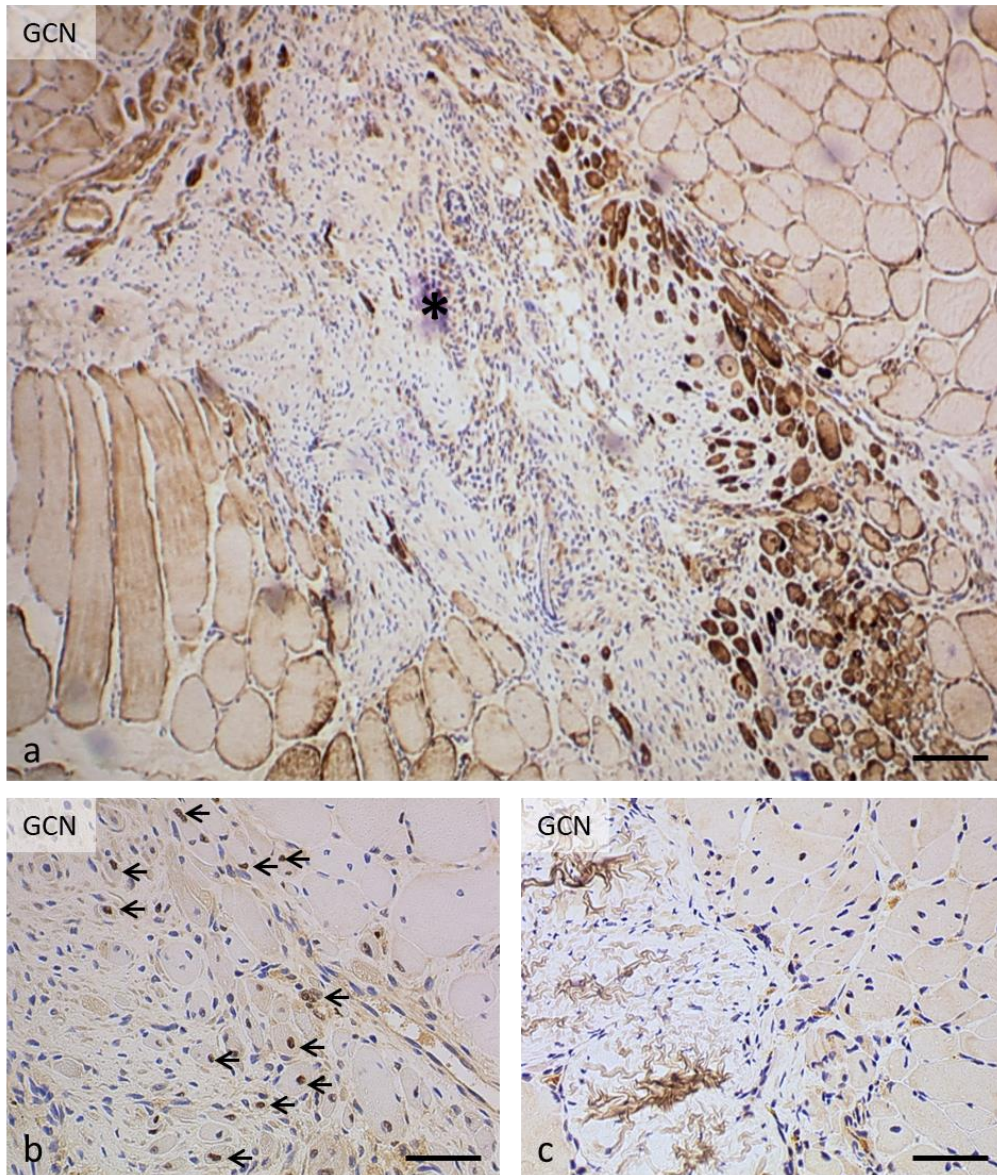


Fig. 21. Respuesta miogénica en el grupo GCN a los 21 días. (a) Imagen a bajo aumento en la que se ve un gran espacio correspondiente a la ZC (asterisco) ocupado por abundantes núcleos y tejido fibroso, al que rodea una franja correspondiente a la ZI por dentro de la ZS. Las pequeñas fibras musculares que ocupan la ZI son positivas para desmina. (b) Las flechas marcan núcleos centrales y periféricos MyoD+ en fibras musculares. (c) No hay marcaje para Myf4. Barras de escala: 50 μ m.

En el grupo GTAA, la ZI estaba ocupada por células mononucleadas y fibras musculares regenerativas que resultaron naranja fluorescentes y desmina; sin

embargo el patrón de tinción para ésta última técnica no fue homogénea (Fig. 22a). Los marcajes con anti-MyoD y anti-Myf4 revelaron abundantes núcleos positivos en las fibras regenerativas y/o neoformadas, tanto de localización central como periférica (Figs. 22 b-c). Las fibras regenerativas mostraron fluorescencia anaranjada con la tinción AO (Fig. 22 d).

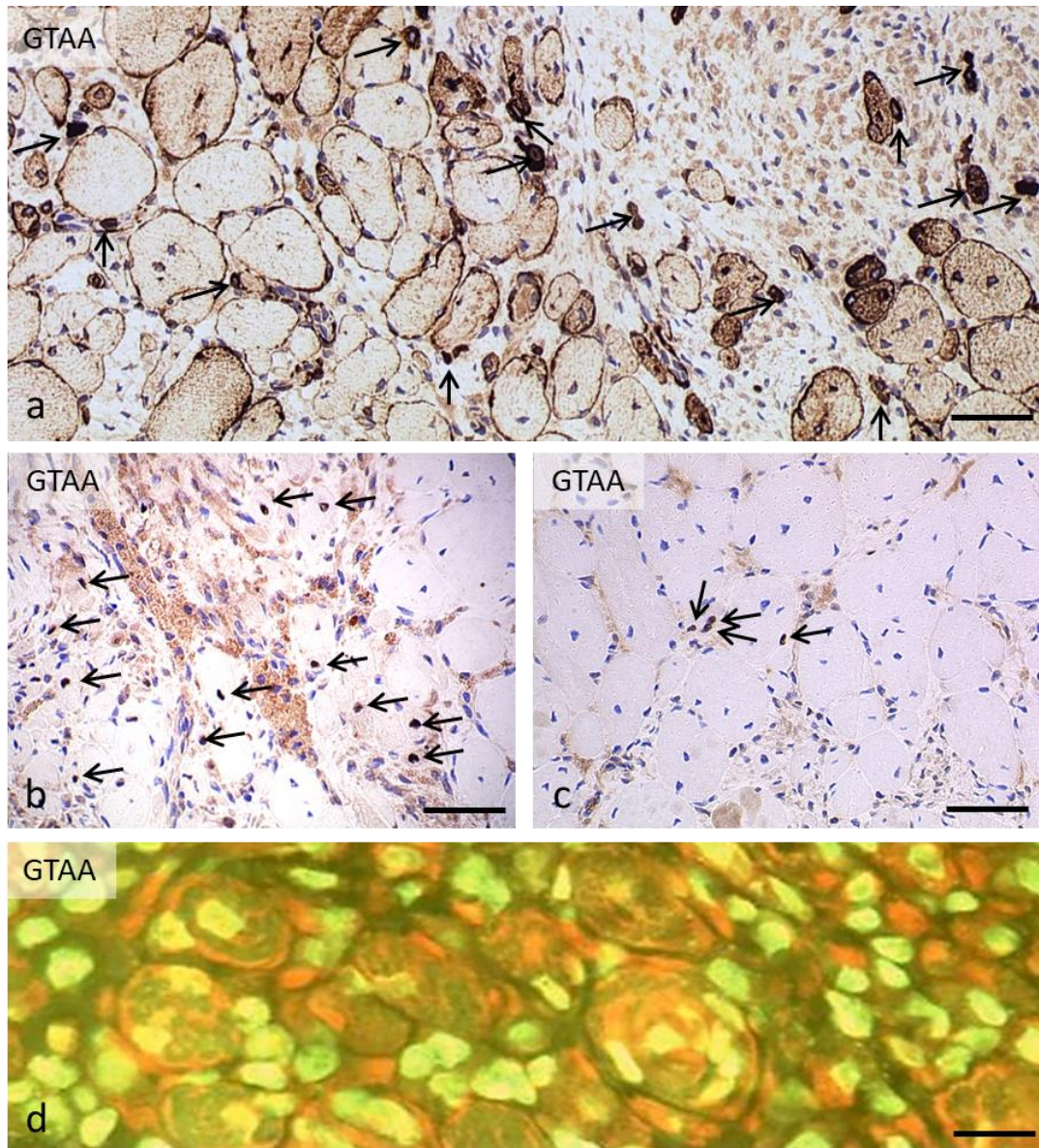


Fig. 22. Respuesta miogénica en el grupo GTAA a los 21 días. (a) ZI ocupada por fibras regenerativas o neoformadas que muestran diferencias en tamaño y grado de tinción frente a desmina. Obsérvese la presencia de abundantes células mononucleadas fuertemente positivas (flechas). (b) Las flechas señalan núcleos MyoD+ en fibras musculares. (c) En el centro de la imagen pequeñas fibras contienen algunos núcleos Myf4+. (d) Fibras regenerativas o neoformadas mostrando fluorescencia anaranjada en la periferia y en el interior del sarcoplasma. Los núcleos (centrales y periféricos) de las fibras y los situados en el intersticio muestran su característica fluorescencia amarilla con la tinción AO. Barras de escala: 30 μ m (a-c); 10 μ m (d).

Por lo que respecta a la ZC, el tejido adiposo se encontraba bien conservado y presentó evidencias de una respuesta miogénica en su espesor: células desmina+, abundantes núcleos MyoD+ y, en menor número, núcleos Myf4+ (Figs. 23 a-c).

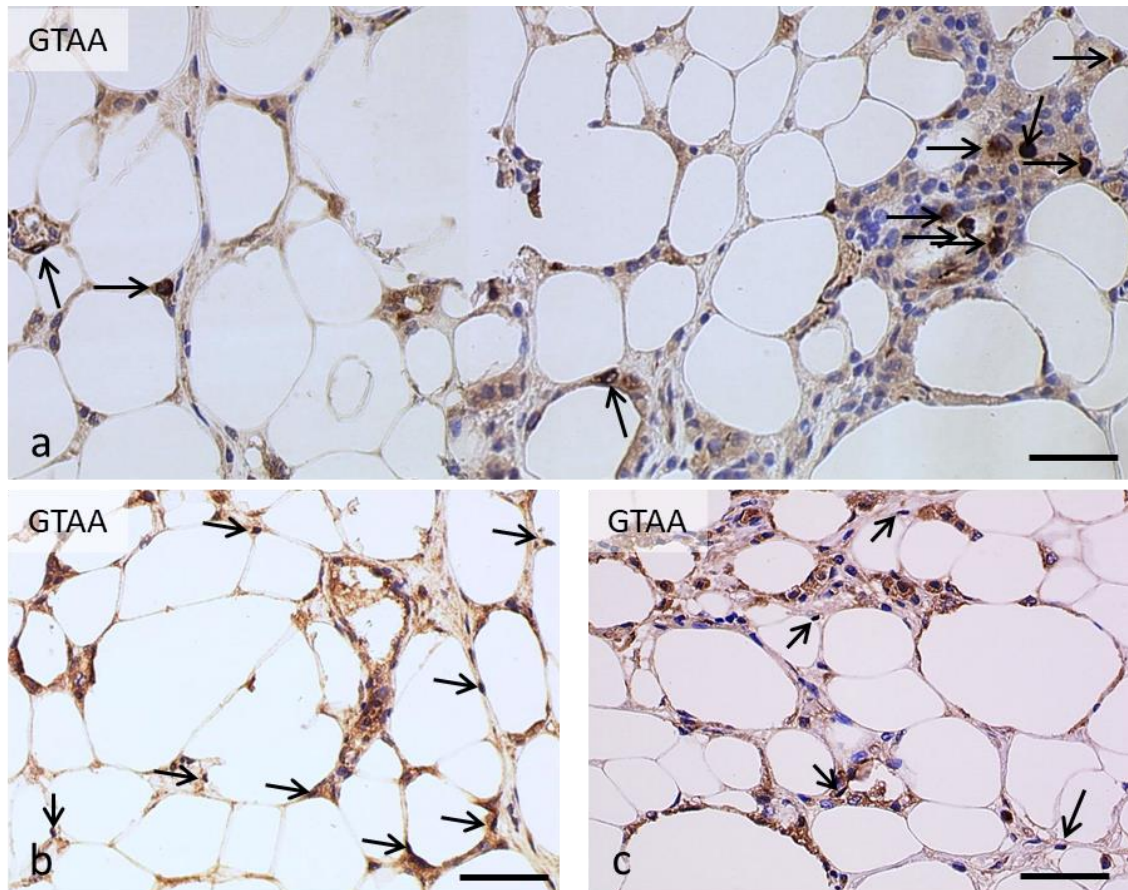


Fig. 23. Respuesta miogénica en el grupo GTAA a los 21 días. Imágenes correspondientes a la ZC ocupada por el tejido adiposo autólogo trasplantado. Obsérvese la presencia (flechas) en el intersticio de (a) células desmina+, (b) núcleos MyoD+ y (c) núcleos Myf4+. Algunos de los núcleos marcados se encuentran en íntima aposición con los adipocitos. Barras de escala: 30 μ m (a-c).

En el grupo GIOS fibras regenerativas y/o neoformadas llenan la ZI junto con cierta reacción inflamatoria (Fig. 24 a). La ZC está ocupada por estructuras irregulares a modo de espículas que se corresponden con los restos del implante de Osteovit® (Fig.24 a). Los rasgos histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos son similares a los descritos previamente en los grupos GCN y GTAA (Fig. 24 b-d), Sin embargo, con la tinción AO la fluorescencia anaranjada en las fibras regenerativas y/o neoformadas fue variable ya que mientras que en algunas zonas fue inexistente, en otras sí fue observada.

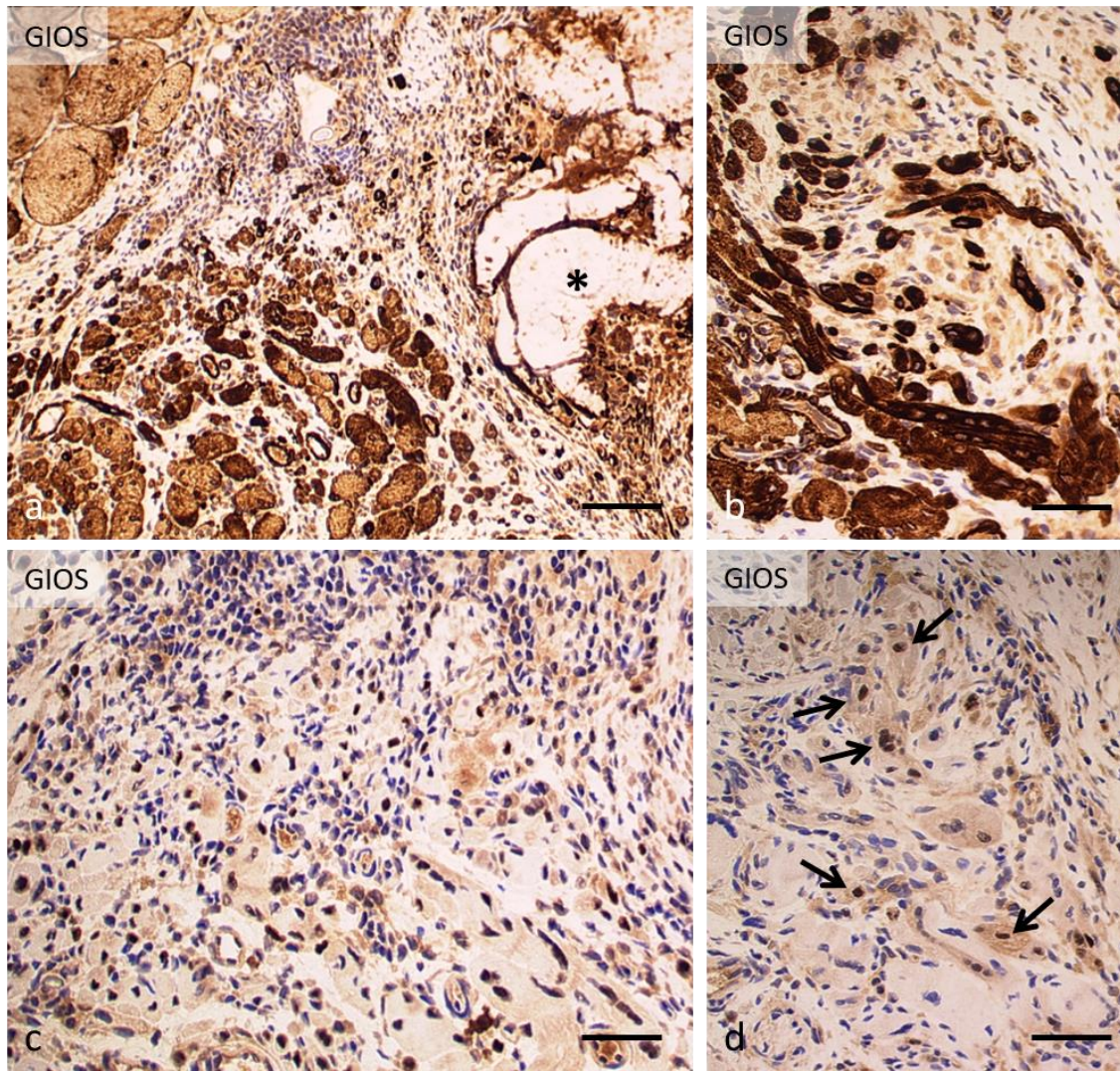


Fig. 24. Respuesta miogénica en el grupo GIOS a los 21 días: (a) A bajo aumento se aprecia a la derecha la zona de implantación de Osteovit® (asterisco), en la parte inferior (que se corresponde con la ZI), se ven un grupo de pequeñas fibras musculares muy teñidas con desmina, que contrastan en tamaño y tinción con las fibras aparentemente normales situadas arriba a la izquierda. (b) ZI: Detalle de estas fibras regenerativas pequeñas de morfología irregular y de células mononucleadas positivas para desmina; algunas se disponen irregularmente. (c) ZI: Abundantes núcleos teñidos de negro por su positividad frente a MyoD. (d) ZI: Las flechas marcan pequeñas fibras musculares que contienen núcleos positivos para Myf4. Anti-desmina [a,b]; Anti-MyoD [c]; Anti-Myf4 [d]. Barras de escala: 100 μ m (a); 30 μ m (b, c, d).

En el grupo GIMD, la ZC contenía restos de la matriz implantada junto con una fuerte reacción inflamatoria. Sin embargo, la ZI mantenía una respuesta miogénica consistente en fibras musculares regenerativas con patrones de tinción frente a desmina similares a los grupos anteriores. Igual comportamiento fue observado para los marcadores MyoD y Myf4 que fueron positivos en algunos núcleos (Fig. 25 a-b). La

tinción con AO puso de manifiesto, como en el grupo anterior, variaciones en la intensidad de la fluorescencia anaranjada en las fibras regenerativas (Fig. 25 c).

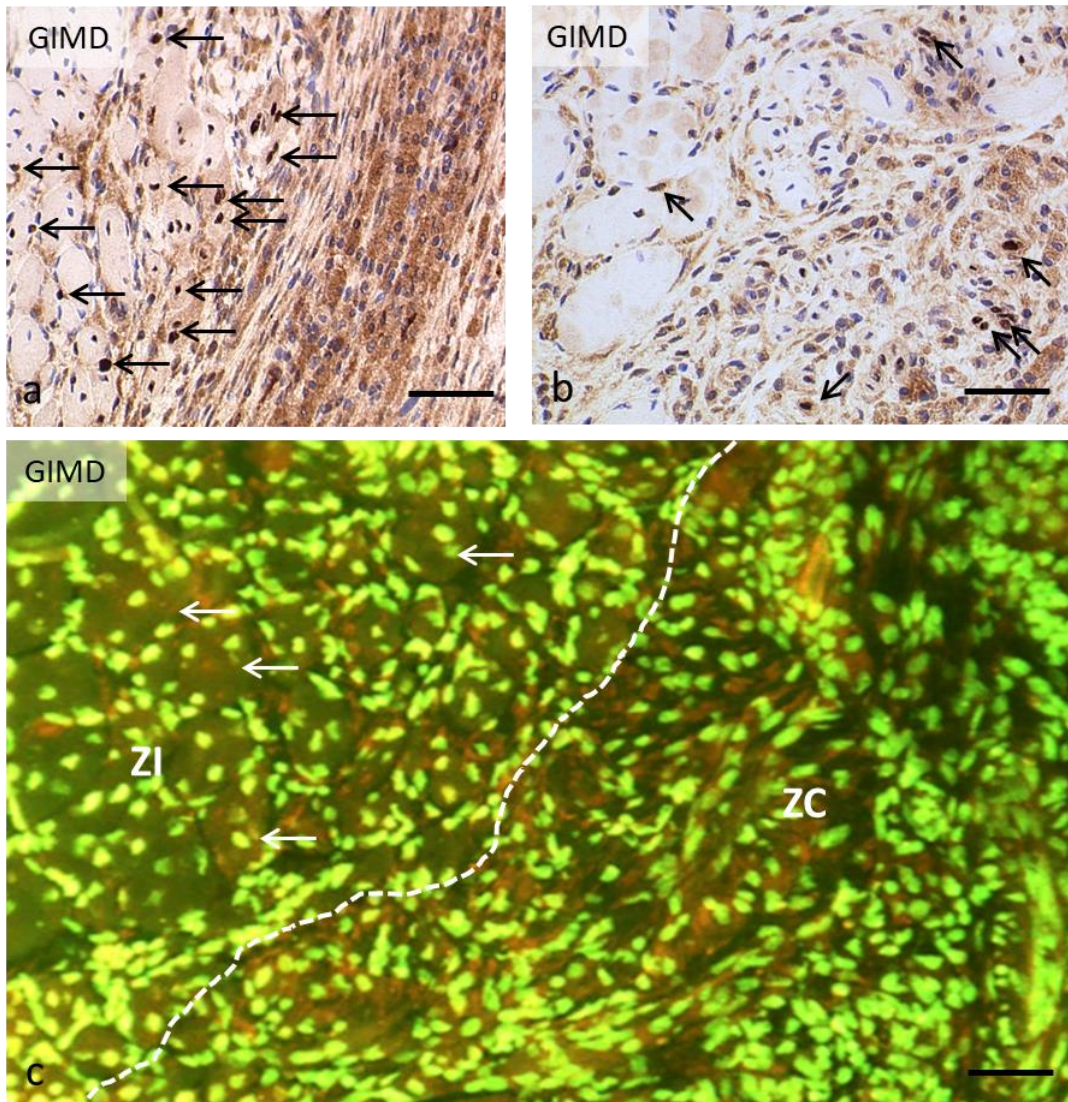


Fig. 25. Respuesta miogénica en el grupo GIMD a los 21 días: (a) Las flechas señala núcleos teñidos de negro por su positividad frente a MyoD en el interior de las fibras musculares regenerativas. (b) Ocasionales núcleos positivos para Myf4 (flechas). (c) La línea discontinua separa la ZI , ocupada por fibras musculares regenerativas y la ZC llena de abundantes núcleos. Las flechas marcan a varias fibras musculares regenerativas con una discreta fluorescencia anaranjada; el resto carece de ella. En la ZC se aprecia abundantes núcleos, unos correspondientes a células fusiformes con citoplasma anaranjado (probablemente fibroblastos) y otros de morfología más redondeada sin citoplasma fluorescente (probablemente células inflamatorias). Anti-MyoD [a]; Anti-Myf4 [b]; AO [c]. Barras de escala: 30 μ m (a,b); 120 μ m [c].

En el grupo GIFA, la respuesta regenerativa en la ZI fue similar a la descrita con las anteriores técnicas empleadas (Fig. 26 a, c, d). Ocasionalmente, algunas células desmina+ fueron reconocidas en la ZC junto a restos del implante (Fig. 26 b). La tinción con AO no reveló fibras musculares regenerativas con actividad de síntesis.

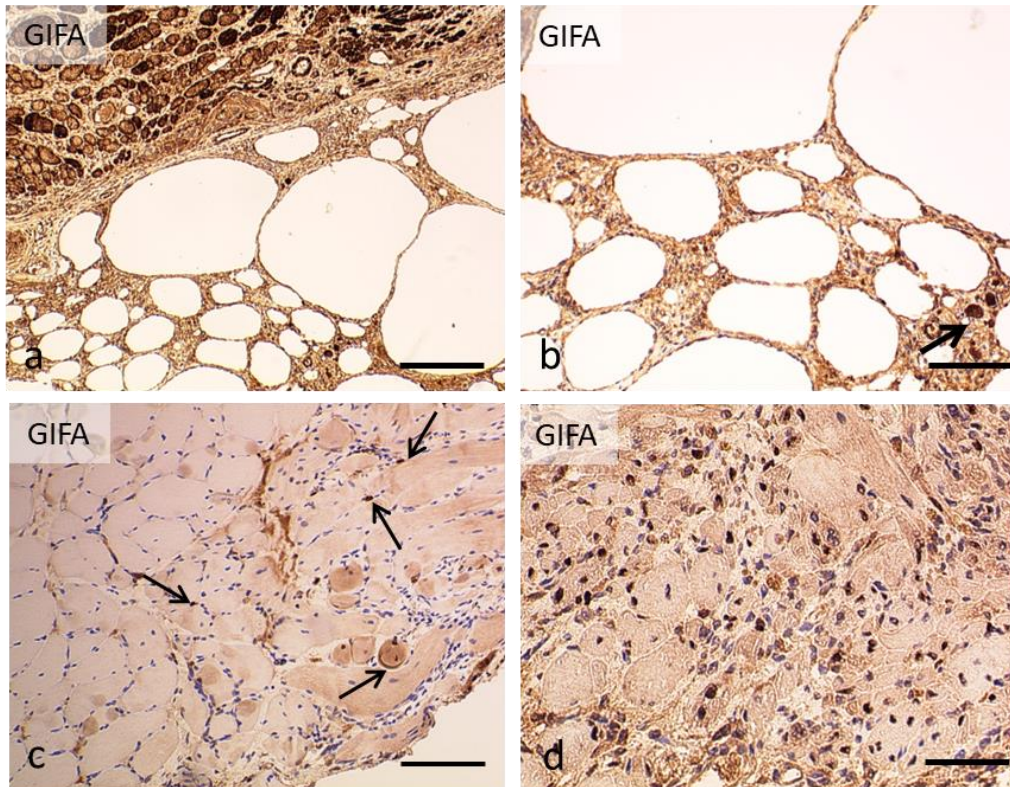


Fig. 26 Respuesta miogénica en el grupo GIFA a los 21 días: (a) Imagen a bajo aumento en la que se observan dos zonas claramente diferentes: la ZS en la parte superior ocupada por fibras musculares con una fuerte tinción frente a desmina. (b) ZC: Detalle de la imagen anterior en la que se observan dos pequeñas células marcadas con desmina. (c) ZI: las flechas marcan núcleos positivos para Myf4. (d) ZI: abundantes núcleos teñidos de negro por su positividad frente a MyoD. Anti-desmina [a,b]; Anti-Myf4 [c]; Anti-MyoD [d]. Barras de escala: 120 μ m (a); 100 μ m (b), 30 μ m (c, d).

Tabla 2. Respuesta miogénica a los 21 días en las zonas intermedia y central en los diferentes grupos.

Grupos		Fibras/células desmina+	Núcleos MyoD+	Núcleos Myf4+	Fibras con fluorescencia anaranjada
GCR	ZI	-	-	-	-
	ZC	-	-	-	-
GCN	ZI	++	++	+	+
	ZC	-	-	-	-
GTAA	ZI	+++	+++	+++	+++
	ZC	++	++	++	++
GIOS	ZI	++	++	+	++
	ZC	-	-	-	-
GIMD	ZI	++	++	+	+
	ZC	-	-	-	-
GIFA	ZI	+	+	+	+
	ZC	-	-	-	-

GCR: grupo control regenerativo; GCN: grupo control negativo; GTAA: grupo de trasplante de tejido adiposo autólogo; GIOS: grupo de implante de osteovit®; GIMD: grupo de implante de matriz descelerizada; GIFA: grupo de implante de fibrina-agarosa.

ZI: zona intermedia; ZC: zona central

-: ausencia; +: pocas o aisladas células o núcleos; ++: número moderado o pequeños grupos de células o núcleos; +++: gran número o grandes acúmulos de células o núcleos

A los 28 días

En este periodo de tiempo, los músculos de los distintos grupos presentaron cambios microscópicos indicativos bien de una mayor o menor regeneración o de un bloqueo de la misma. Así, en el grupo GCR, los músculos mostraron unas características histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas similares a las mostradas a los 21 días. En el grupo GCN, la fibrosis estaba completamente instaurada en el área de lesión.

En el grupo GTAA, la zona de lesión VML estaba ocupada prácticamente por tejido muscular esquelético, salvo en algunas áreas donde se observó incremento de tejido conectivo. Sin embargo, las fibras musculares se encontraban en muchos campos desorientadas y con dificultad para diferenciar tipos de fibras (Fig. 27). Las nuevas fibras musculares mostraban variaciones en su tamaño y morfología.

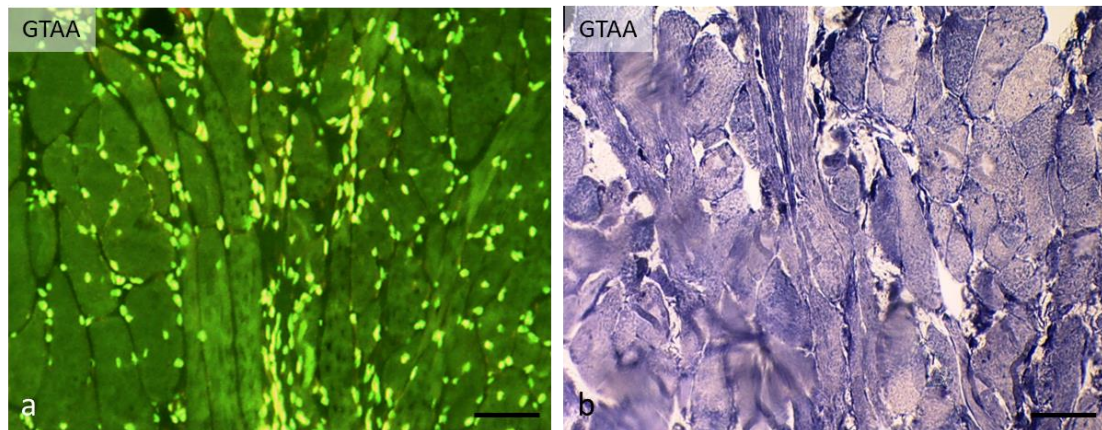


Fig. 27. Grupo GTAA a los 28 días: (a) Campo microscópico completamente ocupado por fibras musculares, aunque las que se disponen en el centro de la imagen, están claramente seccionadas longitudinalmente indicando un problema de orientación. No se observa fluorescencia anaranjada. (b) Fibras musculares desorientadas, de calibre diferente y con dificultad para diferenciar los tipos de fibras. AO [a]; NADH-tr [b]. Barras de escala: 100 µm (a,b).

En el grupo GIOS, en la ZC, persisten restos de Osteovit®, fibras pequeñas de núcleos internos junto con una pequeña respuesta inflamatoria e incremento del tejido conectivo (Fig. 28 a). Por el contrario, en la ZI se pudieron ver grupos de muy pequeñas fibras, no basófilas y muy acidófilas. Entre estas fibras muy atroficas no fue posible la diferenciación en tipos histoquímicos (Fig. 28 b). En la ZC no se vieron fibras musculares regenerativas y/o neoformadas, pero sí abundantes células positivas frente a vimentina (Fig. 27c).

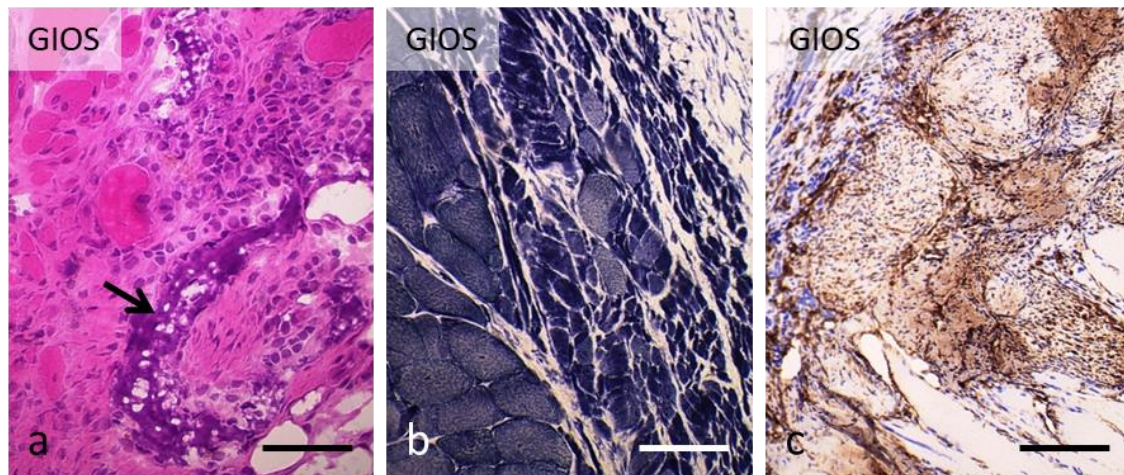


Fig. 27. Grupo GIOS a los 28 días: (a) La flecha marca restos del material implantado, inmerso en una matriz fibrótica en la que se identifican células inflamatorias y algunas fibras regenerativas con núcleos centrales. (b) ZI ocupada por fascículos de fibras atróficas sin diferenciación de tipos histoquímicos. (c) Una banda fibrótica ocupa la ZI separando las fibras musculares de la ZS en la parte inferior. H-E [a]; NADH-tr [b]; Vimentina [c]. Barras de escala: 100 μm (a,b); 150 μm (c).

En el grupo GIMD, la ZC se encuentra repleta de células inflamatorias donde destacan macrófagos y células gigantes de Langhans (Fig. 28 a,b) junto con la aparición de fibroblastos (Fig. 28 c).

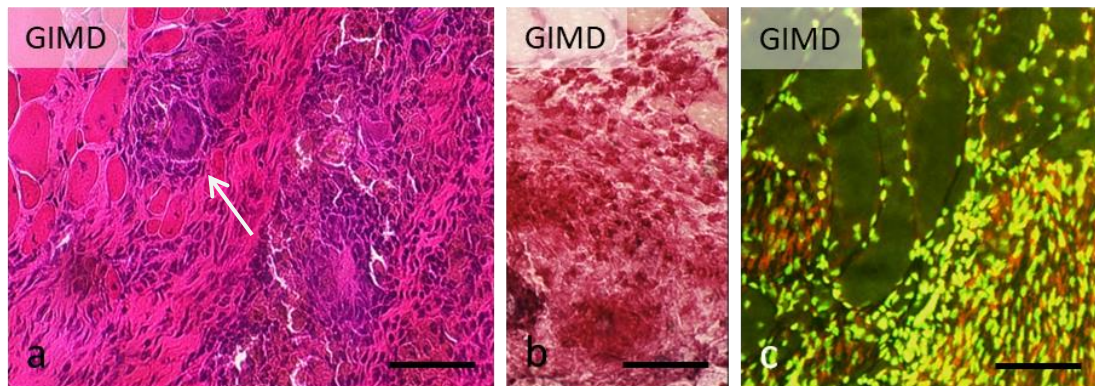


Fig. 28 Grupo GIMD a los 28 días: (a) Importante reacción inflamatoria entre la que destacan dos células gigantes de Langhans (flecha), junto a un grupo de fibras regenerativas. (b) Importante presencia de macrófagos identificados por su actividad fosfatasa ácida. (c) En la zona inferior de la imagen se ven abundantes núcleos correspondientes a células inflamatorias y fibroblastos. H-E [a]; Fosfatasa ácida [b]; AO [c]. Barras de escala: 50 μm (a-c).

En el grupo GIFA, el biomaterial implantado había quedado perfectamente delimitado del tejido muscular circundante (Fig. 29 a). Las fibras musculares inmediatamente adyacentes presentan núcleos centrales o internalizados, indicando que se trata de fibras musculares regeneradas del borde de la lesión (Figs. 29 b-c). La zona de implantación está constituida por una gran masa de macrófagos en cuyo espesor se localizan estructuras más o menos redondeadas de material granular con

zonas basófilas y eosinófilas; rodeando a estas estructuras se disponen células fusiformes (Fig. 29 d).

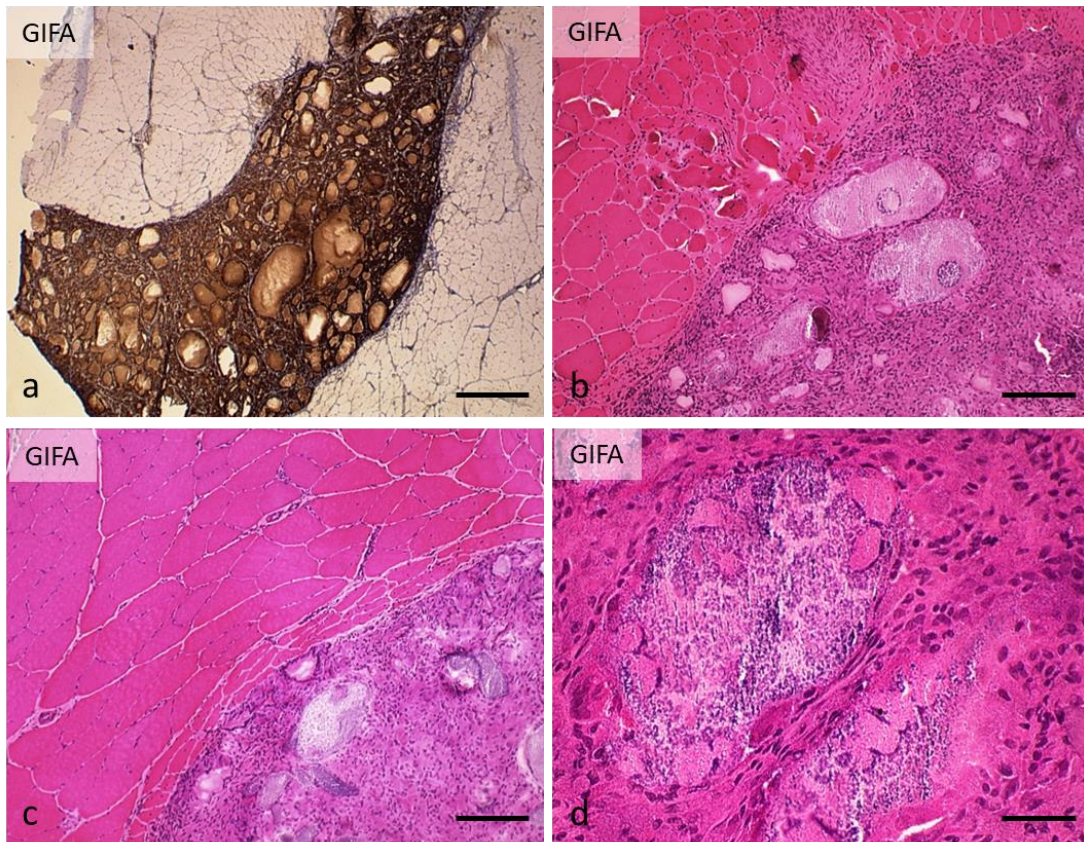


Fig. 29. Grupo GIFA a los 28 días: (a) Imagen a bajo aumento en la que se ve claramente la zona de implantación conteniendo una masa en la que destaca su fuerte positividad frente a vimentina junto con la presencia de áreas lacunares. El territorio muscular que rodea el implante no muestra ninguna tinción. (b) Las fibras que bordean la zona de implantación tiene rasgos regenerativos ya que presentan núcleos centrales o internalizados. En la zona del implante un abundante infiltrado inflamatorio rodea a las áreas lacunares que contienen un material granular basófilo y restos eosinófilos. Vimentina [a]; H-E [b-d]. Barras de escala: 250 μm (a), 100 μm (b-c), 30 μm .

A los 60 días

En la figura 30 se comprueba que mientras los músculos del grupo GCR son similares a los del grupo GC, el resto muestran ciertas diferencias con ambos, especialmente en la zona media o vientre muscular donde se realizó la lesión VML y la posterior implantación o trasplante. En el grupo GCN destaca una depresión de la superficie. En los músculos de los grupos GTAA y GIOS el aspecto es normal, aunque quedan restos de adherencias al tejido subcutáneo. Los músculos del grupo GIMD presentaron una superficie irregular amplia y en el caso del grupo GIFA el implante

claramente no había sido integrado permaneciendo una masa amarillenta redondeada ligeramente elevada en la superficie.

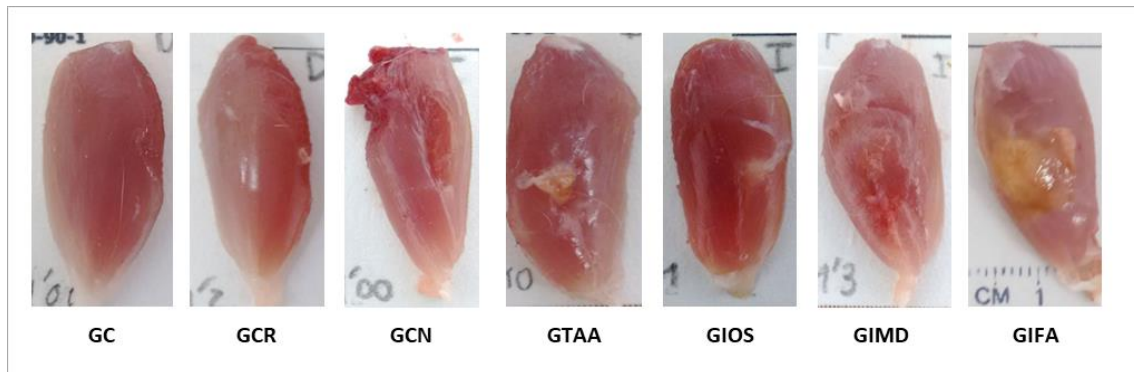


Fig. 30. Aspecto macroscópico de los músculos tibial anterior correspondientes a los diferentes grupos a los 60 días.

Desde un punto de vista histológico en el grupo GCR y GCN las lesiones evolucionaron, como era esperado, hacia la regeneración completa y hacia la fibrosis respectivamente. La evolución de los distintos tejidos/biomateriales empleados para reconstruir el defecto provocado por la lesión VML fue diferente en cuanto a las características del nuevo tejido muscular (a excepción del grupo GIFA). En la Tabla 3 y figura 31 se recogen las características histomorfológicas del neo-músculo formado en los distintos grupos.

En el grupo GCR, los rasgos histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos de los músculos son prácticamente normales, a excepción de las centralizaciones o internalizaciones nucleares (Fig. 32) y algunos cambios mínimos (Tabla 3).

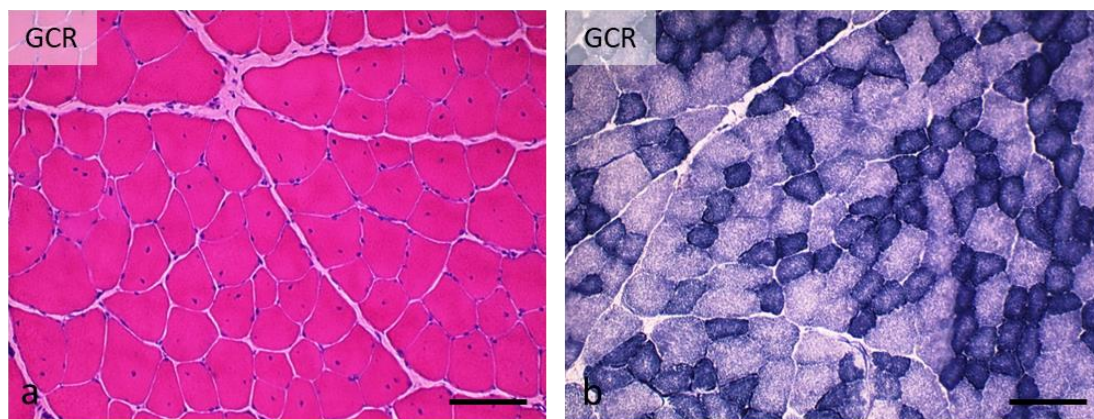


Fig. 32. Grupo GCR a los 60 días. (a) Sección transversal en la que se observan fascículos de fibras musculares de contornos redondeados o poligonales con núcleos internos. (b) Sección transversal con "patrón en mosaico" en la que se aprecia una normal distribución de los tipos de fibras. H-E [a]; NADH-tr [b]. Barras de escala: 100 μ m (a, b).

Tabla 3. Características histomorfométricas del neomúsculo formado en el espesor de la lesión VML con el tejido/biomaterial empleado tras 60 días de evolución.

Grupo	Fibrosis (%)	Número de fibras musculares/área	Área transversal de las fibras musculares	Diámetro menor de las fibras musculares	Fibras musculares con núcleos internos (%)	Número de fibras musculares desorientadas (%)
GN	2.89±0.25	14.8±0.7	3.400,6±184,4	50.4±2.0	4.2±1.63	0.0±0.0
GCR	5.80±0.52 *	14.8±0.4	3.514,8±153,8	49.08±1.8	68.8±3.4 *	0.9±0.1 *
GCN	74.33±3.49 * †	7.0±0.6 * †	1505,7±207,4 * †	31.4±1.3 * †	39.6±3.3 * †	3.2±0.9 * †
GTAA	19.57±3.47 * † §	16.8±0.7 §	2385.0±241.0 * † §	29.8±1.2 * †	62.3±5.1 * §	23.9±3.0 * † §
GIOS	30.65±2.58 * † § #	71.0±19.0 * † §	536.2±41.0 * † § #	17.4±2.2 * † § #	42.8±4.7 * † #	20.5±4.8 * † §
GIMD	67.7±5.78 * † # †	10.1±1.2 * † # †	1536.8±159.8 * † # †	27.5±1.9 * † †	48.7±5.1 * † #	39.2±7.23 * † § # †
GIFA	-	-	-	-	-	-

Todos los valores son expresados como X ± SEM. * P<0.05 vs grupo GN; † P<0.05 vs grupo GCR; § P<0.05 vs grupo GCN; # P<0.05 vs grupo GTAA; ‡ P<0.05 vs grupo GIOS

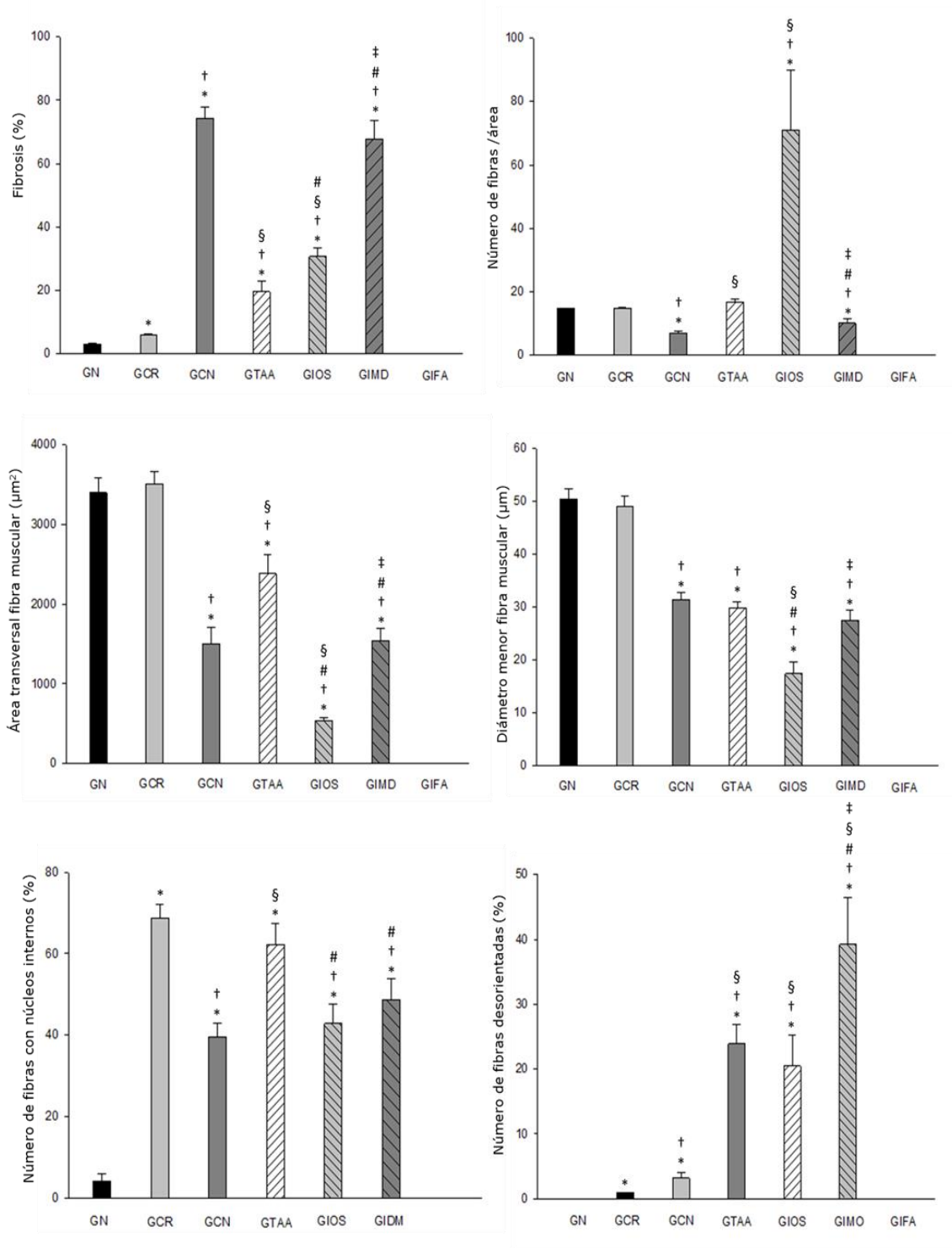


Fig. 31. Representación gráfica de los resultados histomorfométricos a los 60 días. * $P < 0.05$ vs grupo GN; † $P < 0.05$ vs grupo GCR; ‡ $P < 0.05$ vs grupo GCN; § $P < 0.05$ vs grupo GTAA; ¶ $P < 0.05$ vs grupo GIOS

En el grupo GCN el 74% del defecto muscular fue sustituido por tejido fibroadiposo (Fig. 33). El escaso número de fibras formadas estuvo relegada al borde de la lesión, siendo de pequeño tamaño, aunque algunas con núcleos internos (Tabla 3).

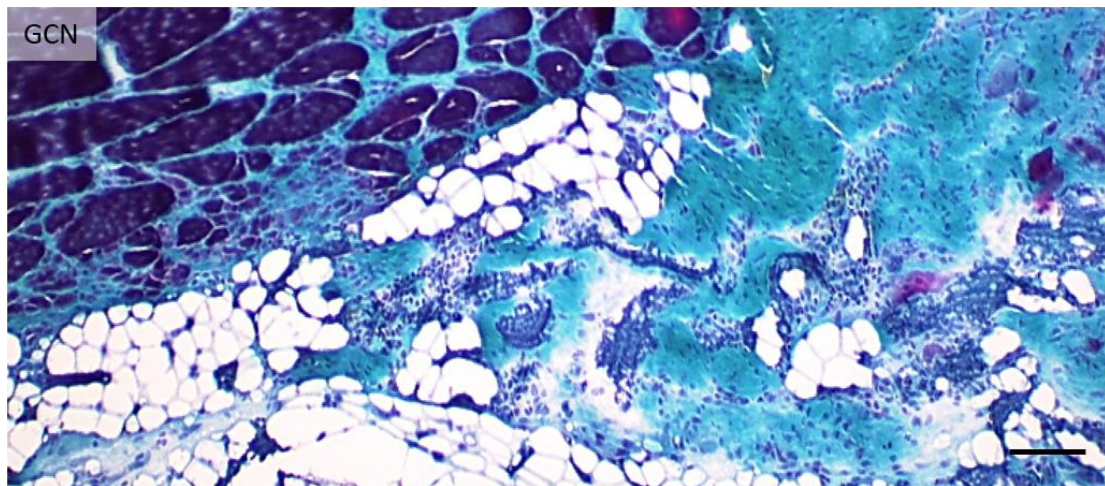


Fig. 33. Grupo GCN a los 60 días. La lesión VML ha sido ocupada por tejido fibro-adiposo y persisten algunos focos inflamatorios. TGM. Barra de escala: 100 μ m.

En el grupo GTAA, el defecto muscular provocado por la lesión quedó mayoritariamente sustituido por tejido muscular esquelético (Fig. 34), siendo el porcentaje de fibrosis de un 20%. El neo-músculo formado mostró variaciones en cuanto a la orientación y al tamaño de las fibras, observándose unas de gran tamaño y otras claramente atróficas, todas ellas con núcleos centrales o internos (Fig. 34) (Tabla 3).

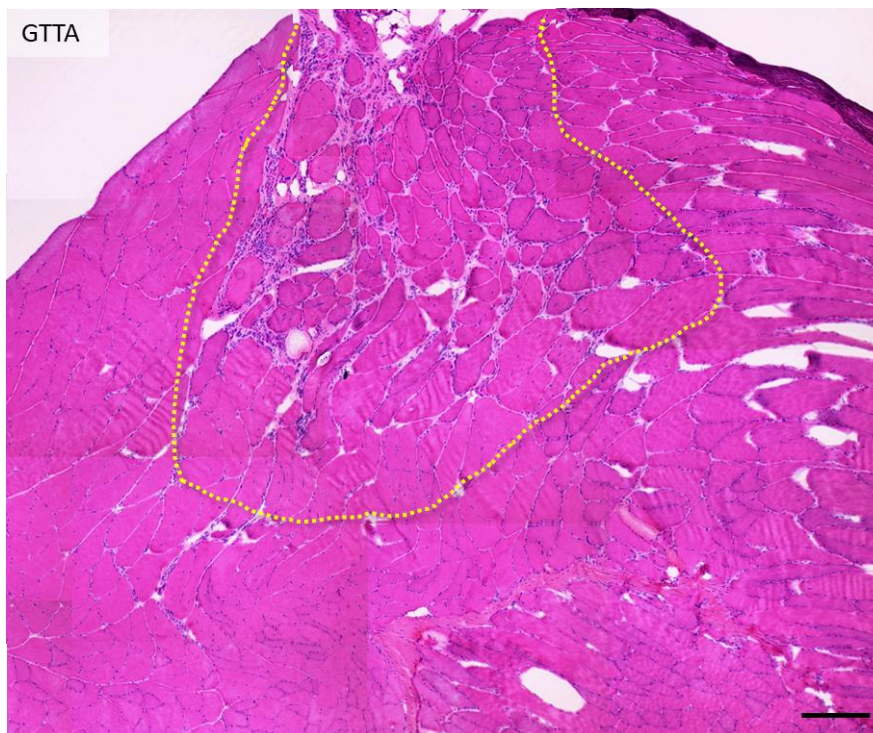


Fig. 34. Grupo GTAA a los 60 días. En esta imagen a bajo aumento, la línea discontinua delimita, aproximadamente, el territorio ocupado por el neomúsculo siguiendo el criterio de la presencia de fibras musculares con núcleos internos o centralizados. Observese los rasgos histológicos que caracterizan a las nuevas fibras musculares y a su organización. H-E. Barra de escala: 100 μ m.

En el grupo GIOS, la fibrosis alcanzó aproximadamente el 31%. Sin embargo, si bien la implantación de Osteovit® no impidió la formación de nuevas fibras musculares, estas presentan, en su mayoría, características histológicas e histomorfométricas de atrofia por denervación (Figs. 35 a,b). En el espesor del tejido conectivo se muestran fascículos completos de fibras atroficas, que en algunos casos coexisten con fibras muy grandes (sugestivas de reinervación). En algunas zonas donde la reinervación de las fibras musculares regenerativas no se vio impedida, las fibras alcanzaron su madurez aunque mostrando algunas anomalías citoarquitecturales (Figs. 35 c,d).

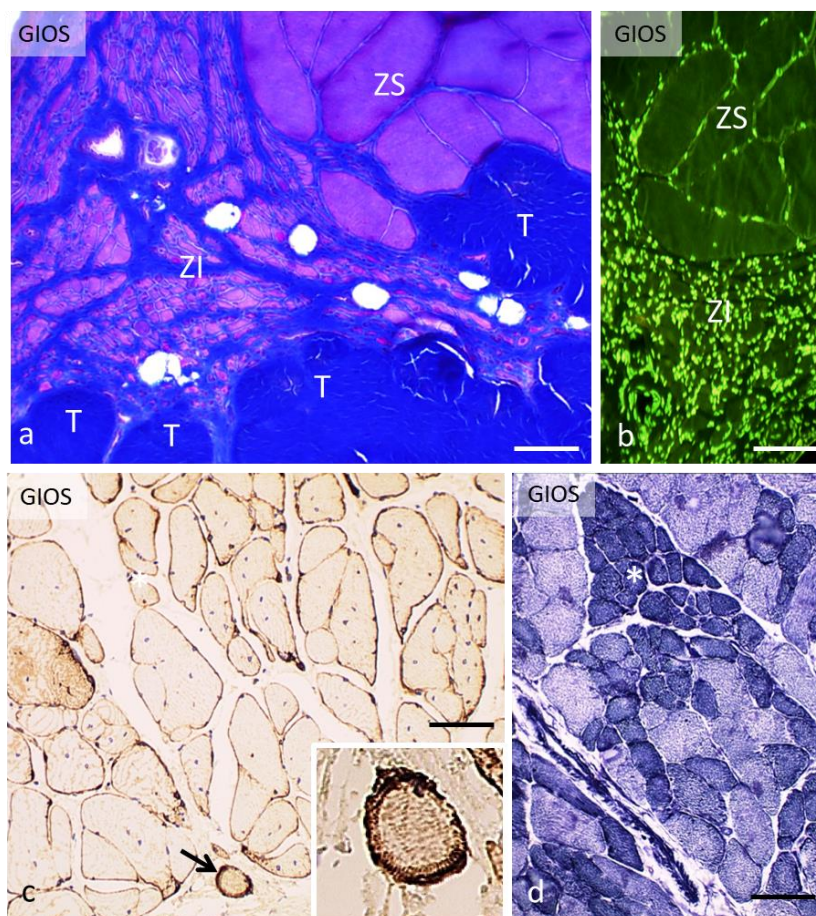


Fig. 35. Grupo GIOS a los 60 días: (a) En comparación con la ZS en la que se ven fibras musculares de un tamaño aparentemente normal, la ZI está ocupada por muchos fascículos de fibras musculares completamente atroficas. Los tabiques perimisiales que separan a estos fascículos se encuentran notablemente incrementados en tamaño como consecuencia de la fibrosis (en la que se intercalan algunos adipocitos). En la parte inferior y derecha de la imagen se observan 4 tendones (T) seccionados transversalmente. (b) Las fibras musculares atroficas de la ZI no presentan fluorescencia anaranjada al igual que las aparentemente normales adyacentes de la zona superviviente (ZS). (c) Imagen tomada de la ZS en la que las fibras musculares muestran núcleos internos y una morfología en la que destacan cierta irregularidad en los contornos y abundantes fibras rajadas. En la parte inferior la flecha señala una fibra en anillo. Inserto: detalle a mayor aumento de la misma. (d) Sección transversal en la que se muestran agrupamientos de un mismo tipo histoquímico. Tricrómico de Masson [a]; AO [b]; Anti-desmina [c]; NADH-tr [d]. Barras de escala: 50 μ m (a-d).

En el grupo GIMD, la implantación de la matriz descelsularizada evolucionó hacia una importante fibrosis (68%), siendo el número de fibras neoformadas muy escaso y de pequeño tamaño y, generalmente, desorientadas (Fig. 36 a) (Tabla 3). En el espesor del tejido fibro-adiposo se encuentran focos de células inflamatorias y células de Langhans (Fig. 36b-c)

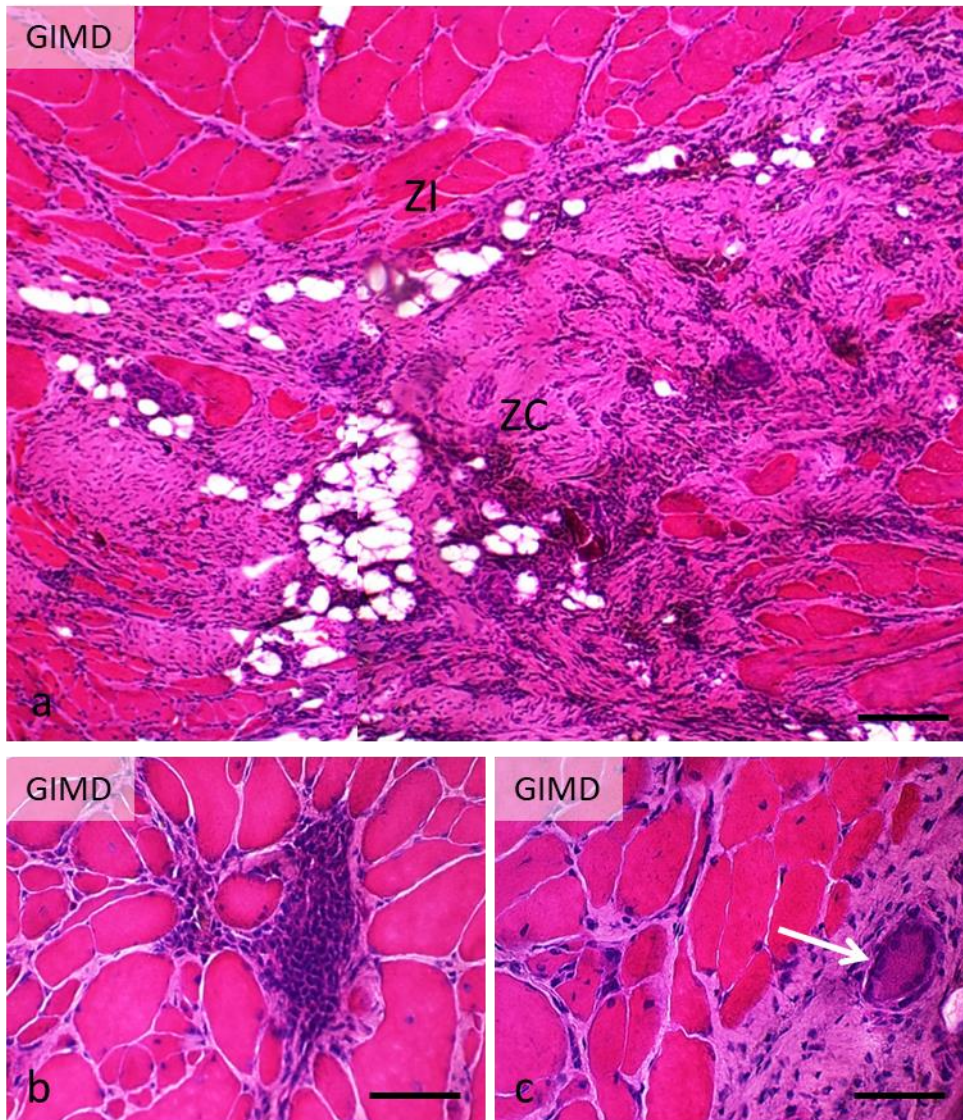


Fig. 36. Grupo GIMD a los 60 días. (a) Imagen a bajo aumento en la que se comprueba como el área de implantación (ZC) está ocupada por tejido fibro-adiposo, con acúmulos de células inflamatorias y algunas fibras musculares aisladas. En la ZI se ven fibras musculares con núcleos internos de tamaño variable y con una orientación irregular. (b) acúmulo de células inflamatorias rodeadas por algunas pequeñas fibras con núcleos centrales. (c) La flecha marca una célula de Langhans en el espesor del tejido conjuntivo. H-E. Barras de escala: 100 μ m (a), 50 μ m (b).

En el grupo GIFA, el área de implantación dio lugar a una reacción a cuerpo extraño impidiendo la formación de neo-músculo y creando una cápsula fibrosa envolvente (Fig. 37).

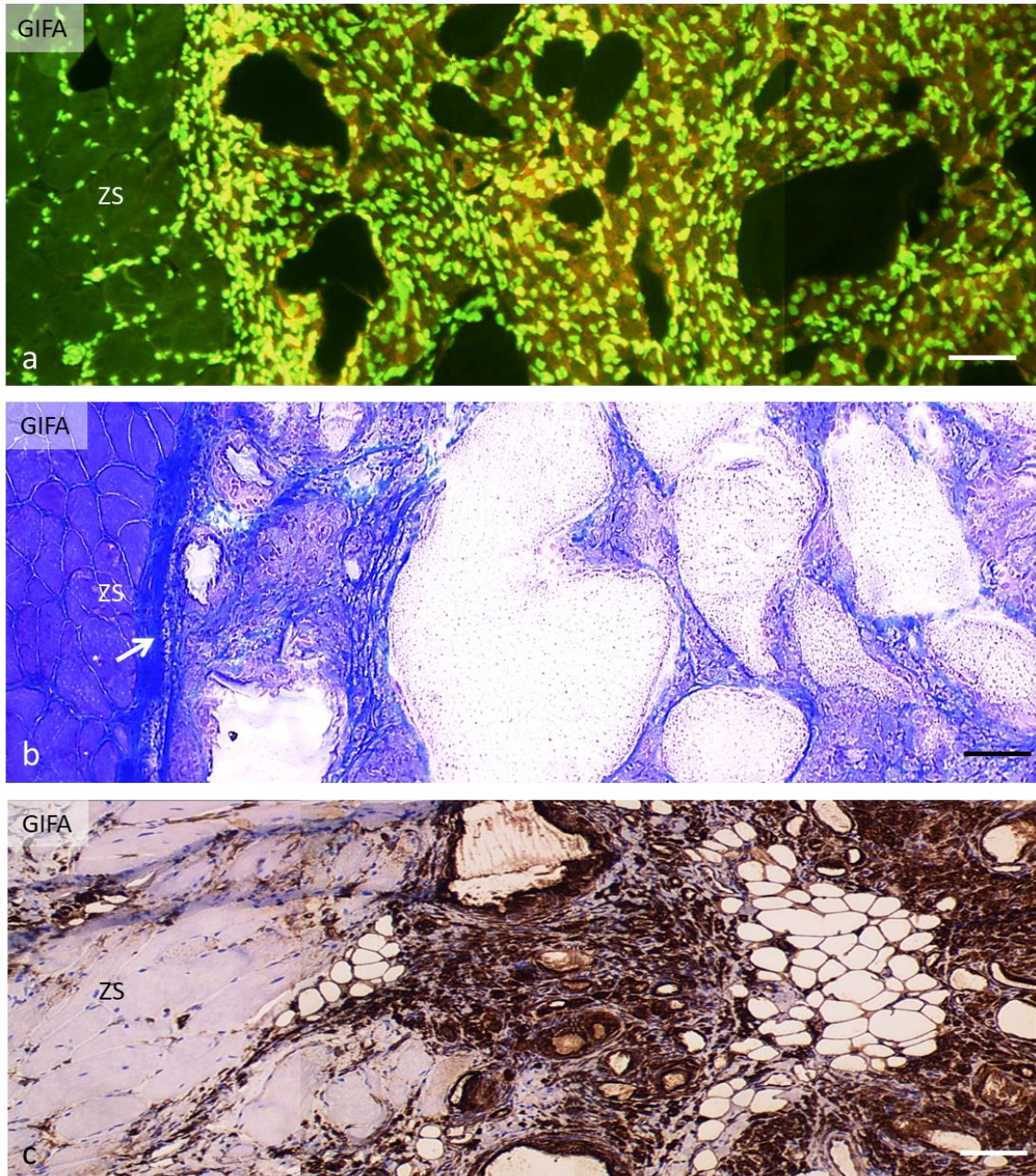


Fig. 37. Grupo GIFA a los 60 días: (a) Mientras que el aspecto de las fibras musculares es normal en la ZS, el resto de la zona de implantación está ocupado por áreas lacunares rodeadas por abundantes núcleos correspondientes a la respuesta inflamatoria a cuerpo extraño generada. (b) Obsérvese la cápsula de tejido conjuntivo (flecha) generada entre la ZS de fibras musculares y el área ocupada por los espacios quísticos y la reacción inflamatoria. (c) En la ZS se pueden observar las fibras musculares aparentemente normales y a la derecha la reacción a cuerpo extraño generada en la que se incluye la formación de tejido adiposo. AO [a]; tricrómico de Masson [b]; Anti-vimentina [c]. Barras de escala: 100 μ m (a-c).

Resultados ecográficos

El análisis ecográfico de los músculos tibiales de ratas normales del grupo GN mostró una ecogenicidad y ecoestructura normal (Fig. 38) consistente en fibras musculares hipoecoicas entre las que se disponen septos fibrosos y fascias ecogénicas. En el eje longitudinal la ecoestructura normal del músculo consiste en un fondo de bandas relativamente hipoecoicas que corresponden a las fibras musculares, entre las que se disponen numerosas bandas lineales hiperecoicas que corresponden a los septos fibroadiposos (perimisio). En el eje transversal se vuelve a apreciar dicho fondo hipoecoico (fibras musculares) con presencia de numerosos puntos y pequeñas líneas hiperecoicas (perimisio) intercaladas y de disposición desorganizada, que le otorga un aspecto en “cielo estrellado”. La fascia muscular (epimisio) se aprecia en ambos ejes como una banda lineal hipercoica bien definida que envuelve al músculo predominantemente hipoecoico. Mediante Doppler se identifican pequeños vasos de forma aislada en relación con el tejido conectivo circundante a las fibras musculares en condiciones normales.

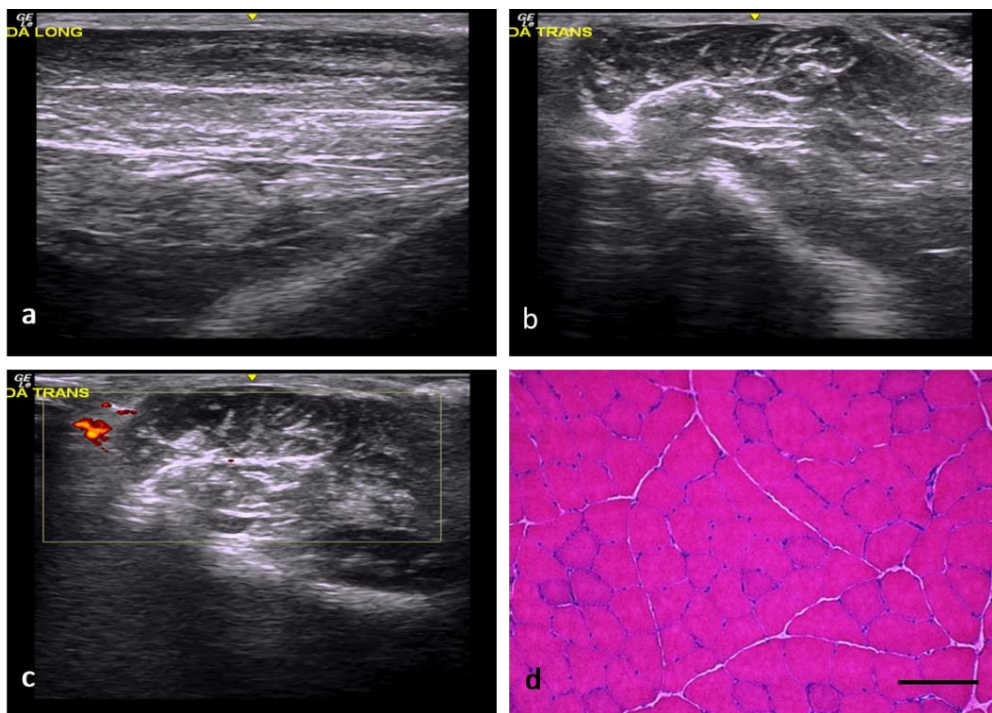


Fig. 38. Grupo GN. (a) Ecoestructura muscular normal en el eje **longitudinal**, consistente en un fondo hipoecoico con presencia de numerosas líneas hiperecoicas correspondientes a los septos fibroadiposos (perimisio). (b) Ecoestructura normal del músculo en el eje **transversal**, con fondo predominantemente hipoecoico con pequeñas líneas y puntos hiperecoicos intercalados correspondientes al perimisio. (c) Corte transversal empleando **Doppler de potencia** donde se detecta escasa vascularización en relación con el tejido conectivo circundante. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 µm.

En el grupo GCR fue identificada el área de lesión, aunque los bordes eran imprecisos y mal delimitados, con ecoestructura ligeramente distorsionada, ecogenicidad algo elevada y un moderado aumento de la vascularización (Fig. 39). En el grupo GCN la lesión era de morfología angulosa, bien delimitada y mostraba incremento de la ecogenicidad, con ecoestructura claramente distorsionada y un leve aumento de la vascularización (Fig. 40).

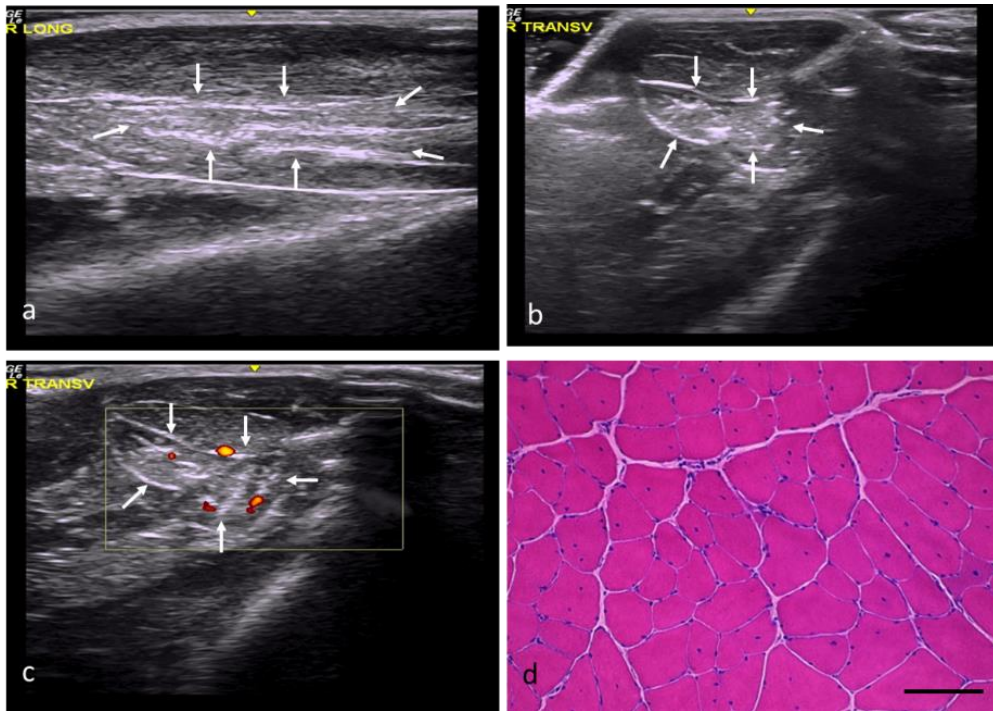


Fig. 39. Grupo GCR. Cortes ecográficos (a) Corte **longitudinal**, donde se aprecia lesión levemente hiperecoica en relación con el tejido muscular adyacente, con distorsión del patrón fibrilar, delimitada por flechas blancas (b) Corte **transversal**, donde la lesión muestra leve aumento de la ecogenicidad y unos contornos mal delimitados, acotada por flechas blancas (c) transversal con **Doppler** donde se observa moderado aumento de la vascularización perilesional. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 μ m.

En los grupos experimentales la lesión fue identificada ecográficamente, con bordes bien delimitados, pero de morfología variable desde redondeada y angulada hasta parcheada. No hubo un patrón diferenciador evidente entre los grupos. La ecogenicidad también se encontraba aumentada en todos, aunque en el grupo GIFA la lesión mostraba zonas internas hipoeoicas. Se apreció distorsión leve de la ecoestructura en el grupo GTAA (fig. 41), importante en los grupos GIOS (fig. 42) y GIMD (fig. 43) y moderada en el grupo GIFA (fig. 44). En todos los grupos la ecografía con Doppler color no demostró cambios significativos en la vascularización de la zona de implantación.

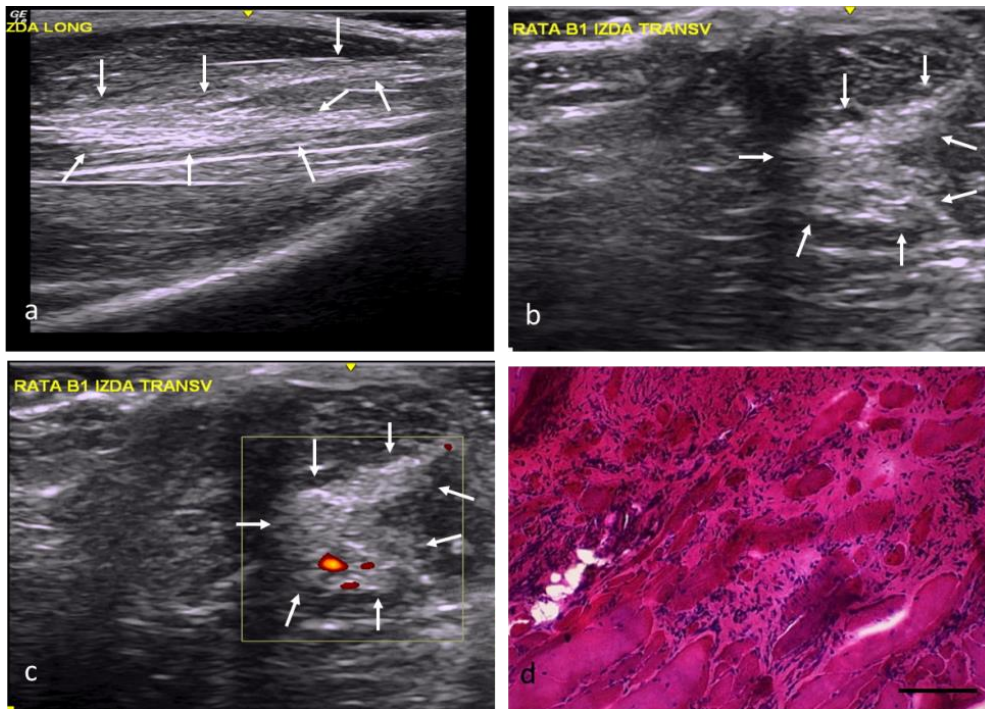


Fig. 40. Grupo GCN. Cortes ecográficos (a) En el eje **longitudinal** se identifica un área hiperecoica respecto al músculo normal con distorsión de la ecoestructura delimitada por flechas blancas, (b) En el eje **transversal** la lesión se encuentra bien delimitada, de contornos angulados y ecogenicidad aumentada. (c) Corte transversal con **Doppler** donde se aprecia aumento leve de la vascularización intralesional de predominio periférico. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 μ m.

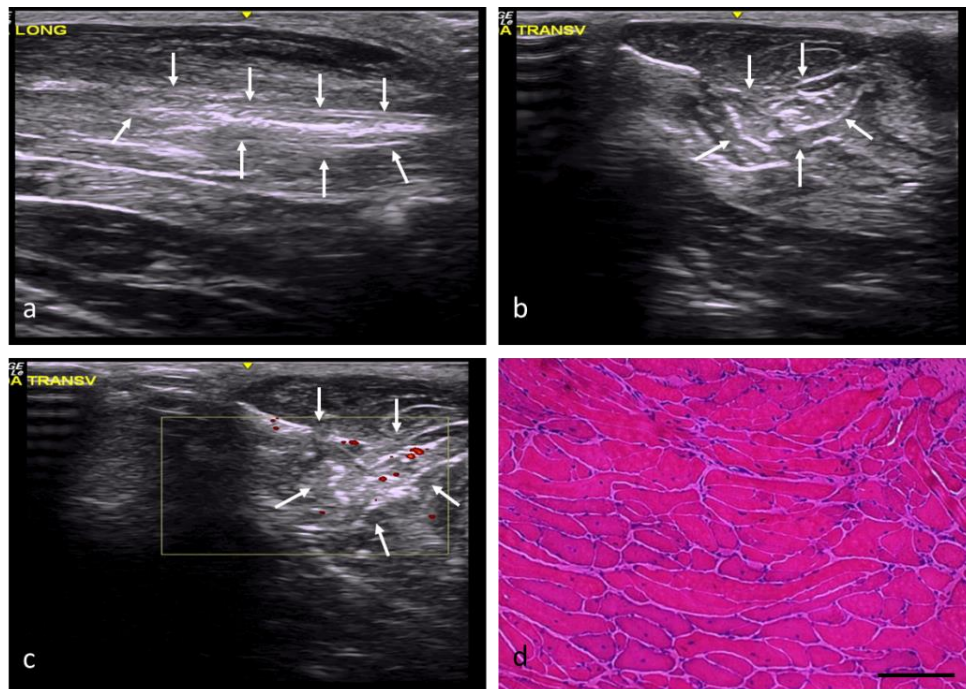


Fig. 41. Grupo GTAA. Cortes ecográficos (a) en el eje **longitudinal** donde se aprecia un área hipercoica rodeada por flechas blancas correspondiente a la lesión, de contornos mal delimitados y morfología imprecisa, con leve distorsión de la ecoestructura, (b) En el eje **transversal** la lesión muestra leve aumento de la ecogenicidad con unos bordes mal delimitados y una morfología imprecisa. y (c) Eje transversal con **Doppler** donde se aprecia leve aumento de la vascularización intralesional. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 μ m.

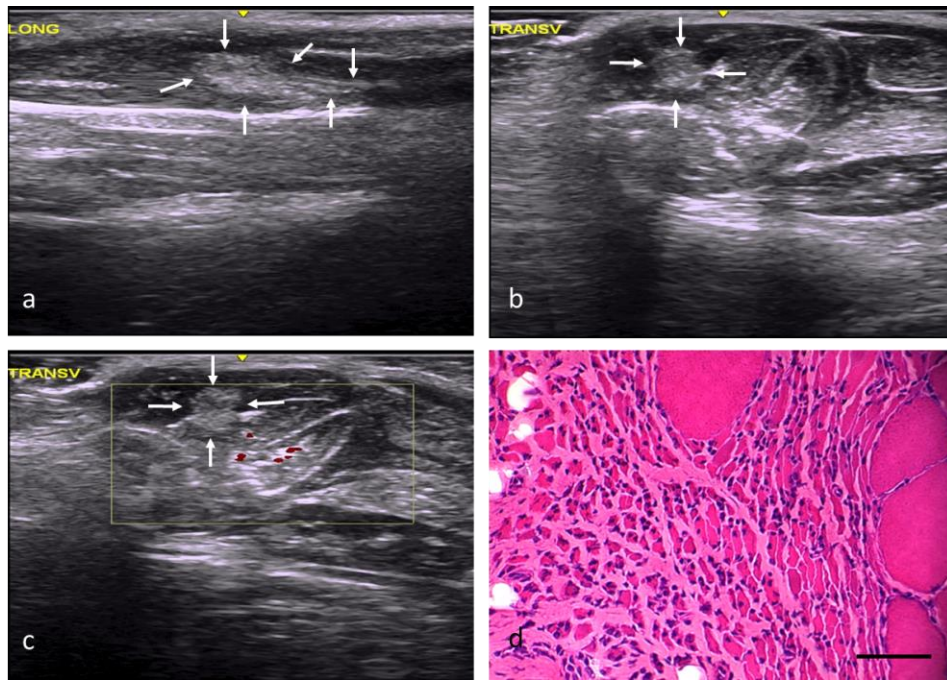


Fig. 42. Grupo GIOS. Cortes ecográficos (a) En el eje **longitudinal** donde se aprecia una lesión bien delimitada de ecogenicidad aumentada con clara distorsión de la ecoestructura en relación al tejido adyacente, (b) En el eje **transversal** presenta una morfología ovalada de contornos bien delimitados y (c) Corte transversal con **Doppler** donde se aprecia leve aumento de la vascularización perilesional. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 μ m.

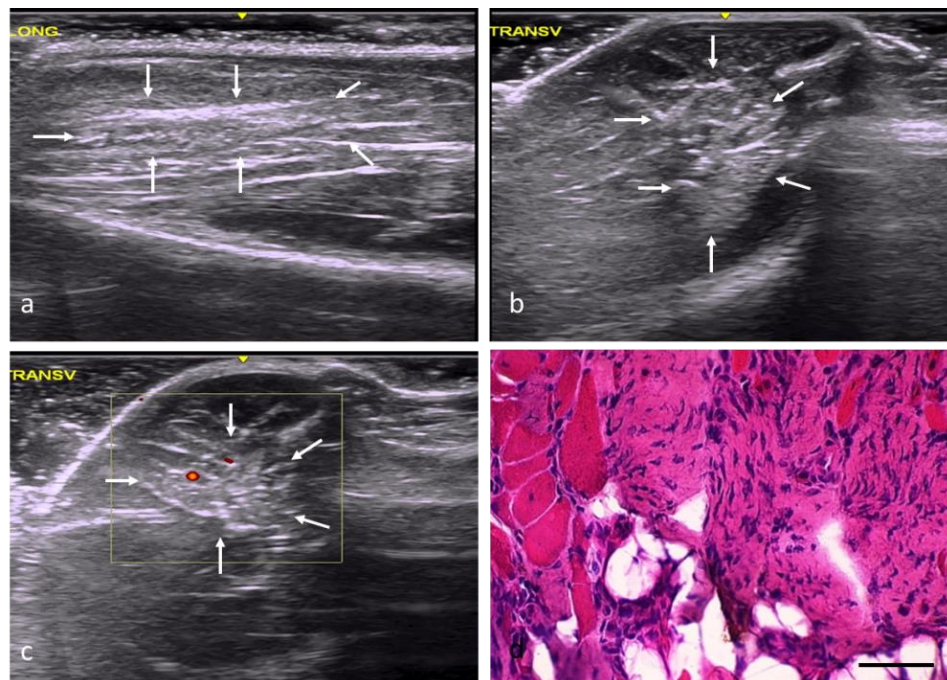


Fig. 43. Grupo GIMD. Cortes ecográficos (a) Eje **longitudinal** identificando lesión de ecogenicidad aumentada con distorsión de la ecoestructura en relación al tejido muscular adyacente, (b) Eje **transversal** donde se aprecia una lesión de morfología ovalada bien delimitada de ecogenicidad aumentada y (c) Eje transversal con **Doppler** donde se identifica leve aumento de la vascularización intralesional de predominio periférico. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 μ m.

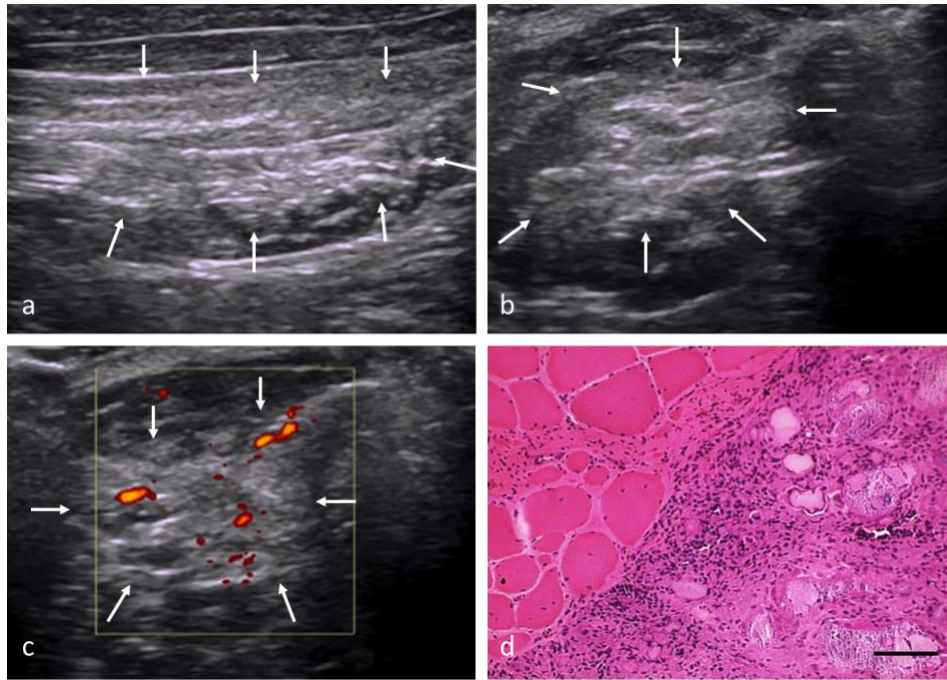


Fig. 44. Grupo GIFA. Cortes ecográficos (a) en el eje **longitudinal** apreciando lesión hiperecoica con distorsión moderada de la ecoestructura (b) En el eje **transversal** la lesión se encuentra delimitada de morfología irregular y ecogenidad aumentada y (c) Corte transversal con **Doppler** donde se aprecia aumento de la vascularización intralésional. (d) Sección transversal representativa de la histología muscular. H-E. Escala de tamaño: 100 μ m.

Tabla 4. Resumen de los hallazgos ecográficos

	Identificación de la lesión	Bordes de la lesión	Morfología de la lesión	Ecogenidad	Ecoestructura	Vascularización
GN	—	—	—	normal	normal	normal
GCR	Sí	mal delimitados	imprecisa	Levemente aumentada	Distorsión leve	Aumento moderado
GCN	Sí	bien delimitada	angulosa	Incrementada	Distorsión clara	Aumento leve
GTAA	Sí	mal delimitados	imprecisa	Incrementada	Distorsión leve	Aumento leve
GIOS	Sí	bien delimitada	Variable (redondeada, angulada o parcheada)	Incrementada	Distorsión severa	Aumento leve
GIMD	Sí	bien delimitada	Variable (redondeada, angulada o parcheada)	Incrementada	Distorsión severa	Aumento leve
GIFA	Sí	bien delimitada	Variable (redondeada, angulada o parcheada)	Incrementada con áreas hipoeicoicas	Distorsión moderada	Aumento moderado

Sobre la histología del músculo esquelético reconstruido mediante el trasplante de tejido adiposo autólogo

Sobre la histología de la lesión muscular por pérdida volumétrica mediante la implantación con biomateriales acelulares

About abnormal histological features in the neo-muscle generated in the VML lesion

Sobre la correlación ecográfica e histológica tras la reconstrucción experimental de la lesión muscular por pérdida volumétrica

Future lines of research

Sobre la histología del músculo esquelético reconstruido mediante el trasplante de tejido adiposo autólogo

Nuestras observaciones demuestran que se puede reconstruir una lesión VML mediante la implantación de tejido adiposo autólogo, ya que este tejido se reemplazó progresivamente por nuevo tejido muscular. Según nuestros resultados esto se debe a la generación de nuevas fibras musculares en el área superviviente que rodea al trasplante, así como a otras fibras que aparentemente se originan dentro del espesor del tejido adiposo. Sin embargo, en nuestro estudio, el neo-músculo formado presentó diferencias estructurales no solo con respecto al músculo esquelético normal, sino también con respecto al músculo formado mediante un proceso de regeneración normal, como en el caso de los músculos del grupo GCR. Las diferencias ya fueron evidentes a los 7 días, con un retraso en la densidad y el grado de madurez de las fibras musculares regenerativas. En fases más avanzadas, estas diferencias se reflejaron en la variabilidad en el tamaño de las fibras regenerativas, su desorientación, sus anomalías citoarquitecturales y un cierto grado de fibrosis.

Nuestro estudio confirmó la capacidad del tejido muscular para participar en la reconstrucción de la lesión VML desde los bordes de los músculos cortados, ya que la respuesta regenerativa de un músculo que se origina en las zonas supervivientes es muy poderosa. En modelos experimentales que implican trasplantes ortotópicos (Carlson, 2007), la inyección intramuscular de miotoxinas (Vignaud *et al*, 2005; Jiménez-Díaz *et al*, 2012), y lesiones por aplastamiento (Takeuchi *et al*, 2014) en las que la zona central del músculo degenera, se inicia un patrón característico de degeneración y regeneración centrípeta en el que los miofibros o fibras musculares regenerativas crecen a partir de las áreas supervivientes y logran regenerar la práctica totalidad de la lesión en 30 días. Mientras que en el grupo GCR se observó que la regeneración fue rápida y eficiente, con una reconstitución casi completa de la histoarquitectura muscular y sólo núcleos internalizados en las fibras musculares; en el grupo GTAA la histología del neo-músculo fue diferente de la observada después de la regeneración normal a lo largo de todos los períodos analizados.

Aunque los miotubos pueden penetrar en el espesor del tejido adiposo implantado desde los bordes del defecto muscular (Sato *et al*, 1992), está claro que lo hacen sin tener una lámina basal que le sirva de andamiaje o células satélite que actúen como fuente de mioblastos en el área lesionada (Corona y Greising, 2016). Esto puede justificar en parte el hecho de que las nuevas fibras musculares en el grupo GTAA mostrasen claras diferencias en comparación con las fibras musculares regenerativas del grupo GCR, ya que estos elementos permanecieron más o menos intactos en el grupo GCR (Biérinx y Seville, 2008). Las láminas basales desempeñan un papel decisivo en la promoción del crecimiento y la orientación de las fibras musculares regenerativas, los nervios y los vasos sanguíneos (Sanes, 2003), además de evitar que los fibroblastos y el colágeno interfieran con la continuidad de la fibra (Mann *et al*, 2011). La diferencia entre las características histológicas del neo-músculo formado en el grupo GTAA y las del músculo formado mediante un proceso regenerativo normal en el grupo GCR puede explicarse por la importancia de los factores reintegrativos (revascularización, reinervación y reintegración mecánica) en el proceso de regeneración muscular (Carlson, 2007; Turner y Badylak, 2012). Evidentemente, en nuestro caso, el déficit inducido en el volumen muscular resultó en una interrupción del suministro de estructuras vasculares y nerviosas, además de que la neoformación del tejido muscular en el espesor del tejido adiposo no estaba sometida a fuerzas de tensión debido a la falta de conexiones tendinosas. Según el tipo de anomalías identificadas en nuestro estudio, creemos que el entorno de déficit de tensión en el que crecieron las nuevas fibras musculares desempeñó un papel esencial en la determinación de las características histológicas del neo-músculo. Estudios anteriores han demostrado que cuando las fibras musculares en regeneración se forman en un entorno de ausencia de carga mecánica, se producen cambios citoarquitectónicos relacionados con la desorientación miofibrilar, como son la formación de fibras anulares o en anillo, fibras trabeculadas y fibras en cola de serpiente (Peña *et al*, 2001; Peña *et al*, 2005), además de favorecer la fibrosis muscular (Luque *et al*, 2002). Las fibras rajadas también se han asociado con fallos o retrasos en la fusión de los miotubos regenerativos (Eriksson *et al*, 2006) y fibras ramificadas se

han observado en la formación ectópica de músculo después de la implantación de mioblastos en la dermis (Irintchev *et al*, 1998).

Otro hallazgo notable de nuestro estudio fue la desorientación de las fibras musculares, que alcanzó una prevalencia del 24% en el grupo GTAA en comparación con solo el 0,8% en el grupo GCR. Esto ocurre en el modelo de implantación de músculo troceado o fragmentado, en el que la ausencia de conexiones tendinosas da como resultado la disposición aleatoria de las fibras musculares (Corona *et al*, 2013; Ward *et al*, 2015; Ward *et al*, 2016; Corona *et al*, 2017). La orientación paralela de las fibras musculares es un paso fundamental inducido por estímulos mecánicos, independientemente de las influencias neuronales, hormonales o eléctricas (Collinsworth *et al*, 2000; Kuthe y Uddanwadiker, 2016). Dado que las láminas basales actúan como andamios para la alineación de las nuevas fibras, su ausencia debió haber sido un factor determinante en la desorientación y las anormalidades observadas en las nuevas fibras musculares.

Nuestro estudio también puso de manifiesto las dificultades encontradas por las nuevas fibras para inervarse. La presencia de fibras con acúmulos centrales intensamente teñidas y agrupamientos de un mismo tipo histoquímico de fibras musculares está relacionada con los procesos de inervación/reinervación, mientras que la existencia de fibras atroficas (algunas con aglomeración o apelotonamientos de núcleos) en el interior de los focos de fibrosis confirma la inervación fallida de las nuevas fibras. Aunque los miotubos y las fibras regenerativas se forman en un ambiente aneural, tanto su maduración como su crecimiento fallan en ausencia de inervación (Noah *et al*, 2002). Está claro que la fibrosis está directamente involucrada en el fracaso de la inervación al crear barreras físicas que evitan que las fibras nerviosas entren en contacto con las fibras musculares (Huard *et al*, 2002; Järvinen *et al*, 2007; Turner y Badylak, 2012).

Aunque la gran capacidad regenerativa del músculo esquelético es ineficaz para recuperar espontáneamente una lesión debida a VML (Sicari *et al*, 2012) nuestros

resultados en el grupo GTAA alcanzaron una importante neoformación muscular. En nuestro estudio, aunque el porcentaje de área fibrótica en el grupo GTAA (20%) fue significativo en comparación con el grupo GN (3%) y el grupo GCR (6%), la formación de músculo en el defecto indicó que el tejido adiposo había favorecido el crecimiento de nuevas fibras musculares teniendo en cuenta que el porcentaje de fibrosis en el grupo GTAC estuvo cercano al 60%. En esto tiene un papel fundamental el hecho de que el tejido adiposo trasplantado estuviese congelado o no. La presencia en el tejido adiposo trasplantado de núcleos MyoD+, así como miotubos y células mononucleares positivas para la desmina en el grupo GTAA, fue indicativo de que células ubicadas en el tejido adiposo habrían sufrido una diferenciación miogénica. En contraste, la ausencia de marcadores miogénicos en el grupo GTAC confirmó que un tratamiento de congelación previo habría destruido las células y, por lo tanto, no podrían haber contribuido a la formación de nuevas fibras musculares, favoreciendo la fibrosis. La expresión de estos marcadores permite la identificación de precursores de células miogénicas en los procesos de neoformación y regeneración muscular (Agüera *et al*, 2019).

Las ADSCs tienen el potencial de diferenciarse en células y tejidos de origen mesodérmico (Schäffler y Büchler, 2007; Lin *et al*, 2010; Gentile y Cervelli, 2018). Aunque no podemos determinar exactamente qué tipos de células de tejido adiposo implantadas experimentaron diferenciación miogénica, se ha observado que las ADSCs trasplantadas parecen involucrarse en el proceso de regeneración muscular (Bacou *et al*, 2004). Di Rocco *et al* (2006) encontraron que las células de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo (AT-SVF *adipose tissue stromal vascular fraction*) pueden diferenciarse hacia músculo esquelético al adoptar un fenotipo miogénico cuando se cultivan junto con mioblastos primarios. Además, un estudio *in vivo* usando un modelo experimental de isquemia ofrece evidencias de que estas células AT-SVF forman nuevas fibras musculares, y otro modelo que usa ratones *mdx* demuestra que restauran significativamente la expresión de distrofina (Bacou *et al*, 2004; Andersen *et al*, 2008). Finalmente, estos autores indican que los factores secretados por las células

miogénicas en la diferenciación son suficientes para que una subpoblación de células AT-SVF pueda expresar proteínas específicas del músculo. Hay evidencia de que las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo serían la mejor opción, en comparación con las derivadas de la médula ósea o la membrana sinovial, para contribuir a la regeneración muscular en el tratamiento de algunas miopatías con células madre mesenquimales (de la Garza Rodea *et al*, 2012).

El mecanismo íntimo de esta diferenciación miogénica probablemente esté relacionado con el microambiente tisular generado en el músculo esquelético y las relaciones intercelulares. El microambiente de cada tejido afecta al potencial de diferenciación de células troncales específicas y no específicas (Peng y Huard, 2004). La capacidad regenerativa del músculo esquelético y la respuesta de las células satélite a la lesión están significativamente determinadas por los cambios en varios factores dentro del entorno del tejido local (Jejurikar y Kuzon, 2003) que constituyen una fuente importante de señales que reclutan células hacia la miogénesis (De Angelis *et al*, 1999). Salvatori *et al* (1995) demostraron que las células troncales de diferentes órganos se diferencian hacia la línea miogénica cuando se cultivan junto con células miogénicas. Esto también ocurre *in vivo*, en cuyo caso se requiere una estrecha relación célula-célula, pero no necesariamente fusión celular. Recientemente se ha demostrado que el cocultivo de mioblastos en presencia de células neurales estimula la diferenciación y formación de miotubos, su alineación, longitud y la extensión del área cubierta por estos (Ostrovidov *et al*, 2017). En consecuencia, podríamos pensar que el crecimiento de nuevas fibras podría verse favorecido por el tejido adiposo en sí mismo debido a la creación de un entorno favorable pro-miogénico. Varios tipos de células secretan microvesículas y/o exosomas que tienen efectos funcionales y fenotípicos en otras células. En este sentido, es muy probable que los exosomas secretados por ADSC (*adipose stem cells*) (Wong *et al*, 2019), así como por las células satélite (Spinazzola y Gussoni, 2017) que residen en el músculo huésped estén involucrados en la respuesta miogénica generada después del trasplante de tejido adiposo. Además, es interesante observar que los exosomas también se secretan

durante la diferenciación de mioblastos humanos, lo que aumenta su utilidad como agente para la regeneración muscular (Choi *et al*, 2016). Curiosamente, la terapia con ADSC acelera la recuperación funcional y aumenta el número de miofibras en la regeneración, pero no detecta la diferenciación miogénica de ADSC, lo que sugiere que estas células actúan a través de mecanismos celulares paracrinos directos por factores secretados involucrados en la regeneración del músculo esquelético (Gorecka *et al*, 2018) Sin embargo, nuestras observaciones inmunohistoquímicas mostraron que las células que residen en el tejido adiposo experimentaron diferenciación miogénica. En nuestra opinión, esta contradicción puede explicarse por el hecho de que el comportamiento puede ser diferente cuando se trasplantan ADSC aisladas, que, como en el presente estudio, es tejido adiposo completo.

En nuestro estudio, la neoformación de las fibras musculares en el grupo GTAA estuvo acompañada por una importante neoformación vascular. Es un hecho bien conocido que el desarrollo de la angiogénesis es uno de los factores clave determinantes para estimular el proceso de reparación en casos de VML (Turner y Badylak, 2012), aunque el papel esencial de los vasos sanguíneos, las células inmunes e inflamatorias, los progenitores circulantes y las células residentes en el proceso de regeneración/ reparación no se conocen exactamente (Huard, 2019). La revascularización podría haber sido favorecida por el propio tejido adiposo, ya que las células del estroma derivadas del tejido adiposo tienen un potencial pro-angiogénico considerable (Schäffler y Büchler 2007). Es importante tener en cuenta que cuando las células troncales derivadas de tejido adiposo humano se implantan en combinación con haces de microfibras de fibrina en un modelo murino de VML, la reconstrucción muscular *in vivo* es muy moderada (Gilbert-Honick *et al*, 2018). Dado que en nuestro estudio el tejido adiposo fue reemplazado en gran medida por tejido muscular, sugerimos que el uso de tejido adiposo autólogo podría ser una mejor alternativa para reconstruir el VML.

En conclusión, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que (al menos desde un punto de vista morfológico), el trasplante de tejido adiposo autólogo favorece el

proceso de reconstrucción en casos de pérdida volumétrica del músculo esquelético. Aunque el tejido muscular neoformado en el área de VML tenía algunas características estructuralmente anormales, creemos que la combinación de estrategias de rehabilitación apropiadas podría ayudar a lograr una normalidad histológica y funcional en mayor grado (Gentile *et al*, 2014; Greising *et al*, 2016). Se ha encontrado que después de la implantación de bioconstructos en un VML en ratones, el ejercicio mejora la reinervación de las neofibras, aumenta la vascularización y reduce la fibrosis (Quarta *et al*, 2017). Esto es importante ya que varias de las anomalías histológicas observadas en nuestro estudio podrían reducirse. Aunque se utilizan diferentes andamiajes para la regeneración de las pérdidas volumétricas en las lesiones del músculo esquelético (Grasman *et al*, 2015; Sicari *et al*, 2015), este modelo podría ser útil para explorar otras posibilidades disponibles en la reconstrucción muscular. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar los mecanismos íntimos de la contribución miogénica del tejido adiposo a este proceso, así como el desarrollo de estrategias terapéuticas traslacionales.

Sobre la histología de la lesión VML reconstruida mediante la implantación con biomateriales acelulares.

El objetivo de este segundo experimento fue analizar si la propia capacidad regenerativa del músculo esquelético podía generar nuevo tejido muscular empleando distintos biomateriales acelulares implantados en una lesión VML inducida experimentalmente en el músculo tibial anterior de rata. Los biomateriales implantados Osteovit®, matriz descelularizada y fibrina-agarosa fueron comparados con los resultados obtenidos con el trasplante de tejido adiposo autólogo, analizado en el primer experimento.

Dado que los materiales implantados no incorporaban células, y basándonos en la gran capacidad regenerativa del músculo esquelético, la reconstrucción partiría necesariamente desde los bordes de la lesión muscular. Como hemos podido

comprobar en nuestro trabajo, a los 21 días en todos los grupos (a excepción del grupo GCR) hubo evidencia de respuesta miogénica por parte del músculo huésped mediante la expresión de los marcadores MyoD, Myf4 y desmina. En este tiempo, los músculos del grupo GCR se encuentran prácticamente regenerados, lo que explica la ausencia de marcaje. En los grupos experimentales esta actividad estuvo confinada a la ZI, a excepción del grupo GTAA en el que también la ZC, ocupada por tejido adiposo autólogo mostró positividad para marcadores miogénicos. Por otro lado, la fluorescencia anaranjada con la tinción de AO en estas fibras señaló una activa síntesis proteica en las fibras musculares, lo que está de acuerdo con otras situaciones en las que tiene lugar el crecimiento y maduración de fibras musculares (Jimena *et al*, 1998; Agüera *et al*, 2016; Agüera *et al*, 2019). En consecuencia, a los 21 días la formación y crecimiento de las fibras regenerativas en la ZI, a partir de la ZS, es activa en una VML. Además, es independiente del biomaterial implantado ya que fue similar en todos los grupos experimentales incluido el grupo GCN en el que sólo se había realizado hemostasia.

Aunque a los 28 días, todavía había evidencia de marcaje de núcleos MyoD+ y Myf4+ en las fibras regenerativas (consideradas así por su núcleo central) y fuerte tinción para desmina en muchas de ellas, ya se hizo evidente el fracaso de la reconstrucción muscular. Este dato vino sugerido especialmente por la ausencia de fluorescencia anaranjada con la tinción AO. Aunque resulta lógico que la severidad de la lesión enlentezca la respuesta regenerativa, la variabilidad de morfología y comportamientos de las fibras regenerativas con las diferentes técnicas, serían no ya la expresión de un retraso, sino la de un bloqueo al no encontrar un “territorio” favorable para su desarrollo y crecimiento. Wolf *et al* (2015) demostraron que una respuesta inflamatoria prolongada y desproporcionada, como la que puede ocurrir cuando se implanta un biomaterial xenogénico o alogénico, puede dificultar el proceso regenerativo.

La positividad en el marcaje con desmina es una característica de las fibras musculares regenerativas (Bornemann y Schmalbruch, 1992; Goebel y Bornemann, 1993; Swery y Goebel, 2013), pero el hecho de que en los grupos experimentales la

expresión no sea homogénea entre las fibras musculares regenerativas podrían indicar que estarían sufriendo cambios degenerativos. En patología muscular humana, en concreto en algunas miopatías miofibrilares (como las desminopatías), se ven fibras musculares con acúmulos desmina+ en su interior (Bornemann y Anderson, 2000; Swery y Goebel, 2013). En miopatología experimental también se han descrito fibras regenerativas que muestran cambios degenerativos con una expresión incrementada en desmina (Arce *et al*, 1991).

Lo mismo se puede plantear sobre el marcaje con MyoD y Myf4 en núcleos tanto periféricos como centrales que hemos visto en las fibras musculares regenerativas en este tiempo. La persistencia de esta positividad en los núcleos sugiere que el programa miogénico permanece activado (Zammit, 2017). Pero, en nuestra opinión, esta activación podría estar más relacionada con las dificultades de las fibras musculares regenerativas en llegar a ser inervadas por el anormal desarrollo del tejido conectivo, que era ya era claramente evidente. La reactivación de la miogénesis en la denervación (Borisov *et al*, 2001) conlleva un aumento de proteína MyoD además del incremento el número de núcleos positivos para MyoD en el músculo esquelético (Legerlotz y Smith, 2008).

Tanto el estudio histológico como el análisis ecográfico mostraron una completa regeneración en el grupo GCR coincidiendo con otros estudios previos en los que ya a los 30 días tras la inyección de mepivacaína el músculo tibial anterior queda completamente regenerado (Jiménez-Díaz *et al*, 2012). Por el contrario, el severo trauma inducido por la lesión VML evoluciona hacia la fibrosis, como se demostró en el grupo GCN en el que llegó a ser del 70%. Es conocido que cuando se pierde un 10-20% de la masa muscular, las lesiones evolucionan hacia la cicatriz fibrosa (Cholok *et al*, 2017). En nuestro modelo experimental la pérdida muscular provocada por la lesión VML, representó cerca de un 15% de la masa total del músculo tibial anterior. Sicari *et al* (2012) señalan que este tipo de lesión no cura espontáneamente, evoluciona hacia la fibrosis, aunque, al igual que en nuestro estudio, se aprecian fibras de carácter regenerativa adyacentes a la zona muscular preservada.

A diferencia de lo ocurrido en el GTAA, en los grupos GIOS, GIMD y GIFA la reconstrucción muscular fracasó, lo que fue claramente evidente en el análisis histológico, si bien presentaron diferencias entre ellos. El patrón histológico que se observa a los 60 días en los distintos grupos nos ofrece información sobre los mecanismos que han dificultado o impedido que la capacidad regenerativa pudiese reconstruir la lesión VML. Como ya se ha hecho referencia en el primer experimento, fue en el grupo GTAA donde se consiguió generar, en el defecto muscular, un nuevo tejido muscular (80%) frente a tejido conectivo (20%) por la contribución tanto de la respuesta regenerativa generada desde los bordes de la lesión como de la activación miogénica de células residentes en el tejido adiposo trasplantado.

En el caso del grupo GIOS, resulta evidente que Osteovit® facilitó inicialmente la formación de nuevas fibras musculares y, de hecho, el defecto muscular es sustituido en un 69% por tejido muscular frente al 31 % de tejido conectivo. Sin embargo, la neoformación de fibras musculares fracasó debido a que, como se deduce de los resultados obtenidos, quedaron atróficas por falta de inervación. Efectivamente las características histológicas e histoquímicas muestran un patrón severo de “atrofia por denervación”: morfología angulada, grupos de fibras atróficas en coexistencia con fibras normales e hipertróficas y fibrosis perimisial (Midrio, 2006). Este patrón fue sólo visto en el grupo GIOS y podría ser explicado por el hecho de que cuando Osteovit® se aplica en cavidades ósea es sustituido por tejido óseo, mientras que cuando se hace en tejidos blandos es sustituido por tejido conjuntivo (información comercial). Este patrón de “no inervación” de fibras regenerativas se ha visto en otros estudios y está en relación con la creación de barreras físicas por la fibrosis que impide la inervación de las fibras musculares regenerativas (Luque *et al*, 2002).

Un dato interesante fue la ausencia de “agrupamientos o bolsas mionucleares” en nuestras muestras. Estos agrupamientos son indicativos de una intensa atrofia de la fibra muscular ya que, por su carácter de célula multinucleada, la disminución del

volumen citoplasmático de la fibra muscular conlleva a la acumulación de sus núcleos (Adami *et al*, 2009). Además, la formación de fibras atroficas está ligada a la creación por la fibrosis de barreras mecánicas que restringen no sólo la propia regeneración de las fibras musculares sino también impiden la llegada de los axones que reinervan las nuevas fibras musculares (Kääriäinen *et al* 2000; Järvinen *et al* 2007). Todo ello sugiere que las nuevas fibras quedaron hipotróficas al no llegar a ser inervadas en el período entre 21 y 28 días, puesto que en el primero no mostraron los rasgos de atrofia por denervación que si fueron evidentes a los 28 días.

En el grupo GIMD, nuestros resultados ponen de manifiesto que la matriz descelularizada no favoreció la respuesta regenerativa del músculo y la lesión VML fue ocupada por una cicatriz de tejido fibroadiposo. Además, nuestros resultados confirman lo referido por otros autores (revisado por Corona y Greising, 2016) de que la implantación de la matriz extracelular de músculo esquelético heterólogo favoreció, además del desarrollo de tejido fibroadiposo, una respuesta inmune mantenida. Esto está en buena relación con señalado por varios autores de que, el empleo de matrices acelulares no promueven la regeneración muscular señalan o lo hacen mínimamente (Turner *et al*, 2012; Corona *et al*, 2013a; Garg *et al*, 2014; Aurora *et al*, 2015). Al igual que en nuestro estudio, Garg *et al* (2014), empleando matriz descelularizada de músculo troceado, encuentran que la neoformación de fibras queda limitada a la vecindad del músculo preservado, mientras que el resto es ocupado por tejido fibroso. Por el contrario, otros autores han encontrado que *bioscaffolds* de submucosa intestinal descelularizada permiten la formación de miotubos tanto en la periferia como en el centro del defecto (Dziki *et al*, 2016b) así como el aloinjerto de matriz descelularizada de músculo esquelético conjuntamente con tratamientos inmunosupresores (Perniconi *et al*, 2011).

La no formación de neomúsculo en el grupo GIFA fue inesperada ya que se conoce que la fibrina promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de mioblastos, es compatible con la vascularización y se degradará por completo en pocas

semanas permitiendo el reemplazo de tejidos y la integración con el músculo huésped (Huang *et al*, 2005; Page *et al*, 2011). De hecho, se ha visto que la combinación de células troncales derivadas de músculo en combinación con un gel de fibrina genera nuevas fibras musculares y aumenta significativamente la masa muscular, reduciendo simultáneamente el tejido fibrótico (Matthias *et al*, 2018), aunque para las grandes lesiones musculares como VML, el gel de fibrina por sí solo no es suficiente para la reparación (Matthias *et al*, 2018).

Este fracaso en la formación de neomúsculo podría estar relacionado con las propiedades del hidrogel elaborado. Campos *et al* (2016; 2018) han demostrado que, además de la nanoestructuración, es necesario que presenten una porosidad adecuada. En nuestra opinión esto permitiría o favorecería la penetración de células, vasos y nervios desde el músculo huésped. En nuestro caso, aunque la fibrina-agarosa fue nanoestructurada no fue medida la porosidad. Esto podría explicar que el implante se comportara como un cuerpo extraño. En el músculo esquelético una lesión causada por un biomaterial implantado inicia y perpetúa una respuesta en la que predomina la reparación mediante una secuencia de acontecimientos que incluyen la formación de tejido de granulación, angiogénesis y fibrosis, pero que carece sustancialmente de una respuesta regenerativa (Muhamed *et al*, 2013).

About abnormal histological features in the neo-muscle generated in the VML lesion

In studies of muscles generated by tissue engineering, the descriptions of the histologic features are uncommon and generally relate only to fibrosis and neoformation of fibers without going into greater descriptive detail. In this regard we consider that the results of our doctoral thesis constitute a contribution of interest because they not only provide information about histological aspects of muscle

generated by tissue engineering techniques, but also give us information about the processes that may hinder or preclude their formation.

The findings in our study are related to: i. histological changes taking place in the process of muscle injury-regeneration; ii. the type of material / tissue transplanted or implanted; and iii. the fact that the muscle fibers in regeneration and / or neoformation develop in a tissue microenvironment altered by modification or lack of reintegration processes. The presence of central or internal nuclei was seen in all groups but was greater and significantly different for the GCR group. This cytoarchitectural change is a diagnostic feature of regenerated muscle (Lee *et al*, 2013). The presence of fibers with internal nuclei supports that regenerative fibers were formed in all the groups in the ZI, although they were later atrophic or hypotrophic and presented cytoarchitectural abnormalities. In this sense, sequelae or abnormalities derived from a defective process are both splitting or branched fibers, considered a delay or defect in the fusion of regenerating myotubes (Eriksson *et al*, 2006), and the formation of ring or annular fibers as a consequence of the myofibrillogenesis that occurs in regeneration and repair under a deficit environment of longitudinal tension (Peña *et al*, 2001; Peña *et al*, 2007). Only in GTAA and GIOS groups which had reached greater muscle reconstruction, and therefore less fibrosis (20% and 31% respectively), cytoarchitectural changes such as splitting fibers and ring fibers were identified. In any case, its presence would indicate that the autologous adipose tissue transplant, and to a much lesser extent the Osteovit® implant, allowed the growth of regenerative or neoformed muscle fibers despite the unfavorable conditions (since the reintegrative phenomena were found absent or hindered).

Another abnormality found in our work was the disorientation of regenerative and / or neoformed muscle fibers, being, in relation to the control groups, significantly numerous in the GTAA, GIOS and GIMD groups. Its presence would be due to the formation of muscle fibers in the absence of basal lamina and tendinous connections (Hurme and Kalimo, 1992) and, probably, should be a clear inconvenience in the

recovery of functionality. The restoration of myotendinous junctions and mechanical reintegration are necessary to recover the correct spatial arrangement of muscle fibers in regenerative processes that affect large areas of injury or whole muscles (Carlson, 1986). In the classic studies on regeneration using minced muscle transplant model initially the regenerated fibers are randomly arranged, but it is assumed that they end up oriented parallel to the tension lines when recovering functionality (Carlson, 1996). However, it is striking that in studies in which minced muscle is implanted into VML injuries, this change is not practically mentioned (Ward *et al*, 2015; Ward *et al*, 2016; Corona *et al*, 2017). In our study the presence of disoriented muscle fibers was clearly evident after 60 days, so it seems very unlikely that the neoformed fibers are reoriented without the need to act on them. In our opinion, this is an important issue to consider because, as it has been shown in experimental studies of laceration or cross-sectional injuries, the fibers end up forming new tendon connections (Vaittinen *et al*, 2002; Äärimaa *et al*, 2004). In this sense, in our study, new intramuscular tendons were frequently found. Consequently, at 60 days the poorly oriented fibers would have already formed new myotendinous connections, which could lead to abnormal muscle function. One of the fundamental factors in the generation of bioartificial muscles by tissue engineering is to achieve myofibers in parallel arrangement to the tension lines for, what is used either in vitro mechanical stimulation (Collinsworth *et al*, 2000) or scaffolds specially designed to promote orientation (Tanzi *et al*, 2006). In our case, since autologous adipose tissue transplantation was the procedure that allowed to generate more muscle in the defect (80%) but with a percentage of disorientation of 24%, the ideal strategy would be to combine rehabilitation protocols. In experimental animals it has been shown that early rehabilitation in VML models improves muscle functionality and that residual muscle tissue after injury is better adapted when these therapies are started early (Greising *et al*, 2018). Rehabilitation exercises probably provide the mechanical signals necessary to facilitate the correct histoarchitectural remodeling (Gentile *et al*, 2014; Nakayama *et al*, 2018).

Abnormal regenerative fibers show staining patterns compatible with an altered process of their development, maturation and growth, generating cytoarchitectural lesions similar to those observed in human pathological muscle

biopsies (Swery and Goebel, 2013). For this reason, we believe that our findings may be relevant to help understand the pathogenesis of some of these changes. Given that regeneration is a process of secondary myogenesis (similar to embryonic myogenesis) (Tajbakhsh, 2009; Yusuf and Brand-Saberi, 2012) it is conceivable that, in different pathologies altering the microenvironment in which the new myofibers are formed, the formation of similar changes in the cytoarchitecture is favored. In the human pathological muscle, the pathogenic mechanisms of many of the cytoarchitectural changes observed in skeletal muscle fibers are unknown (Niiyama *et al*, 2002). Some authors have identified myogenic events that are altered in the development of fetal myogenesis, such as that which occurs in patients with a congenital form of myotonic dystrophy, and it also appears that muscle regeneration may be compromised in adult patients (Amack and Mahadevan, 2006). On the other hand, our results may also be of interest to evaluate histologically the muscles designed by tissue engineering, both in their own histological characteristics (although they must become similar to healthy muscle, they do not completely resemble their normal characteristics) and the study of histopathological lesions that will occur in these types of neofomed tissues and organs.

Sobre la correlación ecográfica e histológica tras la reconstrucción experimental de la lesión VML

La ecografía juega un papel destacado en el seguimiento de la evolución de las lesiones musculares en el terreno de la traumatología, medicina deportiva (Kwak *et al*, 2006; Draghi *et al*, 2013; Balius *et al*, 2014; Guerhazi *et al*, 2017) y en modelos experimentales de patología muscular (Kim *et al*, 2002; Ahmad *et al*, 2009; Ahmad *et al* 2010; Jiménez-Díaz *et al*, 2012). Además, dada su accesibilidad y buena relación coste beneficio, tiene una importante utilidad como apoyo diagnóstico en las enfermedades neuromusculares (Pillen *et al*, 2008).

En nuestro estudio el análisis ecográfico se realizó a los 60 días tras el trasplante/implante y mostró que los músculos del grupo GTAA tendieron a normalizar sus rasgos ecográficos siendo similares a los que presentaron el grupo GCR, mientras que los grupos GCN, GIOS, GIMD y GIFA se caracterizaron por una imagen claramente alterada, pero sin revelar patrones ecográficos diferentes entre ellos. Estos resultados ecográficos estarían en buena correlación con las observaciones histológicas.

Básicamente, las anomalías en el músculo se reflejan por cambios en la ecotextura. Se sabe que en el proceso de degeneración-regeneración del músculo esquelético, la ecogenicidad está incrementada en la fase degenerativa mientras que en la regenerativa se caracteriza por un progresivo descenso de la hiperecogenicidad (Kim *et al*, 2002; Pillen *et al*, 2008; Jiménez-Díaz *et al*, 2012) hasta que recupera la normalidad (Pillen *et al*, 2008). En nuestro estudio el análisis ecográfico de los músculos normal y músculos control regenerativo presentaron ecogenicidad normal o ligeramente incrementada respectivamente. Sin embargo, las lesiones VML en el resto de los grupos resultaron hiperecogénicas y con una ecoestructura muy distorsionada.

Generalmente, cuando la histoarquitectura muscular está desorganizada ocurre un incremento en la ecogenicidad. La hiperecogenicidad es el patrón habitual descrito en las lesiones musculares y se corresponde con zonas ocupadas por fibras musculares en degeneración e infiltrado inflamatorio (Ahmad *et al* 2010; Jiménez-Díaz *et al*, 2012; Puthuchery *et al*, 2015). También se corresponde con el incremento de los tejidos fibroso y adiposo (Hu *et al*, 2012), lo que ocurre en músculos de pacientes con parálisis cerebral (Sikdar, 2018), donde la lesión muscular, es sustituida por un importante porcentaje de tejido conectivo en el que también se incluía tejido adiposo. Probablemente, en la reparación fibroadiposa de la lesión VML estarían implicados los progenitores fibroadipogénicos e incluso las propias células satélites (Sciorati *et al*, 2015; Chapman *et al*, 2016) que migrarían desde la zona superviviente. El aumento de la ecogenicidad indica una arquitectura muscular más desorganizada y el incremento del tejido conectivo (Sikdar *et al*, 2018), aunque también contribuyen a ello la

infiltración grasa y el edema (Hu *et al*, 2012). Este es el patrón ecográfico que presentaron los grupos GCN, GIOS y GIMD que se caracterizaron histológicamente por una sustitución de la lesión VML por tejido fibroadiposo en un porcentaje del 75%, 31% y 68% respectivamente. Además, en la atrofia muscular por denervación las zonas de fibras atroficas se correlacionan con estructuras homogéneas de ecogenicidad incrementada (Küllmer *et al*, 1998), por lo que al combinarse la atrofia con fibrosis el grupo GIOS, no presentó un patrón específico. En el grupo GIFA si se detectaron áreas hipoeoicas en el seno de la lesión hiperecogénica, que podrían corresponderse con las áreas lacunares que contendrían los restos de fibrina-agarosa. En la resolución del hematoma en la lesión muscular experimental se ha visto que los coágulos de fibrina se correlacionan con baja ecogenicidad (Kim *et al*, 2002).

El reconocimiento de los límites de la lesión también resulta un parámetro útil para comprobar la reconstrucción de la lesión volumétrica. Los límites son evidenciados por el contraste que se establece entre la ecotextura y ecogenicidad normal con la que presenta el área de lesión. Cuando a los 60 días el defecto volumétrico es ocupado por nuevo tejido muscular (como ocurre en el GCR y GTAA) las características sonográficas regresan a la normalidad por lo que en estos grupos los bordes se encontraban mal delimitados. Por el contrario, en los grupos GIOS, GIMD Y GIFA el defecto no fue ocupado por tejido muscular por lo que la zona de implante se mantuvo heteroeoica e hiperecogénica facilitando el reconocimiento de los límites de la lesión. Dziki *et al* (2016) han analizado en un estudio en humanos, la evolución ecográfica de lesiones volumétricas tratadas con implantes de *scaffolds*. Estos autores observan que un mes después de la implantación, cuando histológicamente predominan los cambios inflamatorios, fibrosis y pequeñas islas de fibras musculares desmina+, se observa una estructura hiperecoica laminar correspondiente al *scaffold* implantado; 7 meses después los restos de los implantes no son detectados ecográficamente mientras que el patrón ecográfico es similar al músculo normal, aunque histológicamente las biopsias contienen músculo pero también importantes áreas de fibrosis.

Por tanto, la ecografía confirmó los resultados histológicos por lo que consideramos que, además de su utilidad para el seguimiento de las lesiones musculares y de apoyo al diagnóstico de la patología neuromuscular, puede ser también una herramienta útil para la evaluación de los músculos generados a partir de la ingeniería tisular.

Future lines of research

Skeletal muscle regeneration is a process with an exceptional impact in different fields of medicine —neurology, rheumatology, sports medicine, rehabilitation— and surgery —traumatology and orthopedics, plastic and restorative surgery, maxillofacial surgery—, and in the field of oncology due to the structural and functional repercussions of neuromuscular diseases, as well as traumatic injuries. Deficient or incomplete regeneration after major traumatic injuries of skeletal muscle, and consequently the functional deficiencies that are generated, are a very important problem that require the development of therapeutic strategies aimed at stimulating regeneration. Likewise, it is important to check if allogeneic adipose tissue has similar behavior in a VML, with a view to creating adipose tissue banks for use in research and clinical.

The research developed in our doctoral thesis is focused on the resolution of a serious clinical condition —the volumetric loss of muscle mass— from an experimental approach. Based on the results obtained, we propose the development of different future lines of work that complete and expand the research carried out: i. incorporate functional assessments; ii. develop new models, combining rehabilitation strategies and regenerative medicine, in order to act synergistically to improve structural and functional recovery in the VML lesion; and iii. test the implantation of new tissues or biomaterials.

Conclusions

1. Our results support the hypothesis that, at least from a morphological point of view, autologous adipose tissue transplantation favors reconstruction following a volumetric loss of skeletal muscle by combining the inherent regenerative response of the organ itself and the myogenic differentiation of the stem cells present in the adipose tissue. Further research is necessary to clarify the intimate mechanisms of myogenic contribution.
2. However, in our study, the formed neo-muscle exhibited histological differences in comparison with the normal skeletal muscle. It is necessary to combine rehabilitation therapy protocols that allow achieving a normal histoarchitecture in the transplanted muscle.
3. On the contrary, none of the acellular bioscaffolds tested favored muscle reconstruction. Although the implantation of Osteovit® did not inhibit the formation of new muscle fibers from the edges of the lesion, its growth was aborted due to a lack of reinnervation.
4. The ultrasound confirmed the histological results so we consider that, in addition to its usefulness for monitoring the evolution of muscle injuries and supporting the diagnosis of neuromuscular pathology, it can also be a useful tool for the evaluation of the muscles generated from tissue engineering.
5. In our opinion, the results obtained are of clinical relevance and have translational potential since they could offer an alternative to the treatment of VML lesions.

Bibliografía

Aärimala V, Kääriäinen M, Vaittinen S, Tanner J, Järvinen T, Best T, Kalimo H. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat *soleus*. *Neuromuscul Disord*. 14:421-428. 2004.

Acarturk TO, Peel MM, Petrosko P, La Framboise W, Johnson PC, Di Milla PA. Control of attachment, morphology, and proliferation of skeletal myoblasts on silanized glass. *J Biomed Mater Res*. 44:355-370. 1999.

Adami N, Biral D, Corbianco S, Zampieri S, Carraro U, Kern H. The fiber types of severely atrophic muscle fibers with nuclear clumps of human 5-year LMN denervated muscle. *BAM*. 19:225-228. 2009.

Afewerki S, Sheikhi A, Kannan S, Ahadian S, Khademhosseini A. Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: Towards natural therapeutics. *Bioeng Transl Med*. 4:96-115. 2018.

Agüera E, Castilla S, Luque E, Jimena I, Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, Peña J. Muscular hypertrophy and atrophy in normal rats provoked by the administration of normal and denervated muscle extracts. *Histol Histopathol*. 31:1367-1379. 2016.

Agüera E, Castilla S, Luque E, Jimena I, Ruz-Caracuel I, Leiva-Cepas F, Peña J. Denervated muscle extract promotes recovery of muscle atrophy through activation of satellite cells. An experimental study. *J Sport Health Sci*. 8:23-31. 2019.

Aguilar CA, Greising SM, Watts A, Goldman SM, Peragallo C, Zook C, Larouche J, Corona BT. Multiscale analysis of a regenerative therapy for treatment of volumetric muscle loss injury. *Cell Death Discov*. 4:e33. 2018

Ahmad N, Bygrave M, Chhem R, Hoffman L, Welch I, Grange R, Fenster A, Hill D, Lee TY. High-frequency ultrasound to grade disease progression in murine models of Duchenne muscular dystrophy. *J Ultrasound Med*. 28:707-716. 2009.

Ahmad N, Bygrave M, De Zordo T, Fenster A, Lee TY. Detecting degenerative changes in myotonic murine models of Duchenne muscular dystrophy using high-frequency ultrasound. *J Ultrasound Med*. 29:367-375. 2010.

Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47:3311-3317. 2006.

Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*. 138:311-315. 1989.

Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells *in vitro*. *J Cell Physiol*. 165:307-312. 1995.

Allen RE, Temm-Grove CJ, Sheehan SM, Rice G. Skeletal muscle satellite cell cultures. *Methods Cell Biol.* 52:155–176. 1998.

Alvarèz Fallas ME, Piccoli M, Franzin C, Sgrò A, Dedja A, Urbani L, Bertin E, Trevisan C, Gamba P, Burns AJ, De Coppi P, Pozzobon M. Decellularized diaphragmatic muscle drives a constructive angiogenic response *in vivo*. *Int J Mol Sci.* 19:1319. 2018.

Amack JD, Mahadevan MS. Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev Biol.* 265:294-301. 2004.

Andersen DC, Schrøder HD, Jensen GH. Non-cultured adipose-derived CD45⁻ side population cells are enriched for progenitors that give rise to myofibers *in vivo*. *Exp Cell Res.* 314: 2951-2964. 2008.

Appel AA, Larson JC, Jiang B, Zhong Z, Anastasio MA, Brey EM. X-ray phase contrast allows three dimensional, quantitative imaging of hydrogel implants. *Ann Biomed Eng.* 44:773-781. 2016

Arce V, Brenes F, Gutiérrez JM. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *Int J Exp Pathol.* 72:211–226. 1991.

Argentati C, Morena F, Bazzucchi M, Armentano I, Emiliani C, Martino S. Adipose stem cell translational applications: from bench-to-bedside. *Int J Mol Sci.* 19:e3475. 2018.

Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramírez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, Sinagra G, Giacca M. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Mol Ther.* 10:844–854. 2004.

Atala A. Regenerative medicine strategies. *J Pediatr Surg.* 47:17-28. 2012.

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.* 67:393-407. 2015.

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.* 202:189-201. 2016.

Bach AD, Beier JP, Stern-Staeter J, Horch RE. Skeletal muscle tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 8: 413-422. 2004.

Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, Casteilla L, Reyne Y, Nougues J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases

mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant*. 13:103-111. 2004.

Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*. 28:3587–3593. 2007.

Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater*. 5:1–13. 2009.

Badylak SF, Nerem RM. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. *PNAS*. 107:3285–3286. 2010.

Baghdadi MB, Tajbakhsh S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev Biol*. 433:200-209. 2018.

Balius R, Rodas G, Pedret C, Capdevila L, Alomar X, Bong DA. Soleus muscle injury: sensitivity of ultrasound patterns. *Skeletal Radiol*. 43:805-812. 2014.

Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S, Philips N, Witvrouw E, Almqvist KF, Vanderstraeten G, Vanden Bossche LC. Treatment of skeletal muscle injury: a review. *ISRN Orthop*. 2012:e689012. 2012.

Balius R, Alomar X, Pedret C, MD, Blasi M, Rodas G, Pruna R, Peña-Amaro J, Fernández-Jaén T. Role of the extracellular matrix in muscle injuries: histoarchitectural considerations for muscle injuries. *Orthop J Sports Med*. 6:e-2325967118795863. 2018.

Basiri A, Farokhi M, Azami M, Ebrahimi-Barough S, Mohamadnia A, Rashtbar M, Hasanzadeh E, Mahmoodi N, Baghaban Eslaminejad M, Ai J. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering. *Prog Biomater*. 8:31-42. 2019.

Bassaglia Y, Gautron J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J Muscle Res Cell Motil*. 16:420-429. 1995.

Bautch VL. Stem cells and the vasculature. *Nat Med*. 17:1437-1443. 2011.

Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, Chaudhry GR. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *J Vis Exp*. 122. 2017.

Behraves E, Yasko AW, Engel PS, Mikos AG. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop Relat Res*. 367:118-129. 1999.

Beier JP, Stern-Straeter J, Foerster VT, Kneser U, Stark GB, Bach AD. Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model. *Plast Reconstr Surg*. 118:1113-1121. 2006.

Beier JP, Klumpp D, Rudisile M, Dersch R, Wendorff JH, Bleiziffer O, Arkudas A, Polykandriotis E, Horch RE, Kneser U. Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. *BMC Biotechnol.* 9:34. 2009.

Bentzinger CF, von Maltzahn J, Rudnicki MA. Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Res Ther.* 1:27. 2010.

Bhartiya D. Pluripotent stem cells in adult tissues: struggling to be acknowledged over two decades. *Stem Cell Rev.* 13:713-724. 2017.

Bian W, Bursack N. Engineered skeletal muscle tissue with controllable architecture. *Biomaterials.* 30:1408-1412. 2009.

Biérinx AS, Sebille A. Mouse sectioned muscle regenerates following auto-grafting with muscle fragments: A new muscle precursor cells transfer? *Neurosci Lett.* 431:211-214. 2008.

Bischoff, R. Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Dev Biol.* 115:129-139. 1986.

Bischoff R, Heintz C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Development.* 109:943-952. 1990.

Boennelycke M, Christensen L, Nielsen LF, Gräs S, Lose G. Fresh muscle fiber fragments on a scaffold in rats-a new concept in urogynecology? *Am J Obstet Gynecol.* 205:235. e10-14. 2011

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.* 264:203-218. 2001.

Bornemann A, Schmalbruch H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve.* 15:14-20. 1992.

Bornemann A, Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. *Brain Pathol.* 10:193-214. 2000.

Borschel GH, Dow DE, Dennis RG, Brown DL. Tissue-engineered axially vascularized contractile skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg.* 117:2235–2242. 2006.

Borselli C, Storrie H, Benesch-Lee F, Shvartsman D, Cezar C, Lichtman JW, Vandenbugh HH, Mooney DJ. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:3287–3292. 2010.

Bosse MJ, MacKenzie EJ, Kellam JF, Burgess AR, Webb LX, Swiontkowski MF, Sanders RW, Jones AL, McAndrew MP, Patterson BM, McCarthy ML, Trivison TG, Castillo RC.

An analysis of outcomes of reconstruction or amputation after leg-threatening injuries. *N Engl J Med.* 347:1924–1931. 2002.

Bosurgi L, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. *Front Immunol.* 2:62. 2011.

Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int.* 2012:975871. 2012.

Browe D, Freeman J. Optimizing C2C12 myoblast differentiation using polycaprolactone-polypyrrole copolymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 107:220-231. 2019.

Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 10:1502–1514. 2014.

Brown RA, Wiseman M, Chuo CB, Cheema U, Nazhat SN. Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: fabrication of nano and micro-structures by plastic compression. *Adv Funct Mater.* 15:1762-1770. 2005.

Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl Res.* 163:268–285. 2014.

Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD, Bergin P, Chestnutt B, Marin M, Ramsey V, Elder SH, Gilbert JA. Chitosan: potential use as bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J Biomater Sci Polym.* 14:423-438. 2003.

Busser H, Najar M, Raicevic G, Pieters K, Velez Pombo R, Philippart P, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: comparison of bone marrow and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 24:2142-2157. 2015.

Calve S, Odelberg SJ, Simon HG. A transitional extracellular matrix instructs cell behavior during muscle regeneration. *Dev Biol.* 344: 259-271. 2010.

Campos A. Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de ingreso. *Instituto de España. Real Academia Nacional de Medicina.* Madrid. 2004.

Campos F, Bonhome-Espinosa AB, García-Martínez L, Durán JD, López-López MT, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Carriel V. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 11:055004. 2016.

Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Vizcaino G, Rodriguez IA, Durand-Herrera D, López-López MT, Sánchez-Montesinos I, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Carriel V.

Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 13:025021. 2018.

Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, Garzón I, Alaminos M. *In vitro* characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med.* 11:1412-1426. 2017.

Carlson BM. Regeneration of entire skeletal muscles. *Fed Proc.* 45:1456-1460. 1986.

Carlson B.M. Skeletal muscle transplantation. In: Lanza R.P., Chick W.L. (eds) Yearbook of Cell and Tissue Transplantation 1996–1997. Springer, Dordrecht. 2016, pp: 61-67.

Carlson BM. Muscle regeneration in amphibians and mammals: passing the torch. *Dev Dyn.* 226:167-181. 2003.

Carlson BM. Reintegrative Processes in Regeneration. En: Principles of Regenerative Biology (BM Carlson, ed). Academic Press. pp. 165-188. 2007.

Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve.* 29:191-197. 2004.

Carpenter S, Karpati G. Pathology of Skeletal Muscle, 2nd ed. New York. Oxford University Press. 2001.

Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, Garzón I, García-García S, Sáez- JA. Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Campos A, Alaminos M. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng.*10:e026022. 2013.

Carriel V, Vizcaíno-López G, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, Sánchez-Montesinos I, Campos F. Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Exp Eye Res.* 186:107717. 2019.

Casanellas I, García-Lizarribar A, Lagunas A, Samitier J. Producing 3D biomimetic nanomaterials for musculoskeletal system regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 6:128. 2018.

Cathery W, Faulkner A, Maselli D, Madeddu P. Concise review: The regenerative journey of pericytes toward clinical translation. *Stem Cells.* 36:1295-1310. 2018.

Ceafalan LC, Popescu BO, Hinescu ME. Cellular players in skeletal muscle regeneration. *Biomed Res Int.* 2014:957014. 2014.

Ceafalan LC, Manole E, Tanase CP, Codrici E, Mihai S, Gonzalez A, Popescu BO. Interstitial outburst of angiogenic factors during skeletal muscle regeneration after acute mechanical trauma. *Anat Rec (Hoboken).* 298:1864-1879. 2015.

Chapman MA, Mukund K, Subramaniam S, Brenner D, Lieber RL. Three distinct cell populations express extracellular matrix proteins and increase in number during skeletal muscle fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 312:C131-143. 2017.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238. 2004.

Chato-Astrain J, Campos F, Roda O, Miralle E, Durand-Herrera D, Sáez- JA, García-García S, Alaminos M, Campos A, Carriel V. *In vivo* evaluation of nanostructured fibrin-agarose hydrogels with mesenchymal stem cells for peripheral nerve repairs. *Fron Cell Neurosci.* 12:501. 2018.

Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* 101:821–833. 2014.

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev.* 37:18-22. 2009.

Chen S, Nakamoto T, Kawazoe N, Chen G. Engineering multi-layered skeletal muscle tissue by using 3D microgrooved collagen scaffolds. *Biomaterials.* 73:23-31. 2015.

Chevrel G, Hohlfeld R, Sendtner M. The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. *Muscle Nerve.* 33:462–476. 2006.

Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly(epsilon-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials.* 29:2899–2906. 2008.

Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim IS, Cho YW. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release.* 222:107-115. 2016.

Cholok D, Lee E, Lisiecki J, Agarwal S, Loder S, Ranganathan K, Qureshi AT, Davis TA, Levi B. Traumatic muscle fibrosis: From pathway to prevention. *J Trauma Acute Care Surg.* 82:174-184. 2017.

Christ GJ. Introduction. *Cells Tissues Organs.* 202:141-142. 2016.

Chung E, Rybalko VY, Hsieh PL, Leal SL, Samano MA, Willauer AN, Stowers RS, Natesan S, Zamora DO, Christy RJ, Suggs LJ. Fibrin-based stem cell containing scaffold improves the dynamics of burn wound healing. *Wound Repair Regen.* 24:810–819. 2016.

Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Design*. 16:906-914. 2010.

Cittadella Vigodarzere G, Mantero S. Skeletal muscle tissue engineering: strategies for volumetric constructs. *Front Physiol*. 5:362. 2014.

Collinsworth AM, Torgan CE, Nagda SN, Rajaligam RJ, Graus WE, Truskey GA. Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch. *Cell Tissue Res*. 302:243-251. 2000.

Coppi PDE, Bellini S, Conconi MT, Sabatti M, Simonato E, Gamba PG, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. Myoblast-acellular skeletal muscle matrix constructs full-thickness abdominal wall defects. *Tissue Eng*. 12:1929–1936. 2006.

Corona BT, Machingal MA, Criswell T, Vadhavkar M, Dannahower AC, Bergman C, Zhao W, Christ GJ. 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*. 18:1213-1228. 2012.

Corona BT, Wu X, Ward CL, McDaniel JS, Rathbone CR, Walters TJ. The promotion of a functional fibrosis in skeletal muscle with volumetric muscle loss injury following the transplantation of muscle-ECM. *Biomaterials*. 34:3324-3335. 2013a.

Corona BT, Garg K, Ward CL, McDaniel JS, Walters TJ, Rathbone CR. Autologous minced muscle grafts: a tissue engineering therapy for the volumetric loss of skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 305:C761–C775. 2013b.

Corona BT, Ward CL, Baker HB, Walters TJ, Christ GJ. Implantation of *in vitro* tissue engineered muscle repair constructs and bladder acellular matrices partially restore *in vivo* skeletal muscle function in a rat model of volumetric muscle loss injury. *Tissue Eng Part A*. 20:705-715. 2014.

Corona BT, Greising SM. Challenges to acellular biological scaffold mediated skeletal muscle tissue regeneration. *Biomaterials*. 104:238-246. 2016.

Corona BT, Wenke JC, Ward CL. Pathophysiology of volumetric muscle loss injury. *Cells Tissues Organs*. 202:180-188. 2016.

Corona BT, Henderson BE, Ward CL, Greising SM. Contribution of minced muscle graft progenitor cells to muscle fiber formation after volumetric muscle loss injury in wild-type and immune deficient mice. *Physiol Rep*. 5:e13249. 2017.

Corona BT, Rivera JC, Wenke JC, Greising SM. Tacrolimus as an adjunct to autologous minced muscle grafts for the repair of a volumetric muscle loss injury. *J Exp Orthop*. 4:36. 2017a.

Cornwell KG, Pins GD. Discrete crosslinked fibrin microthread scaffolds for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 82:104–112. 2007.

Corsi KA, Schwarz EM, Mooney DJ, Huard J. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. *J Orthop Res*. 25:1261-1268. 2007.

Cossu G, Biressi S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 16:623-631. 2005.

Cosgrove BD, Blau HM. Skeletal Muscle Stem Cells. *Principles of Regenerative Medicine*. (Atala A, Lanza R, Thomson JA, Nerem R, eds.) 2nd edition. Elsevier Inc. Canada, pp. 347-363. 2011.

Crisan M, Corselli M, Chen WC, Péault B, Moldovan N. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 16:2851-2860. 2012.

Cronin EM, Thurmond FA, Bassel-Duby R, Williams RS, Wright WE, Nelson KD, Garner HR. Protein-coated poly(L-lactic acid) fibers provide a substrate for differentiation of human skeletal muscle cells. *J Biomed Mater Res A*. 69:373–381. 2004.

Cryolife, Inc. 1655 Robert Boulevard, N.W. Kennesaw, Georgia 30144, US - 1998. *Descelularización de un tejido*. 98918067.4.

Cumming WJK, Fulthorpe JJ, Hudgson P, Mahon M. Color Atlas of Muscle Pathology. Mosby-Wolfe. London. 1994.

Dakhore S, Naver B, Hasegawa K. Human pluripotent stem cell culture: current status, challenges, and advancement. *Stem Cells Int*. 2018:7396905. 2018.

De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol*. 15:869-878. 1999.

de la Garza-Rodea AS, van der Velde-van Dijke I, Boersma H, Gonçalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, Knaän-Shanzer S. Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources. *Cell Transplant*. 21:153-173. 2012.

Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int*. 41:706-715. 2017.

Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, Antonini S, Sambasivan R, Brunelli S, Tajbakhsh S, Cossu G. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat Commun*. 2:499. 2011.

Demonbreun AR, Biersmith BH, McNally EM. Membrane fusion in muscle development and repair. *Semin Cell Dev Biol.* 45:48-56. 2015.

Deponti D, Buono R, Catanzaro G, De Palma C, Longhi R, Meneveri R, Bresolin N, Bassi MT, Cossu G, Clementi E, Brunelli S. The low-affinity receptor for neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via *RhoA*. *Mol Biol Cell.* 20:3620–3627. 2009.

Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science.* 309:314-317. 2005.

Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Starino S, Sacchio A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci.* 119:2945-2952. 2006.

Domev H, Milkov I, Itskovitz-Eldor J, Dar A. Immuno-evasive pericytes from human pluripotent stem cells preferentially modulate induction of allogeneic regulatory T cells. *Stem Cells Transl Med.* 3:1169-1181. 2014.

Draghi F, Zacchino M, Canepari M, Nucci P, Alessandrino F. Muscle injuries: ultrasound evaluation in the acute phase. *J Ultrasound.* 16:209–214. 2013.

Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach.* 4th edition. Philadelphia. Saunders-Elsevier. 2013.

Ducret M, Montembault A, Josse J, Padeloup M, Celle A, Benchrih R, Mallein-Gerin F, Alliot Licht B, David L, Farges JC. Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dent Mater.* 35:523-533. 2019.

Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol.* 5:1027-1059. 2015.

Dunn A, Talovic M, Patel K, Patel A, Marcinczyk M, Garg K. Biomaterial and stem cell-based strategies for skeletal muscle regeneration. *J Orthop Res.* 37:1246-1262. 2019.

Duong H, Wu B, Tawil B. Modulation of 3D fibrin matrix stiffness by intrinsic fibrinogen-thrombin compositions and by extrinsic cellular activity. *Tissue Eng Part A.* 15:1865–1876. 2009.

Duscher D, Maan ZN, Luan A, Aitzetmüller MM, Brett EA, Atashroo D, Whittam AJ, Hu MS, Walmsley GG, Houschyar KS, Schilling AF, Machens HG, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC. Ultrasound-assisted liposuction provides a source for functional adipose-derived stromal cells. *Cytotherapy.* 19:1491-1500. 2017.

Dziki J, Badylak S, Yabroudi M, Sicari B, Ambrosio F, Stearns K, Turner N, Wyse A, Boninger ML, Brown EHP, Rubin JP. An acellular biologic scaffold treatment for volumetric muscle loss: results of a 13-patient cohort study. *NPJ Regen Med.* 1:16008. 2016a.

Dziki JL, Sicari BM, Wolf MT, Cramer MC2, Badylak SF. Immunomodulation and mobilization of progenitor cells by extracellular matrix bioscaffolds for volumetric muscle loss treatment. *Tissue Eng Part A.* 22:1129-1139. 2016b.

Eberhard D, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 65:33-40. 2008.

Echave MC, Saenz del Burgo L, Pedraz JL, Orive G. Gelatin ad biomaterial for tissue engineering. *Curr Pharm Des.* 23:3567-3584. 2017.

Ehrhardt J, Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol.* 18:548-553. 2005.

Ekstrand J, Hägglund M, Waldén M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med.* 39:1226-1232. 2011.

Eriksson A, Lindström M, Carlsson L, Thornell LE. Hypertrophic muscle fibers with fissures in power-lifters; fiber splitting or defect regeneration. *Histochem Cell Biol.* 126:409-417. 2006.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 29:10-14. 2002.

Fishman JM, Lowdell MW, Urbani L, Ansari T, Burns AJ, Turmaine M. Immunomodulatory effect of a decellularized skeletal muscle scaffold in a discordant xenotransplantation model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:14360-14365. 2013.

Forcina L, Miano C, Pelosi L, Musarò A. An overview about the biology of skeletal muscle satellite cells. *Curr Genomics.* 20:24-37. 2019.

Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 96:183-195. 2015.

Fukada SI. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. *J Biochem.* 163:353-358. 2018.

Fuoco C, Sangalli E, Vono R, Testa S, Sacchetti B, Latronico MV, Bernardini S, Madeddu P, Cesareni G, Seliktar D, Rizzi R, Bearzi C, Cannata SM, Spinetti G, Gargioli C. 3D hydrogel environment rejuvenates aged pericytes for skeletal muscle tissue engineering. *Front Physiol.* 5:203. 2014.

Fuoco C, Petrilli LL, Cannata S, Gargioli C. Matrix scaffolding for stem cell guidance toward skeletal muscle tissue engineering. *J Orthop Surg Res.* 11:86. 2016.

Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells.* 22:617-624, 2004.

Gao M, Lu P, Bednark B, Lynam D, Conner JM, Sakamoto J, Tuszynski MH. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection. *Biomaterials.* 34:1529-1536. 2013.

Garg K, Corona BT, Walters TJ. Losartan administration reduces fibrosis but hinders functional recovery after volumetric muscle loss injury. *J Appl Physiol.* 25:1120-1131. 2014a.

Garg K, Corona BT, Walters TJ. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Front Pharmacol.* 6:e87. 2015a.

Garg K, Ward CL, Rathbone CR, Corona BT. Transplantation of devitalized muscle scaffolds is insufficient for appreciable de novo muscle fiber regeneration after volumetric muscle loss injury. *Cell Tissue Res.* 358:857-573. 2014b.

Garg K, Ward CL, Corona BT. Asynchronous inflammation and myogenic cell migration limit muscle tissue regeneration mediated by a cellular scaffolds. *Inflamm Cell Signal.* 1:e530. 2015b.

Garg K, Ward CL, Hurtgen BJ, Wilken JM, Stinner DJ, Wenke JC, Owens JG, Corona BT. Volumetric muscle loss: persistent functional deficits beyond frank loss of tissue. *J Orthop Res.* 33:40-46. 2015c.

Garzón I, Miyake J, González-Andrades M, Carmina R, Carda C, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2:625-632. 2013.

Gattazzo, F, De Maria, C, Rimessi, A, Donà, S, Braghetta, P, Pinton, P, Vozzi, G, Bonaldo, P. Gelatin–genipin-based biomaterials for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B.* 106:2763-2777. 2018.

Gautam J, Yao Y. Pericytes in skeletal muscle. Pericyte biology in different organs. First edition (Birbrair A. Ed.). Springer International Publishing. 2019.

Gayraud-Morel B, Chrétien F, Tajbakhsh S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med.* 4:293–319. 2009.

Gentile NE, Stearns KM, Brown EHP, Rubin JP, Boninger ML, Dearth CL, Ambrosio F, Badylak SF. Targeted rehabilitation after extracellular matrix scaffold transplantation

for the treatment of volumetric muscle loss. *Am J Phys Med Rehabil.* 93(Suppl):S79-S87. 2014.

Gentile P, Cervelli V. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Methods Mol Biol.* 1773:107-122. 2018.

Gerard C, Forest MA, Beauregard G, Skuk D, Tremblay JP. Fibrin gel improves the survival of transplanted myoblasts. *Cell Transplant.* 21:127-137. 2012.

Gerli MFM, Guyette JP, Evangelista-Leite D, Ghoshhajra BB, Ott HC. Perfusion decellularization of a human limb: A novel platform for composite tissue engineering and reconstructive surgery. *PLoS One.* 13:e0191497. 2018.

Ghasemkhah F, Latifi M, Hadjizadeh A, Shokrgozar MA. Potential core-shell designed scaffolds with a gelatin-based shell in achieving controllable release rates of proteins for tissue engineering approaches. *J Biomed Mater Res A.* 107:1393-1405. 2019.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 27:3675-3683. 2006.

Gilbert TW. Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem.* 113:2217-2222. 2012.

Gillbert-Honick J, Ginn B, Zhang Y, Salhi S, Warner KR, Mao HQ, Grayson WL. Adipose-derived stem/stromal cells on electrospun fibrin microfiber bundles enable moderate muscle reconstruction in a volumetric muscle loss model. *Cell Transplant.* 27:1644-1656. 2018.

Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve.* 44: 318-331. 2011.

Goldman SM, Corona BT. Co-delivery of micronized urinary bladder matrix damps regenerative capacity of minced muscle grafts in the treatment of volumetric muscle loss injuries. *PLoS One.* 12:e0186593. 2017.

Goldman SM, Henderson BEP, Corona BT. Evaluation of bone marrow mononuclear cells as an adjunct therapy to minced muscle graft for the treatment of volumetric muscle loss injuries. *Stem Cell Res Ther.* 8:e142. 2017a.

Goldman SM, Henderson BEP, Walters TJ, Corona BT. Co-delivery of a laminin-111 supplemented hyaluronic acid based hydrogel with minced muscle graft in the treatment of volumetric muscle loss injury. *PLoS One.* 13:e0191245. 2018.

Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocoll.* 25:1813-1827. 2011.

Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 27:6052–6063. 2006.

González-Andrades M, Garzón I, Alaminos M, Campos A, Prosper F, Orive G, Anitua E. Advances in the field of tissue engineering and regenerative medicine: state of the art and regulatory issues. *J Biomater Tiss Eng*. 3:245-260. 2013.

Goebel HH, Bornemann A. Desmin pathology in neuromuscular diseases. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 64:127-135. 1993.

Gorecka A., Salemi S., Haralampieva D., Moalli F., Stroka D., Candinas D., Eberli D. Brügger L. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells improves functional recovery of skeletal muscle without direct participation in new myofiber formation. *Stem Cell Res Ther*. 9:195. 2018.

Grabowska I, Zimowska M, Maciejewska K, Jablonska Z, Bazga A, Ozieblo M, Stremimska W, Bem J, Brzoska E, Ciemerych MA. Adipose tissue-derived stromal cells in matrigel impacts the regeneration of severely damaged skeletal muscles. *Int J Mol Sci*. 20:e33132019. 2019.

Grasman JM, Page RL, Dominko T, Pins GD. Crosslinking strategies facilitate tunable structural properties of fibrin microthreads. *Acta Biomater*. 88:4020-4030. 2012.

Grasman JM, Pumphrey LM, Dunphy M, Perez-Rogers J, Pins GD. Static axial stretching enhances the mechanical properties and cellular responses of fibrin microthreads. *Acta Biomater*. 10:4367–4376. 2014.

Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, Pins G D. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomater*. 25:2-15. 2015.

Greising SM, Dearth CL, Corona BT. Regenerative and rehabilitative medicine: A necessary synergy for functional recovery from volumetric muscle loss injury. *Cells Tissues Organs*. 202:237-249. 2016.

Greising SM, Rivera JC, Goldman SM, Watts A, Aguilar CA, Corona BT. Unwavering pathobiology of volumetric muscle loss injury. *Sci Rep*. 7:13179. 2017.

Greising SM, Warren GL, Southern WM, Nichenko AS, Qualls AE, Corona BT, Call JA. Early rehabilitation for volumetric muscle loss injury augments endogenous regenerative aspects of muscle strength and oxidative capacity. *BMC Musculoskelet Disord*. 19:173. 2018.

Grodzinski P, Silver M, Molnar LK. Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. *Expert Rev Mol Diag*. 6:307-318. 2006.

Grogan BF, Hsu JR. Volumetric muscle loss. *J Am Acad Orthop Surg*. Sup 1. S35-S37. 2011.

Grounds MD. Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol*. 12:535-543. 1999.

Grounds MD. Muscling in on tissue engineering. *Today's Life Science*. 12:36-40. 2000.

Grounds MD, McGeachie JK, Davies MJ, Sorokin L, Maley MAL. The expression of extracellular matrix during adult skeletal muscle regeneration: how the basement membrane, interstitium, and myogenic cells collaborate. *Basic Appl Myol*. 8:129-141. 1998.

Guermazi A, Roemer FW, Robinson P, Tol JL, Regatte RR, Crema MD. Imaging of muscle injuries in sports medicine: sports imaging series. *Radiology*. 282:646-663. 2017.

Guo B, Qu J, Zhao X, Zhang M. Degradable conductive self-healing hydrogels based on dextran-graft-tetraaniline and N-carboxyethyl chitosan as injectable carriers for myoblast cell therapy and muscle regeneration. *Acta Biomater*. 84:180-193. 2019.

Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. *Biotechnol Prog*. 34:1494-1505. 2018.

Haas GJ, Dunn AJ, Marcinczyk M, Talovic M, Schwartz M, Scheidt R, Patel AD, Hixon KR, Elmashady H, McBride-Gagy SH, Sell SA, Garg K. Biomimetic sponges for regeneration of skeletal muscle following trauma. *J Biomed Mater Res A*. 107:92-103. 2019.

Hammers DW, Sarathy A, Pham CB, Drinnan CT, Farrar RP, Suggs LJ. Controlled release of IGF-I from a biodegradable matrix improves functional recovery of skeletal muscle from ischemia/reperfusion. *Biotechnol Bioeng*. 109:1051-1059. 2012.

Han N, Yabroudi MA, Stearns-Reider K, Helkowski W, Sicari BM, Rubin JP, Badylak SF, Boninger ML, Ambrosio F. Electrodiagnostic evaluation of individuals implanted with extracellular matrix for the treatment of volumetric muscle injury: case series. *Phys Ther*. 96:540-549. 2016.

Han S, Lee JY, Heo EY, Kwon IK, Yune TY, Youn I. Implantation of a Matrigel-loaded agarose scaffold promotes functional regeneration of axons after spinal cord injury in rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 496:785-791. 2018.

Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, Pascal Q, Guguin A, Gayraud-Morel B, Cavaillon JM, Tajbakhsh S, Rocheteau P, Chrétien F. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One*. 11:e0147198. 2016.

Harrell CR, Simovic Markovic B, Fellabaum C, Arsenijevic A, Djonov V, Volarevic V. Molecular mechanisms underlying therapeutic potential of pericytes. *J Biomed Sci.* 25:21. 2018.

Hasan ML, Padalhin AR, Kim B, Lee BT. Preparation and evaluation of BCP-CSD-agarose composite microsphere for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 107:2263-2272. 2019.

Hejbøl EK, Sellathurai J, Nair PD, Schrøder HD. Injectable scaffold materials differ in their cell instructive effects on primary human myoblasts. *J Tissue Eng.* 8:2041731417717677. 2017.

Helal MA, Shaheen NE, Abu Zahra FA. Immunomodulatory capacity of the local mesenchymal stem cells transplantation after severe skeletal muscle injury in female rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38:414-422. 2016.

Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman IJM. Stem cells from adipose tissue a challenging new concepts. *Tissue Eng.* 13:1799-1808. 2007.

Hill E, Boontheekul T, Mooney DJ. Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration. *Tissue Eng.* 12:1295–1304. 2006.

Hofecker JL, Moss TL, Becher MW. Specialized histology for neuropathology. *The J Histotechnol.* 30:67-78. 2007.

Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 209:2265-2275. 2006.

Hu CF, Chen CP, Tsai WC, Hu LL, Hsu CC, Tseng ST, Shau YW. Quantification of skeletal muscle fibrosis at different healing stages using sonography: a morphologic and histologic study in an animal model. *J Ultrasound Med.* 31:43-48. 2012.

Huang YC, Dennis RG, Larkin L, Baar K. Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels. *J Appl Physiol.* 98:706-713. 2005

Huard Y, Li F, Fu H. Muscle injuries and repair: Current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 84:822–832. 2002.

Huard J, Lu A, Mu X, Guo P, Li Y. Muscle injuries and repair: What's new on the horizon! *Cells Tissues Organs.* 202:227-236. 2016.

Huard J. Stem cells, blood vessels, and angiogenesis as major determinants for musculoskeletal tissue repair. *J Orthop Res.* 37:1212-1220. 2019.

Hubbell JA. Matrix effects. En: Principles of tissue engineering. (Lanza R, Langer R, Vacanti J, Eds.). 4th edition. London. 407-421. 2014.

Huey KA. Potential roles of vascular endothelial growth factor during skeletal muscle hypertrophy. *Exerc Sport Sci Rev*. 46:195-202. 2018.

Huijbregts J, White JD, Grounds MD. The absence of MyoD in regenerating skeletal muscle affects the expression pattern of basement membrane, interstitial matrix and integrin molecules that is consistent with delayed myotube formation. *Acta Histochem*. 103:379-96. 2001.

Huri PY, Morrissette-McAlmon J, Grayson WL. Myogenic differentiation of ASCs using biochemical and biophysical induction. *Methods Mol Biol*. 1773:123-135. 2018.

Hurme T, Kalimo H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. *Muscle Nerve*. 15:482-489. 1992.

Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D. Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7:249–258. 1996.

Hutmacher DW, Goh JC, Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Ann Acad Med Singapore*. 30:183-191. 2001.

Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med*. 11:654-69. 2007.

Ikutomo S, Sakakima H, Matsuda F, Yoshida Y. Midkine-deficient mice delayed degeneration and regeneration after skeletal muscle injury. *Acta Histochem*. 116:319-326. 2014.

Irintchev A, Rosenblatt JD, Cullen MJ, Zweyer M, Wernig A. Ectopic skeletal muscles derived from myoblasts implanted under the skin. *J Cell Sci*. 111:3287-3297. 1998.

Ishido M, Kami K, Masuhara M. *In vivo* expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:484-493. 2004.

Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol*. 91:32-39. 2013.

Jaimes-Parra BD, Valle-Díaz de la Guardia F, Arrabal-Polo MA, Herrera-Imbroda B, Lara MF, Machuca-Santa-Cruz FJ, Campos A, Alaminos M, Crespo PV, Garzón I. *Ex vivo* construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study. *Int J Urol*. 23:85-92. 2016.

Jank BJ, Xiong L, Moser PT, Guyette JP, Ren X, Cetrulo CL, Leonard DA, Fernandez L, Fagan SP, Ott HC. Engineered composite tissue as a bioartificial limb graft. *Biomaterials*. 61:246–256. 2015.

Järvinen T, Kääriäinen M, Järvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Current opinion in rheumatology*, 12:155-161. 2000.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 33:745-764. 2005.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Äärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscles injuries: optimising recovery. *Best Prac Res Clin Rheumatol*. 21:317-331. 2007.

Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J*. 3:337-345. 2014.

Jazedje T, Secco M, Vieira NM, Zucconi, Gollop TR, Vainzof M, Zatz M. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction *in vitro*. *J Transl Med*. 7:6. 2009.

Jejurikar SS, Kuzon WM Jr. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*. 8:573-578. 2003.

Jiang YC, Jiang L, Huang A, Wang XF, Li Q, Turng LS. Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell-matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 71:901-908. 2017.

Jimena I, Peña J, Luque E, Vaamonde R. Histological, histochemical and morphometric characteristics of regenerating fibers in rat skeletal muscle. *Histol Med*. 8:31-38. 1992.

Jimena Medina I, Luque E, Leiva F, Rubio A, López Martos R, Martínez Baena F, Jiménez Reina L, Peña J. Muscle reconstruction using a decellularized matrix scaffold: preliminary results. *Histol Histopathol*. Suppl 1:S111-112. 2009.

Jimena I, Peña J, Luque E, Vaamonde R. Muscle hypertrophy experimentally induced by administration of denervated muscle extract. *J Neuropathol Exp Neurol*. 52:379-386. 1993.

Jimena I, Peña J, Luque E, Ayuso F, Vaamonde R. Myotrophic effects of muscle extracts obtained at different intervals after denervation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 24:217-223. 1998.

Jiménez F, Goitz H, Bouffard A. Ultrasound and clinical diagnosis of muscle injuries. *Arch Med Dep*. 138:465-476. 2010.

Jiménez-Díaz F, Jimena I, Luque E, Mendizábal S, Bouffard A, Jiménez-Reina L, Peña J. Experimental muscle injury: correlation between ultrasound and histological findings. *Muscle Nerve*. 45:705-712. 2012.

Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 12:153-163. 2010.

Ju YM, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. *In situ* regeneration of skeletal muscle tissue through host cell recruitment. *Acta Biomater.* 10:4332–4339. 2014.

Juhas M, Bursac N. Engineering skeletal muscle repair. *Curr Opin Biotechnol.* 24:880-886. 2013.

Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 10:332-337. 2000.

Kalhovde JM, Jerkovic R, Sefland I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S, Lømo T. "Fast" and "slow" muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J Physiol.* 562:847-857. 2005.

Kalimo H, Rantanen J, Järvinen M. Muscle injuries in sports. *Baillière's Clinical Orthop.* 2:1-24. 1997.

Karatzas A, Katsanos K, Lilis I, Papadaki H, Kitrou P, Lecht S, Marcinkiewicz C, Siablis D, Lelkes PI, Lazarovici P, Tsopanoglou NE. NGF promotes hemodynamic recovery in a rabbit hindlimb ischemic model through trkA and VEGFR2-dependent pathways. *J Cardiovasc Pharmacol.* 62:270–277. 2013.

Kasukonis B, Kim J, Brown L, Jones J, Ahmadi S, Washington T, et al. Co-delivery of infusion decellularized skeletal muscle with minced muscle autografts improved recovery from volumetric muscle loss injury in a rat model. *Tissue Eng Part A.* 22:1151-1163. 2016.

Kenar H, Ozdogan CY, Dumlu C, Doger E, Kose GT, Hasirci V. Microfibrous scaffolds from 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.* 97:31-44. 2019.

Kesireddy V. Evaluation of adipose-derived stem cells for tissue-engineered muscle repair construct-mediated repair of a murine model of volumetric muscle loss injury. *Int J Nanomedicine.* 11:1461-1473. 2016.

Khodabukus A, Baar K. Glucose concentration and streptomycin alter *in vitro* muscle function and metabolism. *J Cell Physiol.* 230:1226-1234. 2015.

Kim JT, Kasukonis BM, Brown LA, Washington TA, Wolchok JC. Recovery from volumetric muscle loss injury: A comparison between young and aged rats. *Experimental gerontology.* 83:37-46. 2016.

Kim JT, Kasukonis B, Dunlap G, Perry R, Washington T, Wolchok JC. Regenerative repair of volumetric muscle loss injury is sensitive to age. *Tissue Eng Part A*. [Epub ahead of print]. 2019

Kim HJ, Ryu KN, Sung DW, Park YK. Correlation between sonographic and pathologic findings in muscle injury: experimental study in the rabbit. *J Ultrasound Med*. 21:1113-1119. 2002.

Kim M, Choi YS, Yang SH, Hong HN, Cho SW, Cha SM, Pal JH, Kim CW, Kwon SW, Park CJ. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biochem Biophys Res Commun*. 348:386-392. 2006.

Kim MS, Jun I, Shin YM, Jang W, Kim SI, Shin H. The development of genipin-crosslinked poly(caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Macromol Biosci*. 10:91-100. 2010.

Kin S, Hagiwara A, Nakase Y, Kuriu Y, Nakashima S, Yoshikawa T, Sakakura C, Otsuji E, Nakamura T, Yamagishi H. Regeneration of skeletal muscle using *in situ* tissue engineering on an acellular collagen sponge scaffold in a rabbit model. *ASAIO J*. 53:506-513. 2007.

Kroehne V, Heschel I, Schugner F, Lasrich D, Bartsch JW, Jockusch H. Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. *J Cell Mol Med*. 12:1640-1648. 2008.

Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2:22-31. 2008.

Küllmer K, Sievers KW, Reimers CD, Rompe JD, Müller-Felber W, Nägele M, Harland U. Changes of sonographic, magnetic resonance tomographic, electromyographic, and histopathologic findings within a 2-month period of examinations after experimental muscle denervation. *Arch Orthop Trauma Surg*. 117:228-234. 1998.

Kumar N, Desagani D, Chandran G, Ghosh NN, Karthikeyan G, Waigaonkar S, Ganguly A. Biocompatible agarose-chitosan coated silver nanoparticle composite for soft tissue engineering applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 46:637-649. 2018.

Kuthe CD, Uddanwadiker RV. Investigation of effect of fiber orientation on mechanical behavior of skeletal muscle. *J Appl Biomater Funct Mater*. 14:e154-162. 2016.

Kwan MD, Wan DC, Longaker MT. Skeletal-tissue engineering. En: Principles of tissue engineering. (Robert Lanza, Robert Langer and Joseph Vacanti, Eds.). London. 3rd edition 935-944. 200

Kwak HS, Han YM, Lee SY, Kim KN, Chung GH Diagnosis and follow-up US evaluation of ruptures of the medial head of the *gastrocnemius* ("tennis leg"). *Korean J Radiol.* Jul- 7:193–198. 2006.

Kwee BJ, Mooney DJ. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 47:16-22. 2017.

Lagord C, Soulet L, Bonavaud S, Bassaglia Y, Rey C, Barlovatz-Meimon G, Gautron J, Martelly I. Differential myogenicity of satellite cells isolated from *extensor digitorum longus* (EDL) and *soleus* rat muscles revealed *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 291:455-468. 1998.

Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anat.* 192:161-171. 1998.

Lee AS, Anderson JE, Joya JE, Head SI, Pather N, Kee AJ, Gunning PW, Hardeman EC. Aged skeletal muscle retains the ability to fully regenerate functional architecture. *Bioarchitecture.* 3:25-37. 2013.

Legerlotz K, Smith HK. *Role of MyoD in denervated, disused, and exercise muscle.* *Muscle Nerve.* 38:1087-1100. 2008.

Liceras-Liceras E, Garzón I, España-López A, Oliveira AC, García-Gómez M, Martín-Piedra MÁ, Roda O, Alba-Tercedor J, Alaminos M, Fernández-Valadés R. Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an *in vivo* study in laboratory animals. *J Tissue Eng Regen Med.* 11:1907-1914. 2017.

Leiva-Cepas F, Ruz-Caracuel I, Peña-Toledo MA, Agüera-Vega A, Jimena I, Luque, Peña J. Laboratory methodology for the histological study of skeletal muscle. *Arch Med Deporte.* 35:253-262. 2018.

Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus, J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord.* 9:72-80. 1999.

Lesman A, Koffler J, Atlas R, Blinder YJ, Kam Z, Levenberg S. Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs. *Biomaterials.* 32:7856–7869. 2011.

Li X, McFarland DC, Velleman SG. Transforming growth factor-beta1-induced satellite cell apoptosis in chickens is associated with beta1 integrin-mediated focal adhesion kinase activation. *Poult Sci.* 88:1725–1734. 2009.

Li Y, Thompson WJ. Nerve terminal growth remodels neuromuscular synapses in mice following regeneration of the postsynaptic muscle fiber. *J Neurosci.* 31:13191–13203. 2011.

Li EW, McKee-Muir OC, Gilbert PM. Cellular biomechanics in skeletal muscle regeneration. *Curr Top Dev Biol.* 126:125-176. 2018.

Lim AYT, Lahiri A, Pereira BP, Tan JAC, Sebastin SJ, Tan BL, Zheng L, Kumar P. The role of intramuscular nerve repair in the recovery of lacerated skeletal muscles. *Muscle Nerve.* 33:377-383. 2006.

Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev.* 21:2770-2778. 2012.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol.* 25:807-815. 2010.

Liu J, Saul D, Böker KO, Ernst J, Lehman W, Schilling AF. Current methods for skeletal muscle tissue repair and regeneration. *Biomed Res Int.* 2018:1984879. 2018.

Li MT, Willett NJ, Uhrig BA, Guldberg RE, Warren GL. Functional analysis of limb recovery following autograft treatment of volumetric muscle loss in the quadriceps femoris. *J Biomech.* 7:2013-21. 2014

Llado, J, Tolosa L, Olmos G. Cellular and molecular mechanisms involved in the neuroprotective effects of VEGF on motoneurons. *Front Cell Neurosci.* 7:181. 2013.

Long MW. Stem cell plasticity: molding the future of tissue development and repair. *Blood Cell Mol Dis.* 27:586-589. 2001.

Luque E, Peña J, Alonso PJ, Jimena I. Microvascular pattern during the growth of regenerating muscle fibers in rat. *Ann Anat.* 174:245-249. 1992.

Luque E, Peña J, Martin P, Jimena I, Vaamonde, R. Capillary supply during development of individual regenerating muscle fibers. *Anat Histol Embryol.* 24:87-89. 1995a.

Luque E, Peña J, Martin P, Jimena I, Vaamonde R. Ultrastructural and morphometric analysis of capillaries surrounding regenerating muscle fibers in rats. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 27:367-74. 1995b.

Luque E, Jimena I, Noguera F, Jiménez-Reina L, Peña J. Effects of tenotomy on regenerating anterior tibial muscles in rats. *Basic Appl Myol.* 12:203-208. 2002.

Luque E, Mata F, Jimena I, Peña J. Papel de la célula satélite en la adaptación tisular del músculo esquelético al ejercicio. En: *La actividad física, la salud y el alto rendimiento.* (M. Guillén del Castillo, Coord.). UCOPress, Universidad de Córdoba. pp. 15-28. 2011.

- Luque E, Peña J, Salas P, Jimena I, Martín JD. Changes in satellite cell population associated with regenerating muscle fibers in rats. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 28:305-311. 1996.
- Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramkrishna S. Potential of nanofiber matrix a tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng*. 11:101-109. 2005.
- Ma J, Holden K, Zhu J, Pan H, Li Y. The application of three-dimensional collagen-scaffolds seeded with myoblasts to repair skeletal muscle defects. *J Biomed Biotechnol*. 2011:812135. 2011.
- Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannahower A, Zhao W, Yoo JJ, Christ GJ A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model. *Tissue Eng Part A*. 17:2291-2303. 2011.
- Maffioletti SM, Gerli MF, Ragazzi M, Dastidar S, Benedetti S, Loperfido M, VandenDriessche T, Chuah MK, Tedesco FS. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPSC cells. *Nat Protoc*. 10:941-958. 2015.
- Maffioletti SM, Sarcar S, Henderson ABH, Mannhardt I, Pinton L, Moyle LA, Steele-Stallard H, Cappellari O, Wells KE, Ferrari G, Mitchell JS, Tyzack GE, Kotiadis VN, Khedr M, Ragazzi M, Wang W, Duchen MR, Patani R, Zammit PS, Wells DJ, Eschenhagen T, Tedesco FS. Three-dimensional human iPSC-derived artificial skeletal muscles model muscular dystrophies and enable multilineage tissue engineering. *Cell Rep*. 23:899-908. 2018.
- Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res*. 375:575-588. 2019.
- Maley MAL, Davies MJ, Grounds MD. Extracellular matrix, growth factors, genetics: Their influence on cell proliferation and myotube formation in primary cultures of adult mouse skeletal muscle. *Exp Cell Res*. 219:169-179. 1995.
- Marcinczyk M, Dunn A, Haas G, Madsen J, Scheidt R, Patel K, Talovic M, Garg K. The effect of laminin-11 hydrogels on muscle regeneration in a murine model of injury. *Tissue Eng Part A*. 25:1001-1012. 2019.
- Mase VJ Jr, Hsu JR, Wolf SE, Wenke JC, Baer DG, Owens J, Badylak SF, Walters TJ. Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic *quadriceps femoris* muscle defect. *Orthopedics*. 33:511. 2010.
- Matsumoto T, Sasaki J, Alsberg E, Egusa H, Yatani H, Sohmura T. Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system. *PLoS One*. 2:e1211. 2007.

Matthias N, Hunt SD, Wu J, Lo J, Smith Callahan LA, Li Y, Huard J, Darabi R. Volumetric muscle loss injury repair using *in situ* fibrin gel cast seeded with muscle-derived stem cells (MDSCs). *Stem cell research*. 27:65-73. 2018.

Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle* 1:21. 2011.

Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: current therapies and future directions. *PNAS*. 112:14452–14459. 2015.

Mase VJ Jr, Hsu JR, Wolf SE, Wenke JC, Baer DG, Owens J, Badylak SF, Walters TJ. Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic quadriceps femoris muscle defect. *Orthopedics*. 33:511. 2010.

McClure MJ, Cohen DJ, Ramey AN, Bivens CB, Mallu S, Isaacs JE, Imming E, Huang YC, Sunwoo M, Schwartz Z, Boyan BD. Decellularized muscle supports new muscle fibers and improves function following volumetric injury. *Tissue Eng Part A*. 24:1228-1241. 2018.

Meana A, Iglesias J, Del Río M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Román F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix base on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 24:621-630. 1998.

Merritt EK, Hammers DW, Tierney M, Suggs LJ, Walters TJ, Farrar RP. Functional assessment of skeletal muscle regeneration utilizing homologous extracellular matrix as scaffolding. *Tissue Eng Part A*. 16:1395–1405. 2010.

Mertens JP, Sugg KB, Lee JD, Larkin LM. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue. *Regen Med*. 9:89-100. 2014.

Micera, A, Lambiase A, Stampachiachiere B, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA^(NGFR) and p75^(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev*. 18:245–256. 2007.

Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol*. 98:1-21. 2006.

Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and literature review. *J Nippon Med Sch*. 76:56-66. 2009.

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz P, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 109:199-209. 2002.

Mizuno H. The potential for treatment of skeletal muscle disorders with adipose-derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 5:133-136. 2010.

Montarras D, L'Honore A, Buckingham M. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J.* 280:4036–4050. 2013.

Muhamed J, Revi D, Joseph R, Anilkumar T. Phenotypic modulation of cell types around implanted polyethylene terephthalate fabric in rabbit muscle. *Toxicol Pathol.* 41:497-507. 2013.

Munirah S, Kim SH, Ruszymah BH, Khang G. The use of fibrin and poly (lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an *in vivo* analysis. *Eur Cell Mater.* 15:41-52. 2008.

Muñiz C, Teodosio C, Mayado a, Amaral AT, Matarraz S, Bárcena, Sánchez ML, Álvarez-Twose I, Díez-Campelo M, García-Montero AC, Blanco JF, Del Cañizo MC, del Pino Montes J, Orfao A. *Ex vivo* identification and characterization of a population of CD13^(high) CD105⁽⁺⁾ CD45⁽⁻⁾ mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem Cell Res Ther.* 6:169. 2015.

Muñoz-Cánoves P, Carvajal JJ, Lopez de Munain A, Izeta A. Editorial: Role of stem cells in skeletal muscle development, regeneration, repair, aging, and disease. *Front Aging Neurosci.* 8:95: 1-4. 2016.

Nabavinia M, Khoshfetrat AB, Naderi-Meshkin H. Nano-hydroxyapatite-alginate-gelatin microcapsule as a potential osteogenic building block for modular bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 97:67-77. 2019.

Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 32:762- 798. 2007.

Nakayama KH, Alcazar C, Yang G, Quarta M, Paine P, Doan L, Davies A, Rando TA, Huang NF. Rehabilitative exercise and spatially patterned nanofibrillar scaffolds enhance vascularization and innervation following volumetric muscle loss. *Regen Med.* 3:16. 2018

Nakayama KH, Shayan M, Huang NF. Engineering biomimetic materials for skeletal muscle repair and regeneration. *Adv Healthc Mater.* 8:e1801168. 2019.

Neuss S, Apel C, Buttler P, Denecke B, Dhanasingh A, Ding X, Grafahrend D, Groger A, Hemmrich K, Herr A, Jahnchen-Dechent W, Mastitskaya S, Perez-Bouza A, Rosewick S, Salber J, Waltje M, Zenke M. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cells-based tissue engineering. *Biomaterials.* 29:302-313. 2008.

Niiyama T, Higuchi I, Uchida Y, Horikiri T, Arimura K, Osame M. Skeletal muscle abnormalities in two patients with dystonia. *Acta Neuropathol.* 104:670-673. 2002.

Noah EM, Winkel R, Schramm U, Kühnel W. Impact of innervation and exercise on muscle regeneration in neovascularized muscle grafts in rats. *Ann Anat.* 184:189-197. 2002.

Nunes VA, Cavaçana N, Canovas M, Strauss BE, Zatz M. Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin *in vitro* only after exposure to *in vivo* muscle environment. *Biol Cell.* 99:185-196. 2007.

Ostrovidov S, Hosseini V, Ahadian S, Fujie T, Parthiban SP, Ramalingam M, Bae H, Kaji H, Khademhosseini A. Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 20:403–436. 2014.

Ostrovidov S, Ahadian S, Ramon-Azcon J, Hosseini V, Fujie T, Parthiban SP, Shiku H, Matsue T, Kaji H, Ramalingam M, Bae H, Khademhosseini A. Three-dimensional co-culture of C2C12/PC12 cells improves skeletal muscle tissue formation and function. *J Tissue Eng Regen Med.* 11:582-595. 2017.

Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat.* 215:477-497. 2009.

Page RL, Malcuit C, Vilner L, Vojtic I, Shaw S, Hedblom E, Hu J, Pins GD, Rolle MW, Dominko T. Restoration of skeletal muscle defects with adult human cells delivered on fibrin microthreads. *Tissue Eng Part A.* 17:2629–2640. 2011.

Pantelic MN y Larkin LM. Stem cells for skeletal muscle tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 24:373-391. 2018.

Parenteau-Bareil P, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials.* 3:1863–1887. 2010.

Passipieri JA, Christ GK. The potential of combination therapeutics for more complete repair of volumetric muscle loss injuries: the role of exogenous growth factors and/or progenitor cells in implantable skeletal muscle tissue engineering technologies. *Cells Tissues Organs.* 202:202-2013. 2016.

Pelatti MV, Gomes JP, Vieira NM, Cangussu E, Landini V, Andrade T, Sartori M, Patrus L, Zatz M. Transplantation of human adipose mesenchymal stem cells in non-immunosuppressed GRMD dogs is a safe procedure. *Stem Cell Rev.* 12:448-453. 2016.

Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol.* 35:184-192. 2004.

Peña J, Jimena I. Avances en el proceso de la regeneración muscular. En: *Curso de Medicina y Traumatología del Deporte.* (Fernando Jiménez-Díaz FJ y A. Caballero). Quaderna Editorial, Toledo, pp. 127-144. 2008.

- Peña J, Jimena I. Histoarquitectura del músculo esquelético. Elementos conjuntivo, nervioso y vascular. En: *Lesiones Musculares en el Deporte*. (Ramon Balús Matas y Carles Pedret Carballido, coords.). Editorial Médica Panamericana, Madrid. pp. 17-27. 2013.
- Peña J, Jimena I, Luque E, Vaamonde R. New fiber formation in rat soleus muscle following administration of denervated muscle extract. *J Neurol Sci*. 128:14-21. 1995.
- Peña J, Luque E, Noguera F, Jimena I, Vaamonde R. Experimental induction of ring fibers in regenerating skeletal muscle. *Pathol Research Pract*. 197:21-27. 2001.
- Peña J, Luque E, Jimena I, Noguera F, Vaamonde R. Abnormalities in tenectomized muscle fiber repair. *Eur J Anat*. 11:37-45. 2007.
- Peña J, Luque E. Histoarquitectura del músculo esquelético. Músculo esquelético. En: *Lesiones Musculares en el Deporte*. (Ramon Balús Matas y Carles Pedret Carballido, coords.). Editorial Médica Panamericana, Madrid. pp. 3-16. 2013.
- Perniconi B, Costa A, Aulino P, Teodori L, Adamo S, Coletti D. The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffolds from skeletal muscle. *Biomaterials*. 32:7870-7882. 2011.
- Pessina P, Cabrera D, Morales MG, Riquelme CA, Gutiérrez J, Serrano AL, Brandan E, Muñoz-Cánoves P. Novel and optimized strategies for inducing fibrosis *in vivo*: focus on Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*. 4:7. 2014.
- Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*. 5:101. 2014.
- Piccoli M, Trevisan C, Maghin E, Franzin C, Pozzobon M. Mouse skeletal muscle decellularization. *Methods Mol Biol*. 1577:87-93. 2017.
- Pillen S, Arts IMP, Zwarts MJ. Muscle ultrasound in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 37:679–693. 2008.
- Plaghki L. Régénération et myogenèse du muscle strié. *J Physiol (Paris)*. 80:51-110. 1985.
- Pleasure D. Advances in translational research in neuromuscular diseases. *Arch Neurol*. 68:429-433. 2011.
- Pradel W, Lauer G. Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus. *Ann Anat*. 194:545-548. 2012.
- Pollot BE, Goldman SM, Wenke JC, Corona BT. Decellularized extracellular matrix repair of volumetric muscle loss injury impairs adjacent bone healing in a rat model

of complex musculoskeletal trauma. *J Trauma Acute Care Surg.* 81:(5 Suppl 2):S184-S190. 2016.

Porzionato A, Sfriso MM, Pontini A, Macchi V, Petrelli L, Pavan PG, Natali AN, Bassetto F, Vindigni V, De Caro R. Decellularized human skeletal muscle as biologic scaffold for reconstructive surgery. *Int J Mol Sci.* 16:14808-14831. 2015.

Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 19:4117. 2018.

Purslow PP. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp Biochem Physiol: A Mol Integr Physiol.* 133:947-966. 2002.

Puthuchery ZA, Phadke R, Rawal J, McPhail MJ, Sidhu PS, Rowleron A, Moxham J, Harridge S, Hart N, Montgomery HE. Qualitative ultrasound in acute critical illness muscle wasting. *Crit Care Med.* 43:1603-1611. 2015.

Qazi TH, Mooney DJ, Pumberger M, Geissler S, Duda GN. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials.* 253:502-521. 2015.

Qiu X, Liu S, Zhang H, Zhu B, Su Y, Zheng C, Tian R, Wang M, Kuang H, Zhao X, Jin Y. Mesenchymal stem cells and extracellular matrix scaffold promote muscle regeneration by synergistically regulating macrophage polarization toward the M2 phenotype. *Stem Cell Res Ther.* 9:88. 2018.

Quarta M, Cromie M, Chacon R, Blonigan J, Garcia V, Akimenko I, Hamer M, Paine P, Stok M, Shrager JB, Rando TA. Bioengineered constructs combined with exercise enhance stem cell-mediated treatment of volumetric muscle loss. *Nat Commun.* 8:15613. 2017.

Quarta M, Cromie Lear ML, Blonigan J, Paine P, Chacon R, Rando TA. Biomechanics show stem cell necessity for effective treatment of volumetric muscle loss using bioengineered constructs. *NPJ Regen Med.* 3:e18. 2018.

Ratajczak MZ, Liu R, Ratajczak J, Kucia M, Shin DM. The role of pluripotent embryonic-like stem cells residing in adult tissues in regeneration and longevity. *Differentiation.* 81:153-161. 2011.

Reichl S, Muller-Goymann CC. The use of porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunol hydrochloride. *Int J Pharm.* 250:191-201. 2003.

Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 139:2845-2856. 2012.

Rana D, Zreiqat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 11:942-965. 2017.

Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. *Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells.* *Lab Invest.* 72:341-347. 1995.

Rathbone CR, Yamanouchi K, Chen XK, Nevoret-Bell CJ, Rhoads RP, Allen RE. Effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. *J Muscle Res Cell Motil.* 32: 99–109. 2011.

Rivera-Izquierdo M, Cabeza L, Laínez-Ramos-Bossini A, Quesada R, Perazzoli G, Alvarez P, Prados J, Melguizo C. An updated review of adipose derived-mesenchymal stem cells and their applications in musculoskeletal disorders. *Expert Opin Biol Ther.* 19:233-248. 2019.

Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies MK. Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biol.* 34:66-83. 2010.

Ruz-Caracuel I, Leiva-Cepas F, Luque E, Jimena I, Peña J. Relaciones topográficas entre capilares, fibras musculares y células satélites durante la regeneración. *Actual Med.* 98:27-32. 2013.

Ruvinov E, Tavor Re'em T, Witte F, Cohen S. Articular cartilage regeneration using acellular bioactive affinity-binding alginate hydrogel: A 6-month study in a mini-pig model of osteochondral defects. *J Orthop Translat.* 16:40-52. 2019.

Saadeh PB, Khosla RK, Mehrara BJ, Steinbrech DS, McCormick SA, DeVore DP, Longaker MT. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J Craniofac Surg.* 12:573-579. 2001.

Sacco P, Furlani F, De Marzo G, Marsich E, Paoletti S, Donati I. Concepts for developing physical gels of chitosan and of chitosan derivatives. *Gels.* 4:67. 2018.

Sakar MS, Neal D, Boudou T, Borochin MA, Li Y, Weiss R, Kamm RD, Chen CS, Asada HH. Formation and optogenetic control of engineered 3D skeletal muscle bioactuators. *Lab Chip.* 12:4976-4985. 2012.

Salvatori G, Lattanzi L, Coletta M, Aguanno S, Vivarelli E, Kelly R, Ferrari G, Harris AJ, Mavilio F, Molinaro M, Cossu G. Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells. *J Cell Sci.* 108:2733-2739. 1995.

Sarnat HB. *Muscle Pathology and Histochemistry.* American Society of Clinical Pathology Press. Chicago. 1983.

- Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 278:12601-12604. 2003.
- Sarrafian TL, Bodine SC, Murphy B, Grayson JK, Stover SM. Extracellular matrix scaffolds for treatment of large volume muscle injuries: A review. *Vet Surg.* 47:524-535. 2018.
- Satoh A, Labrecque C, Tremblay JP. Myotubes can be formed within implanted adipose tissue. *Transplant Proc.* 24:3017-3019. 1992.
- Saxena AK, Marler J, Benvenuto M, Willital GH, Vacanti JP. Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies. *Tissue Eng.* 5:525-531. 1999.
- Schäffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 25:818-827. 2007.
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 91:1447-1531. 2011.
- Sciorati C, Clementi E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players. *Cell Mol Life Sci.* 72:2135-2156. 2015.
- Scott DJ, Watson JD, Heafer TA, Clemens MS, Propper BW, Arthurs ZM. Validation of the short musculoskeletal function assessment in patients with battlefield-related extremity vascular injuries. *J Vasc Surg.* 60:1620-1626. 2014.
- Selva Raj I, Bird SR, Shield AJ. Ultrasound measurements of skeletal muscle architecture are associated with strength and functional capacity in older adults. *Ultrasound Med Biol.* 43:586-594. 2017
- Seol YJ, Lee JY, Park YJ, Lee MY, Young-Ku, Rhyu IC, Lee SJ, Han SB, Chung CP. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett.* 26:1037-1341. 2004.
- Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, Ardite E, Perdiguero E, Muñoz-Canoves P. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr Top Dev Biol.* 96:167-201. 2011.
- Shah AM, Al-Chalabi A. New therapies for neuromuscular diseases in 2018. *Lancet Neurol.* 18:12-13. 2019.
- Shanely RA, Zwetsloot KA, Triplett NT, Meaney MP, Farris GE, Nieman DC. Human skeletal muscle biopsy procedures using the modified Bergström technique. *J Vis Exp.* 91:e51812. 2014.

Shi X1, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20:1692-1708. 2006.

Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov.* 16:115-130. 2017.

Shier WT. Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing used nucleated freezing. *Cryobiology.* 25:110-120. 1988.

Shin YC, Lee JH, Jin L, Kim MJ, Kim YJ, Hyun JK, Jung TG, Hong SW, Han DW. Stimulated myoblast differentiation on graphene oxide-impregnated PLGA-collagen hybrid fibre matrices. *J Nanobiotechnology.* 13:21. 2015.

Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Clark RA, Prestwich GD. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A.* 68:365-375. 2004.

Shvartsman D, Storrie-White H, Lee K, Kearney C, Brudno Y, Ho N, Cezar C, McCann C, Anderson E, Koullias J, Tapia JC, Vandeburgh H, Lichtman JW, Mooney DJ. Sustained delivery of VEGF maintains innervation and promotes reperfusion in ischemic skeletal muscles via NGF/GDNF signaling. *Mol Ther.* 22:1243–1253. 2014.

Sicari BM, Agrawal V, Siu BF, Medberry CJ, Dearth CL, Turner NJ, Badylak SF. A murine model of volumetric muscle loss and a regenerative medicine approach for tissue replacement. *Tissue Eng. Part A.* 18:1941–1948. 2012.

Sicari BM, Dearth CL, Badylak SF. Tissue engineering and regenerative medicine approaches to enhance the functional response to skeletal muscle injury. *Anat Rec (Hoboken).* 297:51-64. 2014a.

Sicari BM, Rubin JP, Dearth CL, Wolf MT, Ambrosio F, Boninger M, Turner NJ, Weber DJ, Simpson TW, Wyse A, Brown EHP, Dziki JL, Fisher LE, Brown S, Badylak SF. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. *Sci Transl Med.* 6:234-258. 2014b.

Sicari BM, Dziki JL, Badylak SF. Strategies for functional bioscaffold-based skeletal muscle reconstruction. *Ann Transl Med.* 3:256. 2015.

Sikdar S, Diao G, Turo D, Stanley CJ, Sharma A, Chambliss A, Laughrey L, Aralar A, Damiano DL. Quantification of muscle tissue properties by modeling the statistics of ultrasound image intensities using a mixture of gamma distributions in children with and without cerebral palsy. *Ultrasound Med.* 37:2157-2169. 2018.

Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, de Mello W, Riederer I, Di Santo JP, Savino W, Mouly V. Human myoblast engraftment is improved in laminin-enriched microenvironment. *Transplantation*. 85:566-575. 2008.

Silva García JM, Panitch A, Calve S. Functionalization of hyaluronic acid hydrogels with ECM-derived peptides to control myoblast behavior. *Acta Biomater*. 84:169-179. 2019.

Sindberg GM, Lindborg BA, Wang Q, Clarkson C, Graham M, Donahue R, Hering BJ, Verfaillie CM, Bansal-Pakala P, O'Brien TD. Comparisons of phenotype and immunomodulatory capacity among rhesus bone-marrow-derived mesenchymal stem /stromal cells, multipotent adult progenitor cells, and dermal fibroblasts. *J Med Primatol*. 43:231-241. 2014.

Siqueira P, Siqueira É, de Lima AE, Siqueira G, Pinzón-Garcia AD, Lopes AP, Segura M, Isaac A, Pereira FV, Botaro VR. Three-dimensional stable alginate-nanocellulose gels for biomedical applications: towards tunable mechanical properties and cell growing. *Nanomaterials (Basel)*. 9:78. 2019.

Skuk D, Tremblay JP. Cell therapies for inherited myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 15:723-729. 2003.

Smith AS, Passey SL, Martin NR, Player DJ, Mudera V, Greensmith L, Lewis MP. Creating interactions between tissue-engineered skeletal muscle and the peripheral nervous system. *Cells Tissues Organs*. 202:143-158. 2016.

Smith MS, DaCambra MP, McAlister VC. Impact of traumatic upper-extremity amputation on the outcome of injury caused by an antipersonnel improvised explosive device. *Can J Surg*. 61:S203-S207. 2018.

Smythe GM, Davies MJ, Paulin D, Grounds MD. Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion *in vivo* in regenerating grafts of skeletal muscle. *Cell Tissue Res*. 304:287-294. 2001.

Sohn DS, Bae MS, Choi BJ, An KM, Shin HI. Efficacy of demineralized bone matrix paste for maxillary sinus augmentation: a histologic and clinical study in humans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 108:30-35. 2009.

Solchaga LA, Gao J, Dnnis JE, Awadallah A, Lundberg M, Caplan AI, Goldberg VM. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng*. 8:333-347. 2002.

Song F, Stocum DL. Amphibians as research models for regenerative medicine. *Organogenesis*. 6:141-150. 2010.

Spinazzola JM, Gussoni E. Exosomal small talk carries strong messages from muscle stem cells. *Cell Stem Cell*. 20:1-3. 2017.

Srikuea R, Hirunsai M. Effects of intramuscular administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ during skeletal muscle regeneration on regenerative capacity, muscular fibrosis, and angiogenesis. *J Appl Physiol*. 120: 1381-1393. 2016.

Stern-Straeter J, Riedel F, Bran G, Hörmann K, Goeseler UR. Advances in skeletal muscle tissue engineering. *In vivo*. 21:435-444. 2007.

Stevens MM, Mayer M, Anderson DG, Weibel DB, Whitesides GM, Langer R. Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. *Biomaterials*. 26:7636-7641. 2005.

Stocum DL. Regenerative biology and engineering: strategies for tissue restoration. *Wound Repair Regen*. 6:276-290. 1998.

Stocum DL. Regenerative biology and medicine. *J Musculoskel Neuron Interact*. 2:270-273. 2002.

Suárez de Lezo J, Herrera C, Pan M, Romero M, Pavlovic D, Segura J, Sánchez J, Ojeda S, Torres A. Regenerative therapy in patients with a revascularized acute anterior myocardial infarction and depressed ventricular function. *Rev Esp Cardiol*. 60:357-365. 2007.

Sun T, Li X, Shi Q, Wang H, Huang Q, Fukuda T. Microfluidic spun alginate hydrogel microfibers and their application in tissue engineering. *Gels*. 4:38. 2018.

Syverud BC, Lee JD, Van Dusen KW, Larkin LM. Isolation and purification of satellite cells for skeletal muscle tissue engineering. *J Regen Med*. 3:117. 2015.

Syverud BC, VanDusen KW, Larkin LM. Growth factors for skeletal muscle tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 202:169-179. 2016.

Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in developmental *versus* regenerative myogenesis. *J Intern Med*. 266:372-389. 2009.

Takeuchi K, Hatade T, Wakamiya S, Fujita N, Arakawa T, Miki A. Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. *Acta Histochem*. 116:327-334. 2014.

Tanzi MC, Faré S, Draghi L, Altomare L. Scaffolds for muscle tissue engineering. *Basic Appl Myol*. 16:117-118. 2006.

Taylor CR, Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods. IHC Guidebook. Sixth Edition Dako Denmark A/S. 2013.

Tchao J, Kim JJ, Lin B, Salama G, Lo CW, Yang L, Tobita K. Engineered human muscle tissue from skeletal muscle derived stem cells and induced pluripotent stem cell derived cardiac cells. *Int J Tissue Eng*. 2013:198762. 2013.

Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol*. 224:7-16. 2010.

Tennent DJ, Polfer EM, Sgromolo NM, Krueger CA, Potter BK. Characterization of disability following traumatic through knee and transfemoral amputations. *Injury*. 49:1193-1196. 2018.

Teodori L, Costa A, Marzio R, Perniconi B, Coletti D, Adamo S, Gupta B, Tarnok A. Native extracellular matrix: a new scaffolding platform for repair of damaged muscle. *Front Physiol*. 5:218. 2014.

Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 257:491-496. 1957.

Thorrez L, Shansky J, Wang L, Fast L, VandenDriessche T, Chuah M, Mooney D, Vandenburg H. Growth, differentiation, transplantation and survival of human skeletal myofibers on biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 29:75–84.2008.

Thowfeequ S, Myatt EJ, Tosh D. Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev Dyn*. 236:3208-3217. 2007.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288:R345–R353. 2005.

Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298: R1173-R1187. 2010.

Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol*. 1:2029-2062. 2011.

Tithito T, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Tang IM, Pon-On W. Fabrication of biocomposite scaffolds made with modified hydroxyapatite inclusion of chitosan-grafted-poly(methyl methacrylate) for bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 142:025013. 2019.

Tottey S, Corselli M, Jeffries EM, Londono R, Peault B, Badylak SF. Extracellular matrix degradation products and low-oxygen conditions enhance the regenerative potential of perivascular stem cells. *Tissue Eng (Part A)*. 17:37-44. 2011.

Toole BP, Gross J. The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol*. 25:57-77. 1971.

Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 347:759–774. 2012.

Turner NJ, Badylak JS, Weber DJ, Badylak SF. Biologic scaffold remodeling in a dog model of complex musculoskeletal injury. *J Surg Res.* 176:490–502. 2012.

Turrina A, Martínez-González MA, Stecco C. The muscular force transmission system: role of the intramuscular connective tissue. *J Bodyw Mov Ther.* 17:95-102. 2013.

Usas A, Huard J. Muscle derived stem-cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials.* 28:5401- 5406. 2007.

Urciuolo A, De Coppi P. Decellularized tissue for muscle regeneration. *Int J Mol Sci.* 19:e2392. 2018.

Urciuolo A, Urbani L, Perin S, Maghsoudlou P, Scottoni F, Gjinovci A, Collins-Hooper H, Loukogeorgakis S Tyraskis A, Torelli S, Germinaro E, Fallas MEA, Julia-Vilella C, Eaton S, Blaauw B, Patel K, De Coppi P. Decellularised skeletal muscles allow functional muscle regeneration by promoting host cell migration. *Sci Rep.* 8:8398. 2018.

Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibers may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscul Disord.* 12:584-587. 2002.

Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials.* 31:7475–7484. 2010.

Vallée M, Côté JF, Fradette J. Adipose-tissue engineering: Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol.* 57:309–317. 2009.

Van Deutekom JCT, Hoffman EP, Huard J. Muscle maturation: implications for gene therapy. *Mol Med Today.* 4:214-220. 1998.

VanDusen KW, Syverud BC, Williams ML, Lee JD, Larkin LM. Engineered skeletal muscle units for repair of volumetric muscle loss in the *tibialis anterior* muscle of a rat. *Tissue Eng Part A.* 20:2920-2930. 2014.

van Wachem PB, Brouwer LA, van Luyn MJ. Absence of muscle regeneration after implantation of a collagen matrix seeded with myoblasts. *Biomaterials.* 20:419–426. 1999.

van Wachem PB, Plantinga JA, Wissink MJ, Beernink R, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J, van Luyn MJ. *In vivo* biocompatibility of carbodiimide-crosslinked collagen matrices: effects of crosslink density, heparin immobilization, and bFGF loading. *J Biomed Mater Res.* 55:368–378. 2001.

- Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*. 28:589–603. 2010.
- Vignaud A, Hourdé C, Torres S, Caruelle JP, Martelly I, Keller A, Ferry A. Functional, cellular and molecular aspects of skeletal muscle recovery after injury induced by snake venom from *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*. 45:789-801. 2005.
- Viola J, Lal B, Grad O. The emergence of tissue engineering as a research field. *National Science Foundation*, Arlington, VA. 2003. Documento de consenso.
- Vogler TO, Gadek KE, Cadwallader AB, Elston TL, Olwin BB. Isolation, culture, functional assays, and immunofluorescence of myofiber-associated satellite cells. *Methods Mol Biol*. 1460:141-162. 2016.
- Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, Andree C, Schaefer DJ, Galla TJ, Björn G. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec*. 263:372-378. 2001.
- Walters BD, Stegemann JP. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomater*. 10:1488-1501. 2013.
- Wang F, Kong J, Cui YY, Liu P, Wen JY. Is human-induced pluripotent stem cell the best optimal? *Chin Med J (Engl)*. 131:852-856. 2018.
- Wang HD, Lough DM, Kurlander DE, Lopez J, Quan A, Kumar AR. Muscle-derived stem cell-enriched scaffolds are capable of enhanced healing of a murine volumetric muscle loss defect. *Plast Reconstr Surg*. 143:329E-39E. 2019.
- Wang J, Khodabukus A, Rao L, Vandusen K, Abutaleb N, Bursac N. Engineered skeletal muscles for disease modeling and drug discovery. *Biomaterials*. 221:119416. 2019.
- Wang J, Zhou Q. Derivation and application of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Sci China Life Sci*. 59:576–583. 2016.
- Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical mesenchymal stromal cells. *Regen Med*. 6:95-109. 2011.
- Wang L, Cao L, Shansky J, Wang Z, Mooney D, Vandenburgh H. Minimally invasive approach to the repair of injured skeletal muscle with a shape-memory scaffold. *Mol Ther*. 22:1441-1449. 2014.
- Wang ZY, Teo EY, Chong MS, Zhang QY, Lim J, Zhang ZY, Hong MH, Thian ES, Chan JK, Teoh SH. Biomimetic three-dimensional anisotropic geometries by uniaxial stretch of

poly(ϵ -caprolactone) films for mesenchymal stem cell proliferation, alignment, and myogenic differentiation. *Tissue Eng Part C, Methods*. 19:538-549. 2013.

Ward CL, Ji L, Corona BT. An autologous muscle tissue expansion approach for the treatment of volumetric muscle loss. *Biores Open Access*. 4:198-208. 2015.

Ward CL, Pollot BE, Goldman SM, Greising SM, Wenke JC, Corona BT. Autologous minced muscle grafts improve muscle strength in a porcine model of volumetric muscle loss injury. *J Orthop Trauma*. 30:e396-e403. 2016.

Weise C, Dai F, Pröls F, Ketelsen UP, Dohrmann U, Kirsch M, Brand-Saberi B. Myogenin (Myf4) upregulation in trans-differentiating fibroblasts from a congenital myopathy with arrest of myogenesis and defects of myotube formation. *Anat Embryol (Berl)*. 211:639-648. 2006.

Weist MR, Wellington MS, Bermudez JE, Kostrominova TY, Mendias CL, Arruda EM, Larkin LM. TGF β 1 enhances contractility in engineered skeletal muscle. *J Tissue Eng Regen Med*. 7:562–571. 2013.

Wheeldon A, Mace J, Khan WS, Anand S. Biomaterials and fabrication to optimise scaffold properties for musculoskeletal tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 11:578-584. 2016.

White JD, Grounds MD. Harnessing the therapeutic potential of myogenic stem cells. *Cytotechnology*. 41:153-164. 2003.

Williamson MR, Adams EF, Coombes AG. Gravity spun polycaprolactone fibres for soft tissue engineering: interaction with fibroblasts and myoblasts in cell culture. *Biomaterials*. 27:1019–1026. 2006.

Wilson K, Terlouw A, Roberts K, Wolchok JC. The characterization of decellularized human skeletal muscle as a blueprint for mimetic scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 27:125. 2016.

Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, Duda GN, Perka C. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 3:s60-s67. 2012.

Wolf MT, Carruthers CA, Dearth CL, Crapo PM, Huber A, Burnsed OA, Londono R, Johnson SA, Daly KA, Stahl EC, Freund JM, Medberry CJ, Carey LE, Nieponice A, Amoroso NJ, Badylak SF. Polypropylene surgical mesh coated with extracellular matrix mitigates the host foreign body response. *J Biomed Mater Res A*. 102:234–246. 2014.

Wolf MT, Vodovotz Y, Tottey S, Brown BN, Badylak SF. Predicting *in vivo* responses to biomaterials via combined *in vitro* and *in silico* analysis. *Tissue Eng Part C Methods*. 21:148-159. 2015.

Wong DE, Banyard DA, Santos PJF, Sayadi LR, Evans GRD, Widgerow AD. Adipose-derived stem cell extracellular vesicles: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 72:1207-1218. 2019.

Wright B, Parmar N, Bozec L, Aguayo SD, Day RM. A simple and robust method for pre-wetting poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres. *J Biomater Appl*. 30:147-159. 2015.

Wright VJ, Peng H, Huard J. Muscle-based gene therapy and tissue engineering for the musculoskeletal system. *Drug Discovery Today*. 6:728-733. 2001.

Yang S, Leong K, Du Z, Chua C. The desing of scaffolds for use on tissue engineering: part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 7:679-689. 2001.

Yang J, Jao B, McNally AK, Anderson JM. *In vivo* quantitative and qualitative assesment of foreign body giant cell formation on biomaterials in mice deficient in natural killer lymphocyte subsets, mast cells, or the interleukin-4 receptor alpha and in severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res A*. 102:2017–2023. 2014.

Yang GH, Lee J, Kim G. The fabrication of uniaxially aligned micro-textured polycaprolactone struts and application for skeletal muscle tissue regeneration. *Biofabrication*. 11:025005. 2019.

Yannas IV. Tissue and Organ Regeneration in Adults. New York. Springer-Verlag. 2001.

Yoshimura K, Harii K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J Surg Res*. 81:139-146. 1999.

Yusuf F, Brand-Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol*. 138:187-199. 2012.

Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 72:19-32. 2017

Zhang J, Dhoot G. Localized and limited changes in the expression of myosin heavy chains in injured skeletal muscle fibers being repaired. *Muscle Nerve*. 21:469-481. 1998.

Zhang J, Hu ZQ, Turner NJ, Teng SF, Cheng WY, Zhou, HY, Zhang L, Hu HW Wang Q, Badylak, SF. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template. *Biomaterials*. 89:114–126. 2016.

Zhang L, Ran L, Garcia GE, Wang XH, Han S, Du J, Mitch WE. Chemokine CXCL16 regulates neutrophil and macrophage infiltration into injured muscle, promoting muscle regeneration. *Am J Pathol*. 175:2518-2527. 2009.

Zhang P, Liang X, Shan T, Jiang Q, Deng C, Zheng R, Kuang S. mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 463:102-108. 2015.

Zhang Y, Wang QS, Yan K, Qi Y, Wang G-F, Cui YL. Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part A*. 104A:1863–1870. 2016.

Zhao W, Li J, Jin K, Liu W, Qiu X, Li C. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 59:1181-1194. 2016.

Zhao W, Ju YM, Christ G, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Diaphragmatic muscle reconstruction with an aligned electrospun poly(ϵ -caprolactone)/collagen hybrid scaffold. *Biomaterials*. 34:82. 2013.

Zimowska M, Kasprzycka P, Bocian K, Delaney K, Jung P, Kuchcinska K, Kaczmarek K, Gladysz D, Streminska W, Ciemerych MA. Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 55:400-409. 2017.

Zou K, De Lisio M, Huntsman HD, Pincu Y, Mahmassani Z, Miller M, Olatunbosun D, Jensen T, Boppart MD. Laminin-111 improves skeletal muscle stem cell quantity and function following eccentric exercise. *Stem Cells Transl Med*. 3:1013-1022. 2014.

Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR, Secco M, Jazedje T, Costa Valadares M, Fussae Suzuki M, Bartolini P, Vainzof M, Zatz M. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J Biomed Biotechnol*. 2011:715251. 2011.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7:211-28. 2001.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13:4279-4295. 2002.

Indicios de calidad

Anexos

