



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
SUPERIORES, UNIDAD LEÓN

TEMA:

“Análisis experimentales sobre la re-
esterilización de la matriz dérmica acelular”

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

MOISÉS EDUARDO JIMÉNEZ SANTIBÁÑEZ

TUTOR: CDEP Adrián León Gómez

ASESOR: CDEP Gabriela Hernández Gómez

LEÓN, GTO. 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Interdisciplinarias, en el área de Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León. Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la dirección del Dr. René García Contreras y la asesoría de la Mtra. Esperanza Fonseca Luciano.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme forjarme como profesionalista en la mejor universidad de México.

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León por formarme y verme nacer durante 4 años como Odontólogo.

Al Laboratorio Interdisciplinario de Investigación, en el área de Nanoestructuras y Biomateriales por apoyar mi investigación y brindarme todos los recursos necesarios.

Al Dr. Adrián León Gómez por su colaboración, disponibilidad, observaciones y permitirme ser parte de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Hernández Gómez por su colaboración, paciencia, optimismo, consejos y observaciones en este trabajo.

A la Mtra. Esperanza Fonseca Luciano y al Dr. René García Contreras por su gran disponibilidad, paciencia, transmisión de conocimientos, correcciones y consejos a lo largo de este trabajo.

Dedicatorias

A Dios pues gracias a él estoy aquí y todo lo que logrado ha sido de la mano de él.

A mi madre por tu infinito amor, apoyo y confianza hacia mí; por ser mi guía, mi paciente y consejera de vida, gracias por ser mi gran pilar de vida.

A mi padre símbolo de esfuerzo, honestidad y trabajo duro. Gracias por tu inmensa paciencia y amor; sin ti, no hubiera llegado hasta donde estoy.

A mi hermano Alejandro por su apoyo y confianza durante todos estos años.

A Karen Isabel por tu apoyo, con todo el afecto y cariño hacia ti.

A mis amigos pues con su compañía hicieron más ameno éste camino de trabajo duro y sacrificio.

Índice

Agradecimientos	4
Dedicatorias	5
1 Resumen	8
Palabras Clave.....	9
2 Introducción	10
3 Antecedentes	12
4 Marco teórico	14
4.1 MDA	14
4.2 Usos de la MDA	15
4.3 MDA en odontología.....	16
4.4 Presentaciones de la MDA.....	17
4.5 Pruebas serológicas de la MDA	18
4.6 Factores de riesgo por una infección del aloinjerto	19
4.7 Técnica de procesamiento de tejido	19
4.8 Indicaciones/usos de la MDA en odontología	21
4.9 Ventajas de la MDA.....	21
4.10 Desventajas de la MDA	21
4.11 Luz UV esterilizadora.....	22
4.12 Microflora bacteriana en el ambiente bucal sano	23
5 Planteamiento del problema	25
6 Justificación	26
7 Objetivo general	27
8 Objetivos específicos	28
9 Pregunta de investigación	29
10 Hipótesis	30
11 Metodología	31
11.1 Diagrama experimental.....	31
11.2 Desarrollo experimental.....	33
11.2.1 Tipo de estudio:	33
11.2.2 Variables independientes:.....	33
11.2.3 Variables dependientes:.....	33
11.2.4 Criterios de inclusión:	33

11.2.5 Criterios de exclusión:	33
11.2.6 Criterios de eliminación:	33
11.2.7 Universo:.....	34
11.2.8 Muestra:	34
11.2.9 Tamaño de muestra:.....	34
11.2.10 Material y equipo para protocolo de re-esterilización de la MDA con luz UV	34
11.2.11 Material y equipo utilizado para prueba de caracterización de la MDA.....	35
11.2.12 Material y equipo para prueba de degradación de la MDA	37
11.2.13 Material y equipo para prueba de actividad antimicrobiana de la MDA	40
11.2.14 Material y equipo para la prueba de citotoxicidad de la MDA:.....	46
12 Resultados	56
12.1 Prueba de caracterización de la MDA:.....	56
12.2 Prueba de degradación de la MDA:.....	58
12.3 Prueba de actividad antimicrobiana de la MDA:.....	61
12.4 Prueba de citotoxicidad de la MDA:.....	67
12.4.1 Citotoxicidad contacto directo	68
12.4.2 Citotoxicidad contacto indirecto	71
13 Implicaciones bioéticas	74
14 Discusión	74
15 Conclusiones	76
16 Bibliografía	77

1 Resumen

La matriz dérmica acelular (MDA) es un aloinjerto que proviene de tejido humano donante el cuál ha seguido un proceso riguroso de desinfección y esterilización dependiendo de la marca comercial de la cual provenga; pues, muchas de éstas casas comerciales tiene procesos patentados que les dan diferentes características mecánicas y biológicas para aplicarse según los diferentes propósitos quirúrgicos por los que ha sido diseñado dicho aloinjerto; que en nuestro caso es utilizado para cirugía periodontal, abarcando diferentes procedimientos quirúrgicos periodontales como: aumento de reborde alveolar hasta recubrimientos de recesiones gingivales. El propósito del presente estudio es conocer los efectos de caracterización, de degradación, antimicrobiano y citotoxicidad sobre la re-esterilización de una matriz dérmica acelular (MDA) sometiéndola a irradiación ultravioleta (potencia de 365 mW/mm y longitud de onda 253.7 nm) a una distancia de 2 cm para cada unas de las pruebas. Las características físicas de la MDA se observaron en microscopio estereoscópico, la prueba de degradación se hizo mediante espectrofotómetro midiendo la absorbancia de la MDA, el efecto antimicrobiano fue determinado por la difusión en agar de diferentes medios de cultivo para la detección de bacterias específicas que se encuentran más comúnmente en el ambiente bucal sano como: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* y *Capnocytophaga*, y en la prueba citotoxicidad se evaluó la viabilidad celular usando cultivos de células orales con fibroblastos gingivales humanos (FGH) determinada por el método MTT durante 24 y 48 horas, el plato de cultivo fue utilizado como grupo control. Los datos fueron sometidos a prueba de normalidad t-student, la significancia estadística fue fijada a un $p < 0.05$. Al obtener los resultados de las pruebas anteriormente mencionadas, la re-esterilización antes y después con luz ultravioleta (UV) de la MDA no presentó cambios físicos al observarla bajo microscopio estereoscópico, tampoco hubo cambios significativos en la degradación de la MDA observándola 0, 24, 48, 96 y 168 horas midiendo la absorbancia en espectrofotómetro, el efecto antimicrobiano

evaluado a las 24 y 48 horas no reportó crecimiento bacteriano y por último no mostró disminución de la proliferación células orales a las 24 y 48 horas. Por lo tanto la re-esterilización de la MDA no altera el efecto en cultivo con FGH y muestra un comportamiento eficaz para inhibir la actividad bacteriana, además de que no se ven comprometidas las propiedades biomecánicas del aloinjerto por lo que se podría descartar un riesgo intra-operatorio y post-operatorio el cual podría comprometer el bienestar del paciente y el éxito clínico del tratamiento. Lo que sugiere que puede ser una alternativa rápida para utilizar remanentes de la MDA en futuros procesos quirúrgicos y una ventaja económica por parte del paciente para acceder a éste tipo de tratamientos.

Palabras Clave

Periodoncia, aloinjertos, regeneración celular, matriz extracelular, luz ultravioleta, fibroblastos gingivales humanos.

2 Introducción

Los procedimientos de cirugía mucogingival en los que requiere el uso de injertos, se han realizado en el área de periodoncia por varios años, principalmente por causa de sensibilidad dental, además del riesgo de desarrollarse caries radicular; para el tratamiento de éste tipo de casos se ha usado tejido del mismo paciente (autoinjerto) y diferentes tipos de biomateriales en el mercado, los cuales han sido prefabricados por distintas casas comerciales y para distintos usos clínicos¹ sobre hueso o tejidos blandos del paciente, teniendo su origen de un donante de la misma especie (aloinjerto) o de distinta especie (xenoinjerto)².

La MDA es un aloinjerto que ha estado en uso por más de dos décadas en el área de odontología, específicamente en periodoncia; sin embargo, tienen más aplicaciones en medicina en áreas como: Urología, cirugía general, cirugía estética, otorrinolaringología etc., pues se creó éste aloinjerto en un principio para el tratamiento de quemaduras en piel y reconstrucción de pared abdominal con excelentes resultados clínicos. En el área de odontología los tipos de tratamiento en lo que se usa van desde los recubrimientos por recesiones gingivales hasta los aumentos de reborde alveolar²⁻³. Éste tipo de aloinjertos tienen la capacidad de regenerar tejido, aumentarlo, proporcionar una nueva neovascularización y formar parte del nuevo tejido gingival proporcionando resultados estéticos para el paciente³. La principal desventaja de éste aloinjerto es su elevado costo en el mercado³⁻⁴, disminuyendo la posibilidad de usar éste material.

Por éste motivo es que se busca una alternativa para hacer más accesible la utilización de la MDA, en este caso, usar las presentaciones más grandes de la MDA para luego seccionarlas en partes más pequeñas utilizando material quirúrgico y posteriormente realizar una re-esterilización individual de las secciones y almacenar el resto de la MDA bajo las instrucciones del fabricante. Además, conservarlo según el tiempo de caducidad que se indique; por lo tanto, se podría aprovechar de una manera más eficiente el aloinjerto, incluso se podría

disminuir el costo del procedimiento quirúrgico y la obtención de éste material, igualmente también otra ventaja importante es la de realizar una esterilización completa del material, puesto que varios de estos productos realizan una desinfección aséptica del injerto¹ sin llevar a cabo un procedimiento estéril como tal, ya que esto podría comprometer la integridad estructural del injerto. Pues otras medidas desinfectantes y esterilizadoras como: Horno de calor en seco y autoclave pueden comprometer la estabilidad del injerto¹, puesto que al utilizar altas temperaturas para la eliminación de bacterias desnaturalizaría las proteínas⁵ que forman parte de la MDA afectando su arquitectura, funciones regenerativas y neovascularizadoras; pero más importante, al paciente mismo. Por esta razón es que las diferentes casas comerciales tratan el tejido donante con procesos asépticos patentados y se desconoce el procedimiento por el que ha pasado cada tejido. Por consiguiente en éste estudio se presentan y describen los ensayos experimentales que demuestran que la luz UV puede ser una alternativa de re-esterilización de la MDA sin afectar sus propiedades biomecánicas e integridad estructural.

3 Antecedentes

En cuanto a la re-esterilización de un aloinjerto como la MDA, no hay información en la literatura sobre la utilización de irradiación UV para dicho fin, la mayoría de las casas comerciales solo utilizan procesos asépticos para esterilizar su material como se dijo anteriormente, otros pocos utilizan el esterilizado terminal ya sea con irradiación gamma o haz de electrones para luego empaquetar el producto y posteriormente usarlo en pacientes^{1,4,7}, no obstante se ha reportado en la literatura el daño que ocasiona éste tipo de método esterilizador.

En 1994 se introdujo la MDA en periodoncia, dentro de ésta, hay un componente importante llamada matriz extracelular (MEC) algunos estudios mencionan que la esterilización terminal de andamios de la MEC tiene un daño estructural al someterse a éste tipo de tratamiento esterilizador ya sea con irradiación gamma o haz de electrones.⁸⁻⁹ La incorporación de tejidos y proceso de remodelación se modificaron al usar el aloinjerto⁹, además de la desintegración del colágeno y sus fibras en la capa dérmica, que también forma parte de la MDA.¹⁰⁻¹¹ Otros estudios también informan sobre el daño a las propiedades nativas del injerto, colapsando la naturaleza porosa del andamio, modificando sus características físicas¹². La eliminación de componentes bioactivos que impide que las células anfitrionas interactúen con el andamio y la inhibición de la migración celular al andamio son también reportadas al esterilizar con los tipos de irradiación ya mencionados¹²⁻¹³.

Sun y col. en 2013 realizaron un estudio donde demuestran que la irradiación gamma comprometía los componentes de la MEC, biológicamente y mecánicamente afectando la incorporación y remodelación del tejido ¹⁴.

Matsuka y McFetridge en 2015 comprobaron que la esterilización terminal en la MEC provocaba daños en el tejido estructuralmente y perjudicaba la adhesión e interacciones de las células, lo que provoca que las respuestas celulares no sean óptimas¹⁵.

Mrazova y col. en 2016 hizo una comparación de los cambios estructurales sometiendo a injertos de piel a irradiación gamma y haz de electrones y al presentar sus resultados y observó que hubo desintegración de colágeno en la dermis del aloinjerto¹⁶.

4 Marco teórico

4.1 MDA

La MDA es un aloinjerto el cual es de origen humano donante que ha sido utilizada por más de 20 años en procedimientos quirúrgicos regenerativos en hueso y aumentos de tejido blando¹, sin embargo a principios de los años 90 se utilizó primeramente en pacientes con quemaduras corporales²⁻²⁸. En el mercado hay diferentes marcas que procesan éste tipo de materiales entre las cuales están FlexHDPliable®, Belladerm®¹, Epiflex®⁶, PurosDermis®, Alloderm®²¹, DermaMatrix®, PerioDerm®²⁰, Oracell®, entre otras. Los objetivos de procesar estos tejidos es la de extraer los diferentes componentes celulares y la epidermis, manteniendo solo el entramado de colágeno⁴. Al ser una matriz bioactiva donde además de colágeno, tiene proteínas de elastina y canales de vasos sanguíneos, para soportar la revascularización natural e incluso la remodelación tisular. Otro rasgo característico de ésta matriz es que al ser biocompatible favorece la adaptación del injerto al tejido receptor, no se degrada, sino que se une y forma parte del mismo tejido.⁴⁻²⁸

La disponibilidad y calidad de la MDA dependerá de los bancos tisulares, la selección de los donadores y de cómo procesen los tejidos recuperados, los cuales deben de hacerse bajo los estándares de esterilidad apropiados y bajo las normas gubernamentales por la Asociación Americana de Bancos Tisulares AATB (por sus siglas en inglés)²¹ y la Food and Drug Administration FDA (por sus siglas en inglés) en el artículo 21 CFR parte 1271: Para productos basados en tejidos y células humanas y guardados en bancos^{6,7-21}. Con el objetivo de reducir y evitar la transmisión de patógenos y enfermedades virales, la etapa de descelularización en la MDA debe ser lo mejor posible evitando respuestas inmunes indeseables⁶. Actualmente sigue la controversia sobre la esterilización final con irradiación gamma ya que algunos autores no recomiendan éste proceso debido a la desnaturalización proteínica de la MDA¹⁻⁶.

4.2 Usos de la MDA

Éste tipo de aloinjertos tienen una gran aplicación en diferentes tratamientos en medicina como⁴:

- Heridas por quemaduras corporales
- Reconstrucciones de cabeza y cuello
- Defectos en base del cráneo
- Defectos introrales y extraorales
- Rinoplastías
- Perforaciones de tabique nasal y otras reconstrucciones de nariz
- Cirugías en pared abdominal
- Implantes de reconstrucción mamaria después de una mastectomía
- Procedimientos estéticos en labios.
- Reconstrucción de la membrana timpánica
- Defectos orofaríngeos
- Reconstrucción de tejido blando periorbitario
- Cirugía urogenital
- Cirugía ortopédica

Aunque también se debe evaluar la morbilidad del sitio donador, el suministro de tejido donado, el paciente y su comorbilidad, pero si el principal objetivo es la reconstrucción y estética del paciente, la MDA es una excelente opción¹, pues éste material cumple con mucho de los requisitos de un injerto ideal como son:

- Fácil crecimiento vascular
- Disminución para provocar inflamación
- Inercia biológica
- Resistencia a la infección
- Facilidad de manejo⁴.

4.3 MDA en odontología

Éste aloinjerto fue introducido en la odontología en 1994 por Aichelman y ha estado en uso en el campo de cirugía mucogingival incluso en la regeneración ósea guiada en forma de membrana para substituir a los injertos subepiteliales conectivos autógenos^{2,4,19,20,23}. Las marcas comerciales más usadas son Alloderm®, PurosDermis®, DermaMatrix®, Oracell® y PerioDerm®. Se han realizado estudios comparativos entre Alloderm® y PurosDermis® en donde no ha habido diferencias significativas en resultados para tratamiento de recesiones gingivales entre éstos dos injertos²⁷. Como todos los aloinjertos se prepara eliminando la epidermis de la piel y componentes celulares de ésta² y mantener su entramado de colágeno³, que como ya se mencionó forma parte importante del injerto, pues se utiliza como andamio para la regeneración tisular. Al momento de su uso algunas MDA se deben re-hidratar el aloinjerto de 10-40 minutos que dependerá del grosor que tenga el material en suero fisiológico. Después de colocarse en el sitio receptor la sangre del paciente se infiltra en el injerto a través de canales vasculares, llevando células del huésped a adherirse a las proteínas de la matriz. Una revascularización significativa se da una semana después de la implantación, la matriz se remodela para convertirse en el propio tejido del paciente.

La MDA está compuesta por 2 partes principales: Membrana basal (MB) y Matriz extracelular (MEC)⁷, a esta característica se le denomina polaridad³⁻²⁸. Y las funciones de estas partes son⁴:

Membrana basal o lámina basal (MB) Permite la migración celular y crecimiento de células epiteliales. La cual al momento de utilizarla en la cirugía se puede distinguir colocando una gota de sangre del paciente y ésta repelerá la sangre tornándose de un color rosado después de enjuagar con solución fisiológica estéril.

Matriz extracelular (MEC) Permite el crecimiento de fibroblastos, la angiogénesis, además de tener moléculas de señalización³⁻²⁵. Al distinguirla se

colocará una gota de sangre que será absorbida por esta parte de la matriz y se enjuagará con solución fisiológica y tendrá un aspecto sanguinolento.

La MEC está diseñada y producida por las células residentes de cada tejido de origen, permite al momento de ser colocado comunicación entre las células anfitrionas y el ambiente exterior, dando así el soporte para inervación, irrigación y difusión de los nutrientes, tiene una forma tridimensional compleja además de que contiene colágeno I, III y IV, elastina, fibronectina, laminina, ácido hialurónico que están en diferentes cantidades ayudando a su función de andamio^{1,6-28}. Éste componente de la MDA es importante y delicado a su vez por lo que los procesos de desinfección y esterilizado deben ser cuidadosos para no dañar la estructura y pueda cumplir sus funciones, pues no hay un proceso o protocolo obligado por la FDA para procesar los tejidos, cada casa comercial tiene sus procesos los cuales están patentados y utilizan diferentes métodos como: irradiación, lavado y remojo con antibióticos, liofilización⁴⁻²⁰ y criopreservación. Algunos métodos utilizan la esterilización terminal ya sea con óxido de etileno, irradiación gamma y rayo de electrones, sin embargo pocos utilizan éstas últimas por sus daños al aloinjerto anteriormente explicadas⁷.

Hay estudios donde se discute la posición de la membrana o cuál cara debe estar contra el diente o colgajo, para algunos autores la cara de la superficie de la MB debe estar frente al diente o dientes y la MEC contra el colgajo²¹, Otros estudios sugieren lo contrario, mientras que Henderson y col., realizaron un estudio en donde reportan que la orientación de la MDA no afecta los resultados de la cobertura radicular²³.

4.4 Presentaciones de la MDA

Algunos aloinjertos manejan éste tipo de presentaciones 1 cm², 2 cm², 4 cm² y 8 cm².

4.5 Pruebas serológicas de la MDA

Al momento de usar u obtener el material quiere decir que tiene los requisitos necesarios para poder ser utilizado y que ha pasado por un riguroso proceso de selección y pruebas, el cual comienza con un estudio y revisión de historias clínicas pertinentes, entrevista de evaluación del riesgo actual del donante, exploración física del mismo; pruebas de laboratorio; resultados de autopsia y médico forense. Entre las pruebas serológicas realizadas están:

- Anticuerpo contra el virus de la hepatitis C (anti-HCV).
- Prueba de ácido nucleico del VIH-1 (HIV NAT, Human Immunodeficiency Virus Nucleic Acid Testing).
- Prueba de ácido nucleico del virus de la hepatitis C (HCV NAT).
- RPR o VDRL (Reagina Plasmática Rápida o Venereal Disease Research Laboratory).
- Anticuerpos contra el VIH del tipo 1 y 2 (Anti-HIV-1, 2).
- Antígeno del núcleo de la hepatitis B [HBcAb-(IgG + IgM)].
- Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg)⁷⁻²⁰.

También se evalúa la carga bacteriana y fúngica. Sin embargo se señala, como cualquier tejido donante no garantizan estar completamente libre de patógenos⁷. Además de que no se han llevado a cabo estudios como potenciales carcinogénicos o mutagénicos. Algunos procesados de la MDA como la liofilización disminuyen la inmunogenicidad de tejido lo cual ha provocado la remoción de agua intra e inter molecular, produciendo sublimación a temperaturas y presiones bajas, pero se ha informado la incapacidad de inactivar el virus del VIH completamente. También se ha informado que solo se han encontrado restos de cadenas de ADN viral, sobre todo en las MDA que llevan procesado más extenso aunque no se han determinado si tienen origen bacteriano o viral. Es por eso que no hay una evidencia de que un procesado de MDA sea superior a otro y es mejor o recomendable usar los que están acreditados por la AATB y la FDA²³.

Se han reportado que donantes no son examinados para otros tipos de virus como herpes y virus del papiloma humano (VPH) los cuáles tiene un

potencial para transmitir varias enfermedades pues no hay pruebas serológicas apropiadas⁷.

4.6 Factores de riesgo por una infección del aloinjerto

- Edad del paciente.
- Tabaquismo (además de que influye en el éxito regenerativo del aloinjerto)²⁸.
- Tiempo de cirugía.
- Procedimientos operatorios previos.
- Posibilidad iatrogénica de enfermedades.

Éstas pueden dar complicaciones locales, sistémicas e incluso poner en peligro la vida de paciente.

4.7 Técnica de procesamiento de tejido

Aunque hay varios procesos para obtener la MDA la mayoría siguen los mismos pasos:

- **Remoción de la epidermis:** Desacoplando hueso con la dermis, sin dañar la estructura dérmica de partes del cuerpo como espalda, abdomen y piernas. El tejido donado puede ser limitado a consideración de los familiares y arreglos funerarios, se empaqueta en un contenedor estéril el cual tiene una solución isotónica y se transporta para el próximo paso del procesado¹.
- **Solubilización celular:** Que consiste en que las células son removidas con detergentes no desnaturalizantes de bajo peso molecular para inactivar virus y reducir el rechazo del injerto, sin embargo algunas soluciones detergentes pueden remover las glicosaminoglicanos del aloinjerto teniendo un efecto negativo ya que la función de éstas moléculas es la de retener el agua⁷ y afectarían la viscoelasticidad del injerto permitiendo una mayor

filtración celular en su futuro uso quirúrgico, mientras que la MDA es estabilizada por medio de inhibir la metaloproteinasas^{2,4, 6, 7-24}.

- **Preservación en seco:** El tejido es liofilizado sin dañar los componentes esenciales para la revascularización y repoblación celular normal, conservando sus propiedades bioquímicas y su integridad estructural³⁻⁴, en ésta parte hace que la MDA esté libre de todo componente celular, quedando el entramado de colágeno, elastina, proteoglicanos y los canales para vasos sanguíneos²⁵, permitiendo una respuesta de cicatrización más rápida y con más organización para ser utilizado como andamio biológico y remodelar tejido, por último el injerto es empaquetado en recipientes estériles.^{3,20,23-24}. También se ha reportado que si el injerto es almacenado por más de un año congelado o liofilizado se dañan las propiedades biomecánicas aumentando más su rigidez⁷.

Aun cuando el proceso de la MDA combina el uso de detergentes, antibióticos y liofilización no se garantiza la remoción de bacterias, además de que se tiene que evaluar la historia clínica del paciente, sino es alérgico a algún antibiótico de los que se usaron para procesar el aloinjerto. Y al usar óxido de etileno como esterilización terminal ha provocado reacciones adversas del huésped⁷.

Se realizó un estudio sobre la irradiación gamma en donde se colocó una MDA y se expuso a 15 kGy (kilogray) lo cual es una exposición baja de irradiación gamma, se reportó que hubo un incremento en la solidez de la MDA pero no hubo afectación en la proliferación de fibroblastos gingivales in vitro, sin embargo aumentando la dosis absorbida de la irradiación gamma reduce significativamente la elasticidad del aloinjerto y es más susceptible a degradación proteolítica, lo cual influirá en la síntesis de nuevo colágeno en el tejido²⁶.

4.8 Indicaciones/usos de la MDA en odontología

- Aumentos de encía insertada, para la cobertura de recesiones gingivales múltiples adyacentes clases I, II y III según la clasificación de Miller, que requieran gran cantidad de tejido o que tengan un biotipo delgado, indicación por la que es más auxiliado el injerto, combinando el injerto con un técnica da avance coronal³.
- Cuando la cantidad de tejido autógeno conectivo es insuficiente para cubrir las recesiones gingivales.
- Complicaciones para obtener un segundo sitio quirúrgico.
- Paciente que no desea tener una herida palatina.
- Reconstrucción y coberturas de implantes inmediatos ⁴⁻²⁵.

4.9 Ventajas de la MDA

- Disminuye la morbilidad de otros sitios donantes como lo son los injertos autógenos.
- Disminuye las complicaciones quirúrgicas y postoperatorias.
- Evita realizar un segundo sitio quirúrgico.
- Resultados similares a los de tejido conectivo autógeno.
- Es más estético al mimetizar perfectamente los tejidos gingivales.
- Menor tiempo operatorio.
- Disponibilidad ilimitada de tejido ^{3, 4, 20, 23-25}.

4.10 Desventajas de la MDA

- El éxito del injerto dependerá de los vasos sanguíneos y células del sitio receptor.
- Al exponerse al medio ambiente puede necrosarse.
- Costo elevado.
- Mayor tiempo de cicatrización que otras técnicas, por ejemplo los injertos autógenos de tejido conectivo tardan de 2-3 semanas en cicatrizar.^{4, 23-25}.

4.11 Luz UV esterilizadora

La radiación ultravioleta (UV) es energía emitida por la luz del sol, la cual solo llega a la Tierra dos tercios de ella, ésta se encuentra en el espectro electromagnético cuyo rango de longitud de onda está aproximadamente entre los 200-400 nm (nanómetros) ^{30,31-37}. Existen tres tipos de luz UV que son:

- **Luz UV A:** Cuyo rango de longitud de onda están entre los 320-400 nm. Ésta no es filtrada por la capa de ozono y alcanza a penetrar la epidermis de la piel y puede causar varios daños al cuerpo humano como: fotosensibilidad, daño a la retina, aparición de cataratas, además de que puede provocar foto envejecimiento. Entre sus propiedades terapéuticas están: Tratamiento para psoriasis, acné, linfoma cutáneo y repigmentación de vitiligo.
- **Luz UV B:** La longitud de onda está entre el rango de 280-320 nm. Éste tipo de luz UV es la que está más relacionada con daño biológico pues el 80% se le atribuye a daños en la piel contra el 20% de la luz UV A³⁷, puede provocar eritema solar y fotocarcinogénesis. También puede intervenir en la melanogénesis.
- **Luz UV C:** Tiene propiedades germicidas su rango de longitud de onda está entre 200-280 nm. El ozono impide su paso a la atmósfera. Puede ser emitida por lámparas artificiales con fines desinfección y esterilización, además de fabricación de arcos de soldadura industrial³⁰⁻⁴².

Para la esterilización de instrumental y equipos la longitud de onda que se usa es de 254 nm la que es efectiva contra varias bacterias resistentes como la *Escherichia coli* y bacterias resistentes a la acción del cloro como las *Cryptosporidium*, así como diferentes cepas de virus, algunos señalan que la luz UV C generadas por lámparas de excímeros emiten un rango de longitud de onda de 207-222 nm eliminando de una manera eficiente bacterias resistentes a varios medicamentos³². La razón es porque puede atravesar e inactivar el ADN produciendo dímeros de Pirimidina en las bacterias, perjudicando su reproducción

con una reacción fotoquímica provocando mutaciones y muerte en las bacterias³³⁻³⁸, incluso las esporas bacterianas. En hospitales y centros médicos hay gran riesgo de infección, la luz UV ha significado un cambio drástico en la limpieza de las instalaciones y el equipo utilizado reduciendo considerablemente la población bacteriana. En un estudio realizado en un hospital la reducción bacteriana por usar luz UV durante 2 minutos fue de 72.5% y 8 minutos 73.1%³⁴. Otros estudios para uso oftálmico utilizaron la luz UV con vitamina B2 (riboflavina) para tratamiento de úlceras corneales usándola en la superficie corneal a 365-370 nm con potencia de la lámpara a 3 mW/cm² por 30 minutos con resultado favorecedor aumentando la resistencia del tejido corneal³⁵.

4.12 Microflora bacteriana en el ambiente bucal sano

Como se sabe el cuerpo humano está colonizado por múltiples especies de bacterias; estos microorganismos componen la microflora nativa o residente, las cuáles pueden variar dependiendo de ciertos factores como: región anatómica, edad y susceptibilidad del individuo. Aunque muchos organismos nos ayudan a un buen funcionamiento de nuestro cuerpo entre las condiciones de susceptibilidad está el consumo de antibióticos, antimicóticos, anticonceptivos, trasplantes, cáncer, diabetes, técnicas quirúrgicas invasivas, ocasionando que los microorganismos residentes puedan convertirse en patógenos oportunistas³⁹. En éste caso la microflora humana residente en la boca está compuesta por *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Fusobacterium*⁴⁰, sin embargo en un estudio hecho en los años 80 por Socransky y col. Sobre las especies bacterianas que hay en la cavidad oral en estado de salud periodontal y diferentes estados de periodontitis. Las bacterias que se encuentran más en un ambiente bucal sano son: *Vaillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, los cuales se conocen como los primeros colonizadores de la cavidad oral, otras especies como *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Streptococcus constellatus*. Otros grupos de especies que se

encuentra pero en menor medida, son los que están más presentes en enfermedades infecciosas como *Lactobacillus*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y con menos del 1% *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*⁴¹. Todas éstas bacterias pueden cultivarse en medios de cultivo como Agar Mueller Hinton, Agar Infusión de cerebro-corazón, Agar Sangre de Carnero al 5% y Agar Mac Conkey a excepción de la *Treponema denticola* y la *Tanerella forsythia* que son difíciles de que proliferen en medios de cultivo.

5 Planteamiento del problema

En cuanto a los aloinjertos específicamente la MDA actualmente no existe información en la literatura ni protocolo documentado que garantice que al re-esterilizar este material pueda perder sus propiedades estructurales y biomiméticas, con el propósito de darle un uso futuro en procedimientos quirúrgicos aprovechando toda la cantidad disponible de injerto en varios pacientes sin que el paciente se ponga en riesgo y el éxito del tratamiento se vea comprometido por el método de re-esterilización.

6 Justificación

Actualmente la presentación de la MDA tiene varias aplicaciones en cirugía mucogingival como son las coberturas radiculares, aumentos de reborde alveolar, aumentos de encía insertada, entre otros; con resultados exitosos de igual manera en el área de implantología. Sin embargo, como ya se expuso anteriormente el alto costo del material de dicho aloinjerto y que los métodos de desinfección aséptica de algunas casas comerciales no garantizan la esterilización del material. Nos lleva a la importancia de buscar un método de re-esterilización seguro como lo es la luz UV sin que comprometa las propiedades estructurales y biomiméticas del injerto para usarlo en la práctica quirúrgica, evitando tener el riesgo de contaminación cruzada o toxicidad. Dando como resultado el aprovechamiento de obtener un procedimiento quirúrgico de menor tiempo, evitando una segunda herida quirúrgica y la oportunidad de que material y proceso quirúrgico sea más accesible al público.

7 Objetivo general

Realizar un protocolo de re-esterilización para la MDA verificando sus propiedades estructurales, biomiméticas y biocompatibles con el tratamiento de luz UV, además de comprobar el efecto antimicrobiano.

8 Objetivos específicos

1. Diseñar un protocolo de re-esterilización con luz UV sobre la MDA para evaluarla en diferentes pruebas experimentales.
2. Comprobar el efecto inhibitorio bacteriano de la re-esterilización de la MDA usando luz UV elaborando medios de cultivo específicos.
3. Observar si la MDA tiene cambios estructurales antes y después de re-esterilizar con luz UV realizando una prueba de caracterización usando un microscopio estereoscópico.
4. Comparar la degradación de la MDA en dos grupos (con y sin re-esterilización UV) usando Tripsina y analizando con un espectrofotómetro durante 0, 24, 96 y 168 horas, además de tomar peso final e inicial de cada grupo.
5. Evaluar la viabilidad celular de la MDA comparando dos grupos (con y sin re-esterilización UV) usando células orales (HGF) comprobando la citotoxicidad usando espectrofotómetro a 24 y 48 horas.

9 Pregunta de investigación

¿Los injertos de MDA no utilizados en el procedimiento quirúrgico pueden ser re-esterilizados de nuevo sin afectar sus propiedades estructurales y biomiméticas?

10 Hipótesis

Hipótesis de investigación

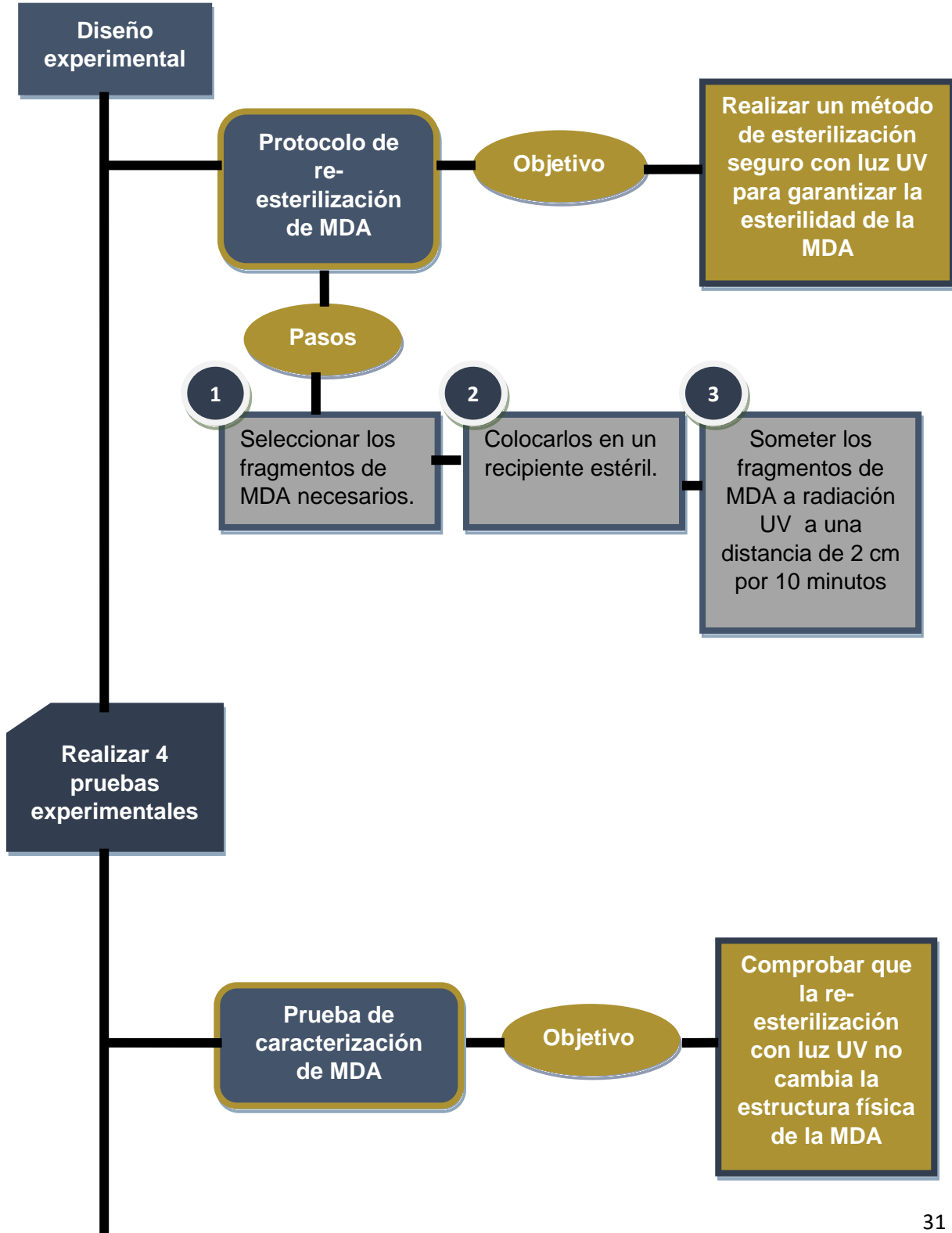
Al realizar la re-esterilización bajo luz UV en la MDA, el material no modificará su estructura, propiedades biomiméticas y será microbiológicamente seguro, por lo tanto el material se encontrará estéril para su futuro uso quirúrgico.

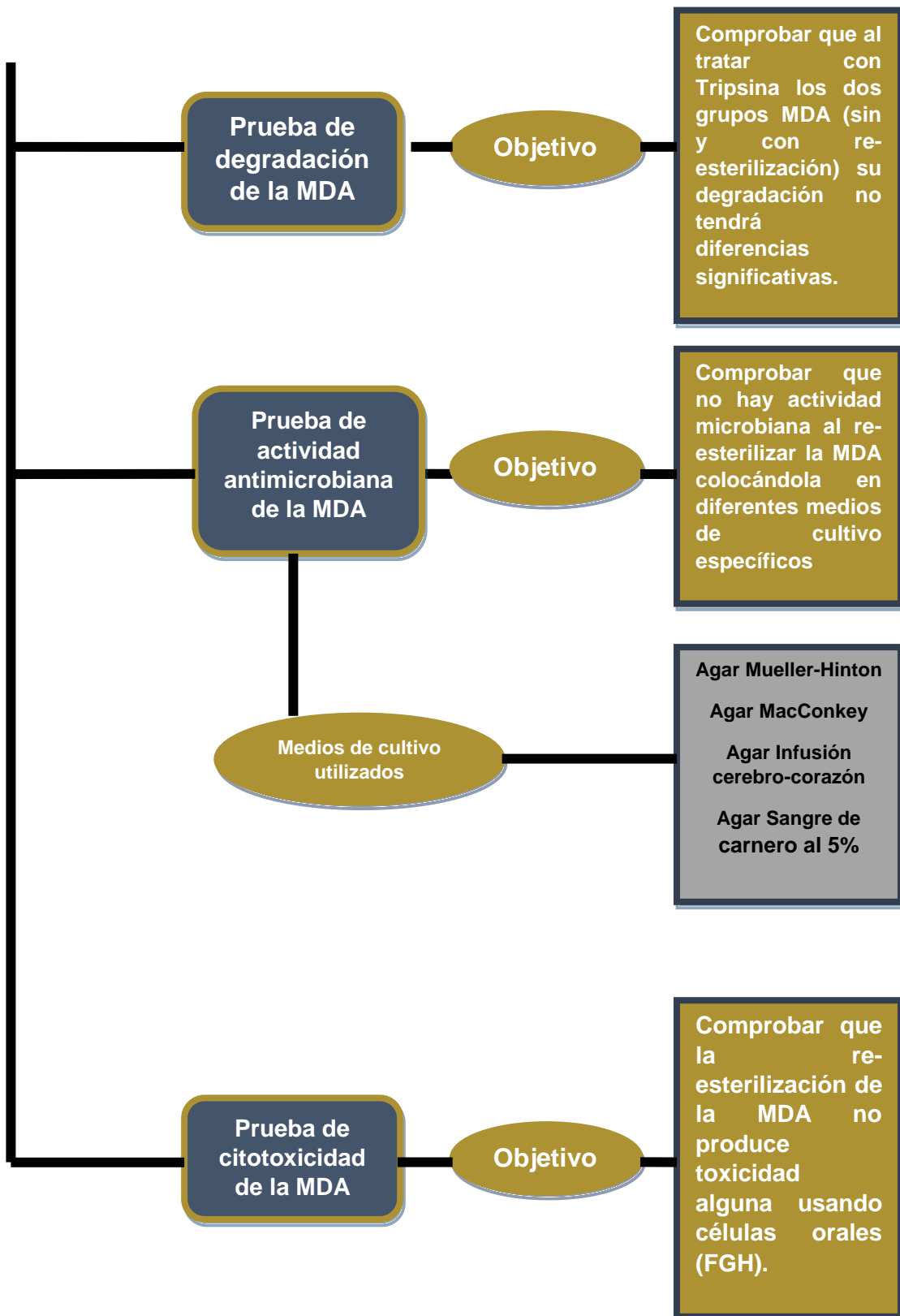
Hipótesis nula

Al realizar la re-esterilización bajo luz UV en la MDA, el material modifica su estructura, propiedades biomiméticas y microbiológicamente estará contaminado, por lo tanto el material no es apto para utilizarse en cualquier tipo de cirugía.

11 Metodología

11.1 Diagrama experimental





11.2 Desarrollo experimental

11.2.1 Tipo de estudio:

Experimental, descriptivo y comparativo.

11.2.2 Variables independientes:

- Medio de cultivo utilizado.
- Tipo de bacteria según su actividad metabólica (aerobia y anaerobia).
- Lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro.
- Peso de las muestras de MDA al inicio y al final de la prueba de degradación.

11.2.3 Variables dependientes:

- Longitud de onda de la luz UV.
- Grado de aumento del microscopio estereoscópico.

11.2.4 Criterios de inclusión:

- Medios de cultivo elaborados según las indicaciones del fabricante.
- MDA que no fue utilizada en un procedimiento quirúrgico anterior.
- Crecimiento celular adecuado de FGH en la placa de 96 pocillos para citotoxicidad.

11.2.5 Criterios de exclusión:

Aloinjertos que no sean MDA.

11.2.6 Criterios de eliminación:

- Cultivos que mostraban contaminación de microorganismos por error humano.
- Cajas de Petri que mostraban fractura al momento de su manipulación.
- Fotografías de mala calidad capturadas en el microscopio estereoscópico.

- Mala colocación de solución tripsina-MDA en placas de 96 pocillos para lectura en espectrofotómetro.

- Población reducida de FGH para realizar las pruebas de citotoxicidad.

11.2.7 Universo:

Aloinjertos de tejido blando.

11.2.8 Muestra:

No probabilístico.

11.2.9 Tamaño de muestra:

Total de muestra $n= 41$

Prueba de caracterización $n= 1$

Prueba de degradación $n= 4$

Prueba de actividad antimicrobiana $n= 24$

Prueba de citotoxicidad $n= 12$

11.2.10 Material y equipo para protocolo de re-esterilización de la MDA con luz UV

Campana de flujo laminar vertical Clase II tipo A2 (Lumistell LVC-120e, Celaya, México) (**ver figura 1**), caja de Pertri (SyM Laboratorios, México), tijeras LaGrange (HuFriedy, Chicago, Estados Unidos) y pinzas de curación (HuFriedy, Chicago, Estados Unidos).



Figura 1. Campana de flujo laminar vertical Clase II tipo A2. Fuente propia.

11.2.10.1 Desarrollo del protocolo de re-esterilización de la MDA con luz UV

Se obtuvo la muestra de MDA para seccionarla en diferentes fragmentos según lo requerido para las pruebas experimentales usando tijeras LaGrange, después cada fragmento se tomó con pinzas de curación y se colocó en un recipiente (caja de Petri) para la re-esterilización con luz UV por un tiempo de 10 minutos a una distancia de 2 cm.

11.2.11 Material y equipo utilizado para prueba de caracterización de la MDA

Microscopio estereoscópico (Leica Microsystems, Alemania) (**Ver figura 2**), caja de Petri (SyM Laboratorios, México), campana de flujo laminar vertical Clase II tipo A2 (Lumistell LVC-120e, Celaya, México).

11.2.11.1 Desarrollo de la prueba de caracterización

Se obtuvo una muestra de MDA de aproximadamente 5x2 mm la cual se observó con el microscopio estereoscópico, para observar sus características físicas, posteriormente se esterilizó la muestra de MDA en campana de flujo laminar vertical con luz ultravioleta (potencia 365 mW/mm y longitud de onda 253.7 nm) para luego observar la muestra una vez más en el microscopio estereoscópico y evaluar sus características.



Figura 2. Microscopio estereoscópico. Fuente propia.

11.2.12 Material y equipo para prueba de degradación de la MDA

Micropipeta 20-200 μl (Finnpipette C1, Thermo Fisher Scientific, Finlandia), Tubos de Eppendorf (Eppendorf, Alemania), Balanza analítica SGC-LII (Denver Instrument, Denver, Estados Unidos), (Campana de flujo laminar vertical clase II Tipo A2 (Lumistell LVC-120e, Celaya, México), Placa de cultivos para 96 pocillos (Costar Sigma-Aldrich, Alemania), Espectrofotómetro multiskan GO (Thermo scientific, Estados Unidos), pinzas de curación (Hu-Friedy, Chicago, Estados Unidos), incubadora de agitación MAX Q6000 (Thermo Scientific, Estados Unidos), tijeras LaGrange (Hu-Friedy, Chicago, Estados Unidos), puntas de micropipeta (Eppendorf, Alemania), Tripsina (Sigma Aldrich, Alemania) **(Ver figura 3)**.



Figura 3. Tripsina.
Fuente propia.

11.2.12.1 Desarrollo de la prueba de degradación de la MDA

Se obtuvieron 4 muestras de MDA previamente seccionadas de 3x3 mm aproximadamente **(Ver figura 4 y 5)**, se pesó cada una de las muestras en una balanza analítica, 2 de las muestras se re-esterilizaron bajo luz UV por 10 minutos a una distancia de 2 cm y 2 muestras se dejaron sin re-esterilizar, se tomó 5 tubos de Eppendorf, uno fue el control y en los demás se le colocó los 4 aloinjertos seccionados y se identificaron las muestras, después con un micropipeta se colocó 2 ml de Tripsina en cada tubo, posteriormente de cada tubo de Eppendorf se tomó 100 μl en cada celdilla de un plato de 96 pocillos y se tomó la lectura de la absorbancia a las 0 hrs en el espectrofotómetro, para terminar el líquido colocado en el plato de de 96 pocillos se regresó a cada tubo de Eppendorf y se dejó en

incubadora con agitación de 100 rpm a 37°C manteniéndola el tiempo correspondiente a la hora de evaluarlo con el espectrofotómetro, simulando un ambiente bucal, se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a las 24, 48, 96, y 168 horas a una longitud de onda de 560 nm para cada lectura de la solución (**Ver figuras 6 y 7**), en la última lectura se retira la tripsina de cada tubo de Eppendorf, se dejó secar las muestras de MDA a temperatura ambiente por 2 días y se registró la diferencia de los pesos de inicio y final en un periodo de 7 días.



Figura 4. Muestras seccionadas de MDA 3 mm x 3 mm aproximadamente. Fuente propia.

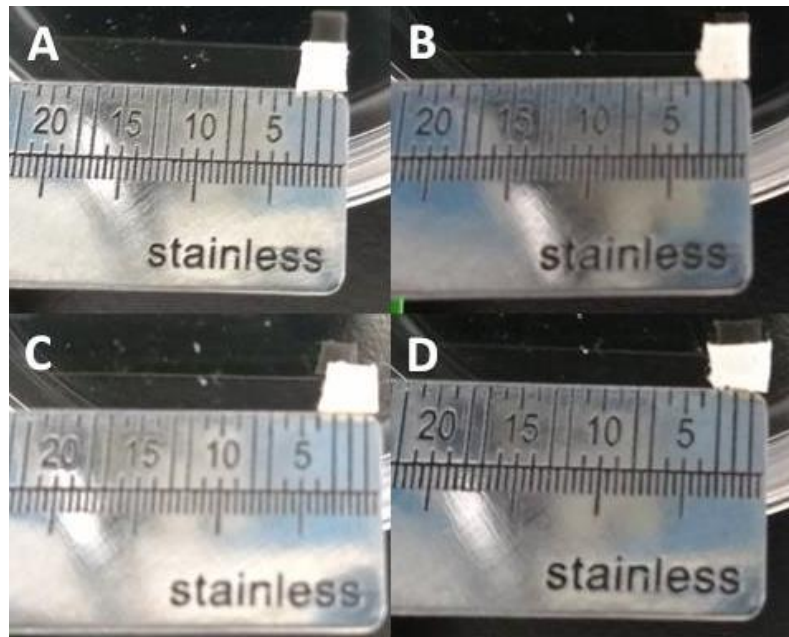


Figura 5. Muestras de MDA (A. Muestra 1, B. Muestra 2, C. Muestra 3 y D. Muestra 4). Fuente propia.

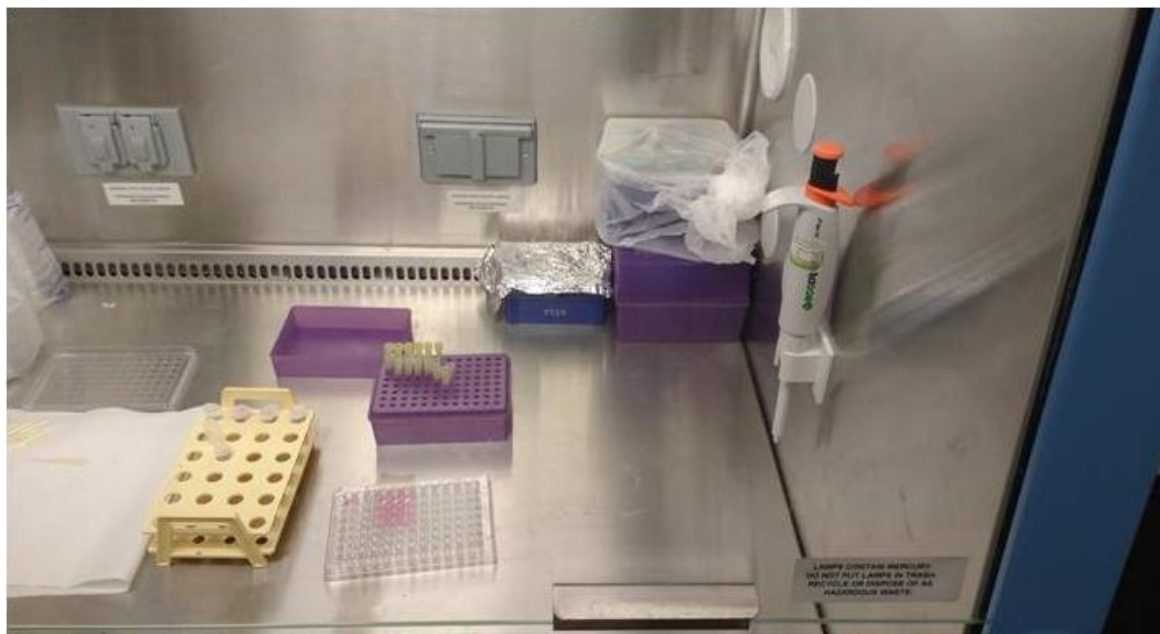


Figura 6. Colocación de solución Tripsina-MDA en placa de 96 pocillos a las 0 horas. Fuente propia.

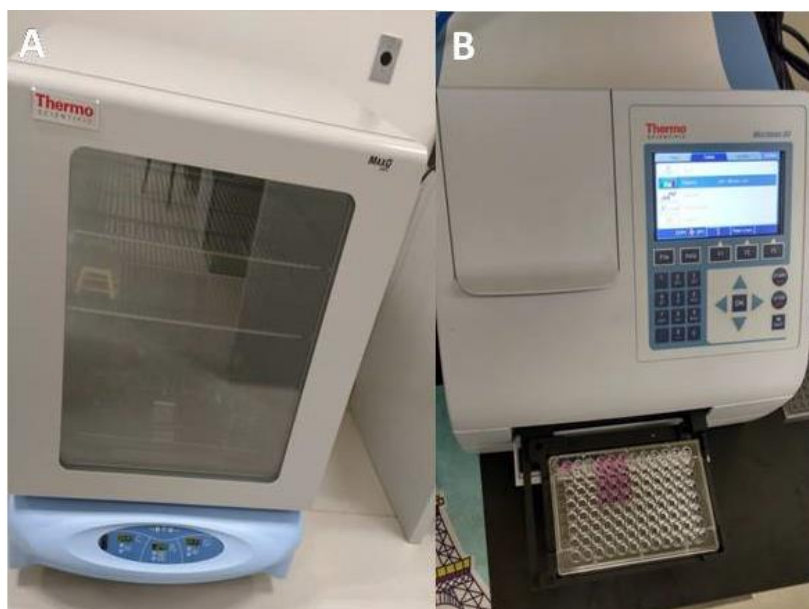


Figura 7. (A. Colocación de tubos de Eppendorf en incubadora de agitación, B Lectura de absorbancia de la placa en el Espectrofotómetro). Fuente propia.

11.2.13 Material y equipo para prueba de actividad antimicrobiana de la MDA

Agar Mueller-Hinton (CM0037IVD, OXOID, LTD, Inglaterra), Agar Infusión cerebro-corazón (BD Bioxon, Oaxaca, México), Agar Mac Conkey (BD Bioxon, Oaxaca, México), Agar Sangre de carnero al 5%, (MCDLAB, Tlalnepantla, México) **(Ver figura 8)**, cajas de Petri (SyM Laboratorios, México), papel encerado (Bemis, Wisconsin, Estados Unidos), vasos de precipitados (KIMAX Kimble, Estados Unidos), probeta (KIMAX Kimble, Estados Unidos), matraces (KIMAX Kimble, Estados Unidos), espátula (ARAIN, México), balanza analítica (Denver Instrument, Colorado, Estados Unidos), incubadora (Incucell, MMM Medcenter, Einrichtungen GmbH, Alemania), incubadora de células anaerobias (Thermo Scientific, Estados Unidos) regla milimétrica de endodoncia (Stainless, México), tijeras quirúrgicas LaGrange (Hu-Friedy, Chicago, Estados Unidos), pinzas Adson sin dientes (ARAIN, México), parafilm (Parafilm M, México), Campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (Lumistell LVC-120e, Celaya, México), parrilla de calentamiento (Thermo Fisher Scientific CIMAREC, Estados Unidos), autoclave (Tuttnauer, Nueva York, Estados Unidos) y Sangre de carnero desfibrinada estéril 50 ml (Hematolab, Hidalgo, México) **(Ver figura 9)**.



Figura 8. Medios de cultivo utilizados de izquierda a derecha (A. Mueller-Hinton, A. Infusión cerebro-corazón, A. Mac Conkey y A. Sangre). Fuente propia.



Figura 9. Sangre desfibrinada de carnero 50 ml. Fuente propia.

11.2.13.1 Importancia de los medios de cultivo

Éstos medios de cultivo se consideran importantes en este estudio ya que son los que pueden desarrollar crecimiento de las bacterias que se encuentran en un ambiente bucal sano especies como: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Capnofílicas*, pues cualquier procedimiento quirúrgico debe realizarse en pacientes en óptimas condiciones periodontales.

11.2.13.2 Desarrollo de la prueba de actividad microbiana de la MDA

Preparación de los medios de cultivo

Agar Mueller-Hinton: Se añadió 6.08 g a 160 ml de agua destilada, se llevó a ebullición completa y después se esterilizó en autoclave la disolución resultante a 121°C por 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se colocó aproximadamente 10 ml de preparado en cajas de Petri con capacidad de 20 ml. Se etiquetó y guardó en refrigerador (2-8°C). Se preparó en total 12 cajas de medio.

Agar Mac Conkey: Se añadió 8 g a 160 ml de agua destilada, se llevó a ebullición completa y después se esterilizó en autoclave la disolución resultante a 121° C por 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó aproximadamente 10 ml de preparado en cajas de Petri con capacidad de 20 ml. Se etiquetó y guardó en refrigerador (2-8°C). Se preparó en total 6 cajas de medio.

Agar Infusión de cerebro-corazón: Se añadió 8.32 g a 160 ml de agua destilada, se llevó a ebullición completa y después se esterilizó en autoclave la disolución resultante a 121°C por 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó aproximadamente 10 ml de preparado en cajas de Petri con capacidad de 20ml. Se etiquetó y guardó en refrigerador (2-8°C). Se preparó en total 6 cajas de medio.

Agar Sangre de Carnero al 5%: Se añadió 11.2 g a 280 ml de agua destilada, se llevó a ebullición completa y después se esterilizó en autoclave la disolución resultante a 121°C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 14 ml (5%) de sangre de carnero desfibrinada estéril a la disolución (**Ver figura 10**), se colocó aproximadamente 10 ml de preparado en cajas de Petri con capacidad de 20 ml. Se etiquetó y guardó en refrigerado (2-8°C). Se preparó en total 12 cajas de medio (**Ver figuras 11**).

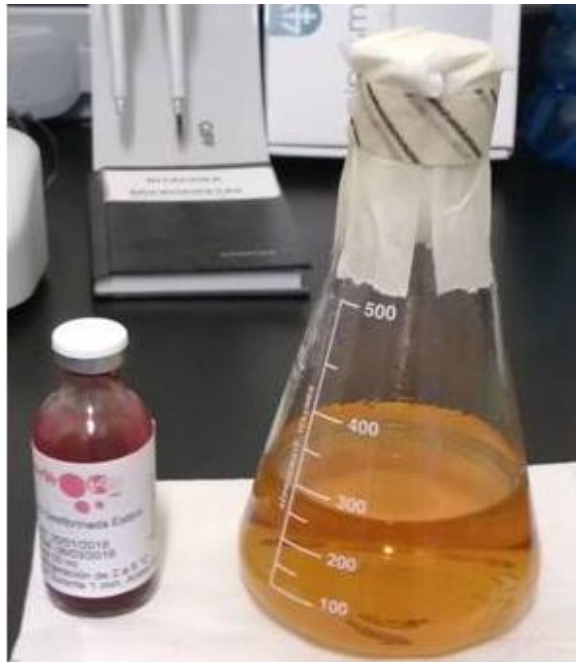


Figura 10. Base de agar sangre listo para agregar Sangre de carnero al 5%. Fuente propia.



Figura 11. Medios de cultivo preparados y colocados en caja de Petri, de izquierda a derecha (A. Mueller-Hinton, A. Mac Conkey, A. Infusión de cerebro-corazón y A. Sangre de carnero al 5%). Fuente propia

Colocación de las muestras

Se seccionaron 24 fragmentos de MDA con tijeras quirúrgicas LaGrange (**Ver figura 12**) de 2x2 mm aproximadamente, se dividió en dos grupos los fragmentos de MDA que fueron: con y sin re-esterilización usando luz UV, además de que se contaron con grupos de control negativo y positivo, inoculando bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en éste último. Cada fragmento fue colocado en su respectivo medio y sellado para finalmente distribuirlos en dos tipos de incubadora: Incubadora para bacterias aerobias e incubadora para bacterias anaerobias, ésta última con una concentración de CO₂ al 5%. Se observaron resultados después de 48 horas (**Ver figuras 13 y 14**).

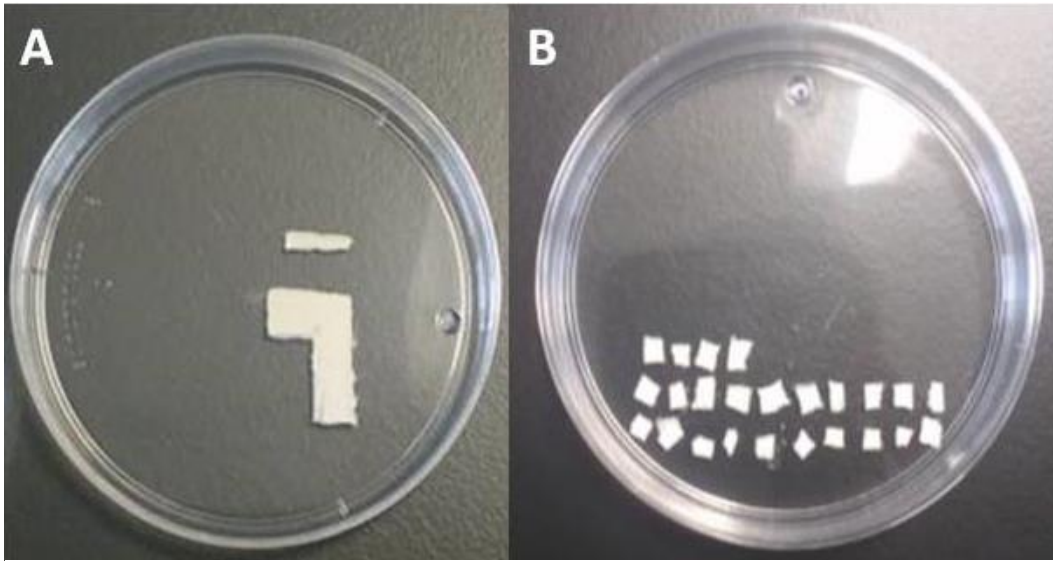


Figura 12. (A. Muestra de MDA y B. Muestra seccionada en 24 fragmentos).
Fuente propia.

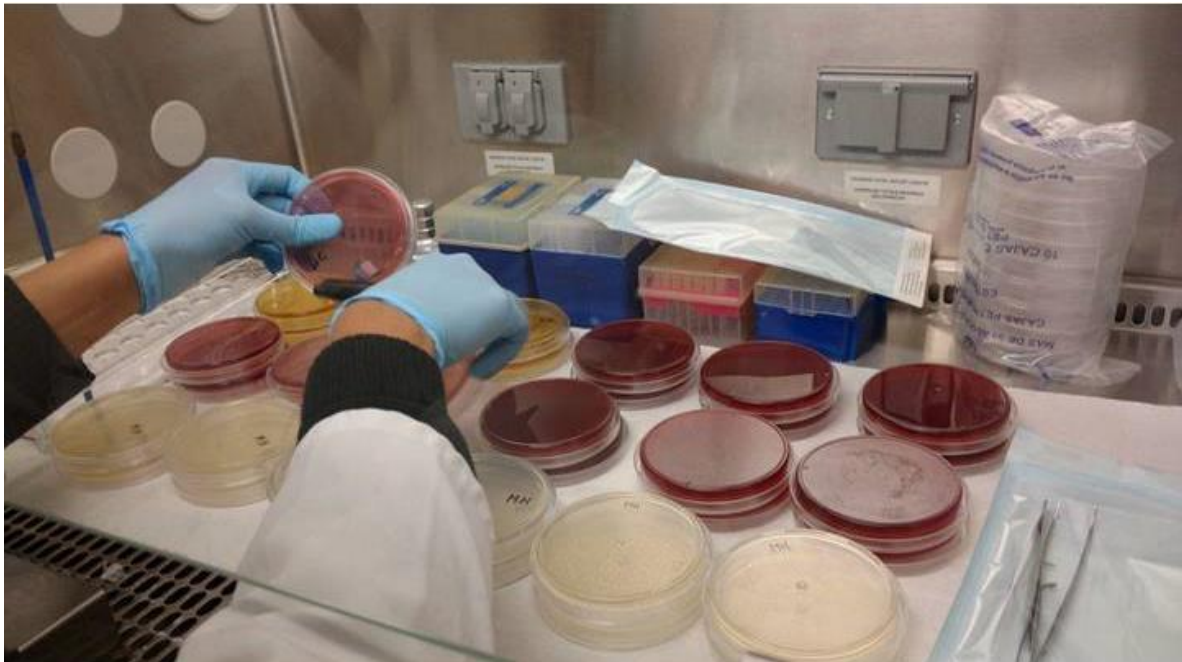


Figura 13. Colocación de muestras de MDA en sus respectivos medios de cultivo.
Fuente propia.

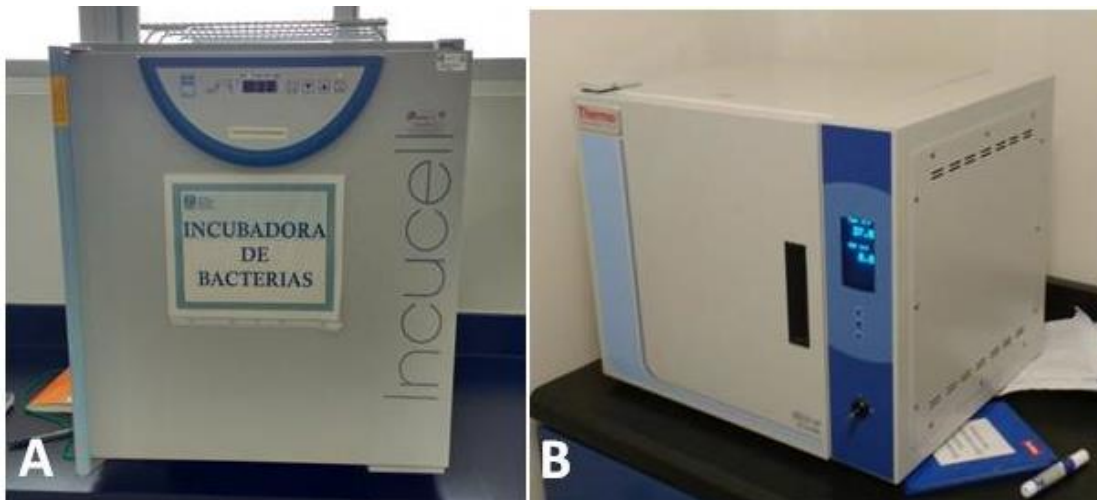


Figura 14. (A. Incubadora de células aerobias y B. Incubadora de células anaerobias)
Fuente propia.

11.2.14 Material y equipo para la prueba de citotoxicidad de la MDA:

Placa de cultivos celulares de 96 pocillos (Costar Sigma-Aldrich, Alemania), cajas de Petri (SyM Laboratorios, México), Campana de flujo laminar vertical clase II Tipo A2 (Lumistell LVC-120e, Celaya, México), tubos de Eppendorff (CAPP Denmark, Alemania), micropipeta 20-200 μ l y multicanal (Finnpipette C1, Thermo Fisher Scientific, Finlandia), Micropipeta con bomba de bomba de vacío (Accuris instruments, Colombia), Microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems, Alemania) **(Ver figura 15)**, Espectrofotómetro multiskan GO (Thermo Scientific, Estados Unidos), incubadora de agitación MAX Q6000 (Thermo Scientific, Estados Unidos), incubadora de células (Binder, Alemania), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, Alemania), Dimetil Sulfóxido (Karal, México) y Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich, Alemania) **(Ver figura 16)**.



Figura 15. Microscopio Leica DM2500.
Fuente propia.



Figura 16. Reactivos usados (A. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, B. Dimetil Sulfoxido y C. Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide). Fuente propia.

11.2.14.1 Desarrollo de la prueba de citotoxicidad en la MDA:

Preparación de células orales

Se prepararon células orales FGH cultivando en una caja Petri 3×10^4 células/ml para poder realizar óptimamente la prueba de citotoxicidad, dejándola en incubadora de células por 48 horas con las siguientes condiciones: Concentración de CO₂ al 5%, temperatura de 37°C y humedad 95%. Una vez cumplido el tiempo y con el número de células requeridas se colocaron en una placa de 96 pocillos las células junto con medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para mantenerlas vivas y realizar la prueba (**Ver figura 17**).

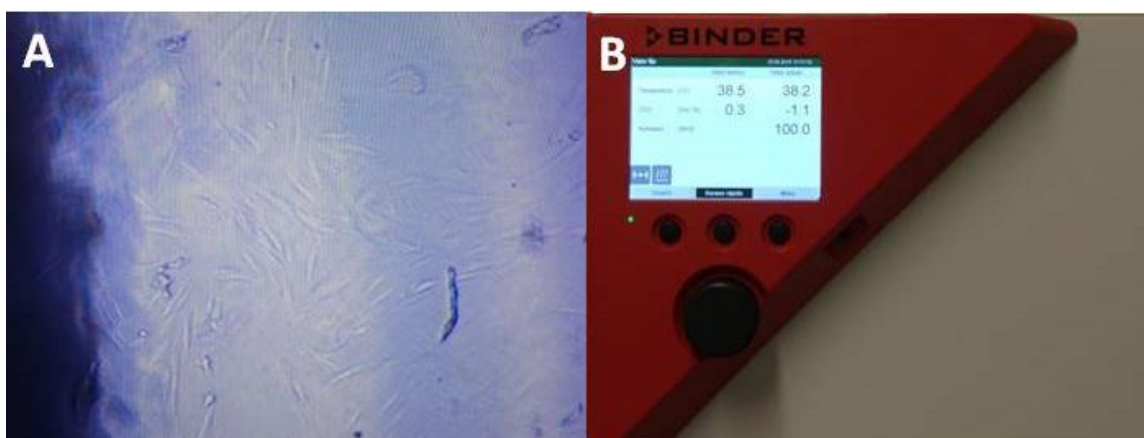


Figura 17. (A. Fibroblastos gingivales humanos para pruebas de citotoxicidad y B. Incubadora de células orales). Fuente propia

Prueba de citotoxicidad directa

Se realizaron dos experimentos de citotoxicidad con contacto directo de MDA usando células FGH. La primera prueba se evaluó a las 24 horas y la segunda prueba se evaluó a 24 y 48 horas con el mismo número de muestras de MDA con el siguiente procedimiento:

En cada prueba se utilizaron 4 muestras de MDA de 2x2 mm aproximadamente y fueron divididas en dos grupos: Un primer grupo con 2 muestras tratadas con luz UV por 10 minutos a 2 cm de distancia en caja de Petri y el segundo grupo con 2 muestras sin ningún tratamiento y solo almacenadas en caja de Petri (los dos grupos con su respectivo grupo control). Después cada

muestra de MDA fue colocado con pinzas de curación en un pocillo, de la placa de 96 pocillos con el número de FGH adecuado y medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para realizar dicha prueba (**Ver figura 18 y 19**), dejando la placa en la incubadora de células junto con las muestras de MDA según el tiempo correspondiente a cada prueba en las siguientes condiciones: Concentración de CO₂ al 5%, temperatura de 37°C y humedad 95%. Posteriormente se retiró la placa de la incubadora y el medio (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) también fue retirado usando una bomba de vacío aspirando el medio, después se colocó el reactivo MTT (0.2 mg/ml) en cada uno de los pocillos del grupo con luz UV, sin luz UV y control (**Ver figura 20**), dejando la placa una vez más en la incubadora por un tiempo de 5 horas con la condiciones anteriormente dichas se retiró el MTT y se le agregó por último dimetil sulfóxido (**Ver figura 21**) para que las células se cristalizaran y se evaluó la placa en el espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 570 nm de cada grupo y tomando fotografías con el software ZEN 2011.Ink, para ver el resultado porcentual de viabilidad celular, desviación estándar de los resultados y mostrarlos en una gráfica para comparar la citotoxicidad que mostraron las muestras de MDA con y sin re-esterilización de ambos grupos.



Figura 18. Colocación de medio en placa de 96 pocillos. Fuente propia.

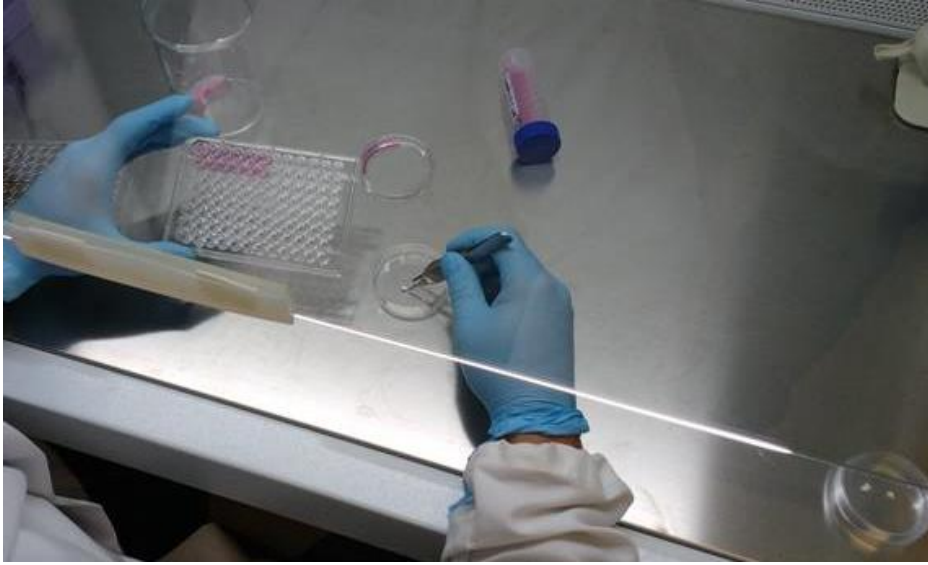


Figura 19. Colocación de muestras de MDA en pocillos de la placa. Fuente propia.

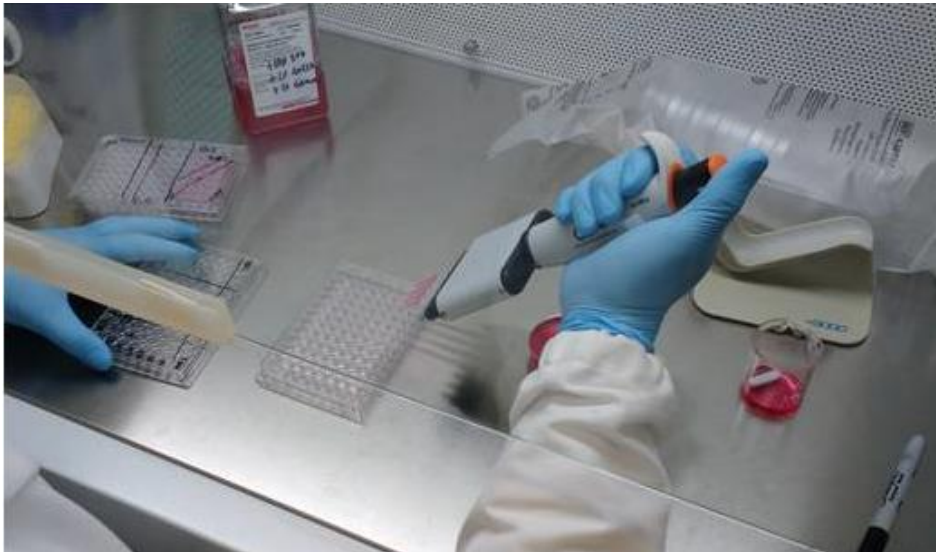


Figura 20. Colocación de MTT en pocillos de la placa. Fuente propia.

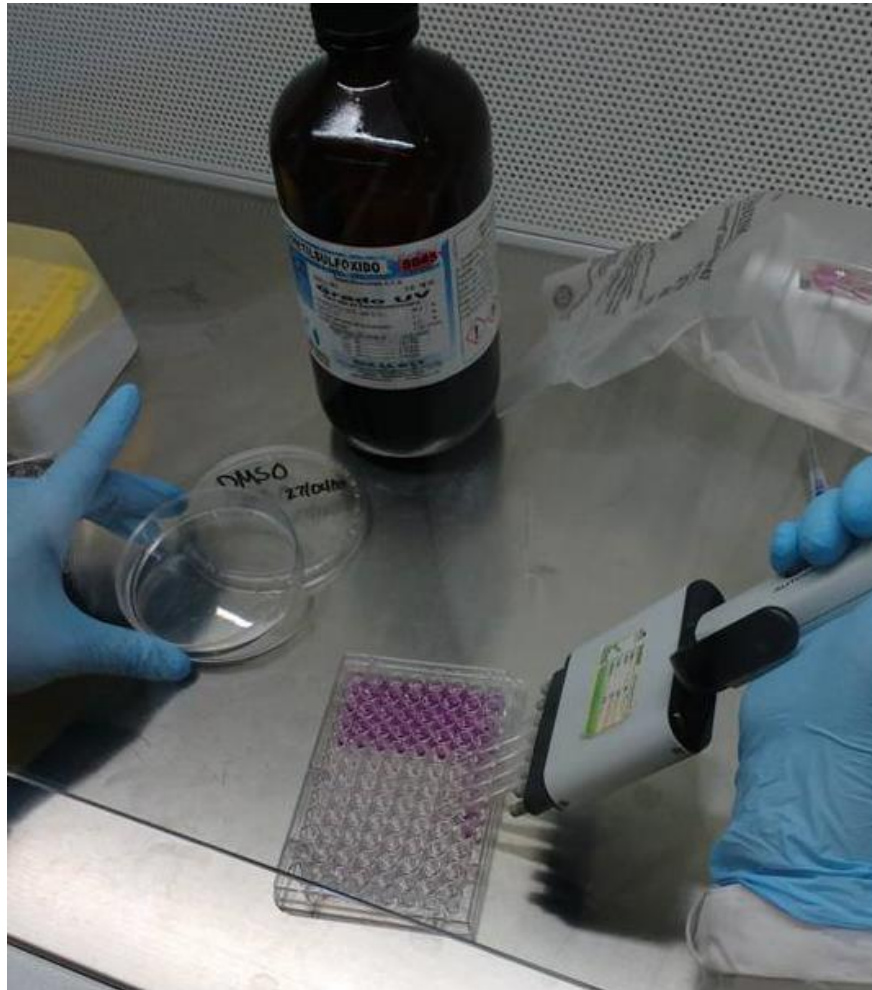


Figura 21. Colocación de Dimetil Sulfóxido en muestras de MDA en pocillos de la placa. Fuente propia.

Prueba de citotoxicidad indirecta

Se realizó un experimento obtuvieron 8 muestras de MDA, las cuáles se dividieron en dos grupos 4 para observar a 24 horas y 4 para 48 horas, de cada grupo 2 fueron re-esterilizadas con luz UV por 10 minutos a 2 cm de distancia en caja de Petri y las demás muestra no se le hizo nada. Las muestras con y sin re-esterilización se colocaron en tubos de Ependorff y se les añadió 2 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium para crecimiento celular con una micropipeta (**Ver figura 22**), posteriormente se colocó en una incubadora con agitación con las siguientes condiciones: Agitación a 100 rpm, temperatura a 37°C por un tiempo de 24 horas en ambos grupos con el fin de que la MDA

desprendiera sus componentes en el medio y aplicarlo a diferentes concentraciones de la placa de 96 pocillos, se cambió el medio del plato con una micropipeta conectándola a una bomba de vacío y se colocó el medio que contiene sumergidas las muestras de MDA seccionadas tomando 200 µl de éste medio y vertiéndolos en tres pocillos para cada muestra (n= 4) en la primera fila inferior de la placa. Las demás se les agregó con otra micropipeta 100 µl de medio, por lo tanto la primera fila inferior tiene la concentración más alta de esta solución que sería 100% y los demás pocillos tiene concentraciones de esta solución de 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56% y se dejó la primera fila superior sin medio de cultivo como grupo control, es decir una concentración de 0% de solución medio con MDA (**Ver figura 23**), esto mismo se realizó en el ensayo de 48 horas, después se les colocó el reactivo MTT (0.2 mg/ml) cambiándolo por el medio que contenía cada placa, se dejó en la incubadora de células por un tiempo de 5 horas a temperatura de 37°C se retiró el MTT y se le agregó por último dimetil sulfoxido (**Ver figuras 24 y 25**) para que las células se cristalizaran y ambas placas se evaluaron al tiempo indicado de cada ensayo (24 y 48 horas) en el espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 570 nm de cada grupo, para ver el resultado porcentual de viabilidad celular, desviación estándar de los resultados y mostrarlos en una gráfica para comparar la citotoxicidad que mostraron las muestras de MDA con y sin re-esterilización de ambos grupos.

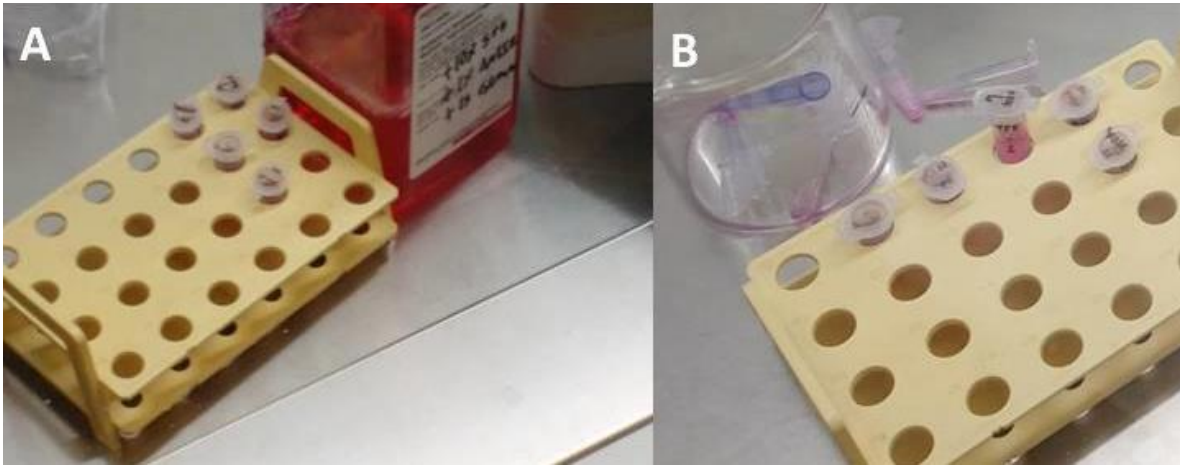


Figura 22. Muestra de MDA (A. Evaluación a 24 horas y B. Evaluación 48 horas. Fuente propia.

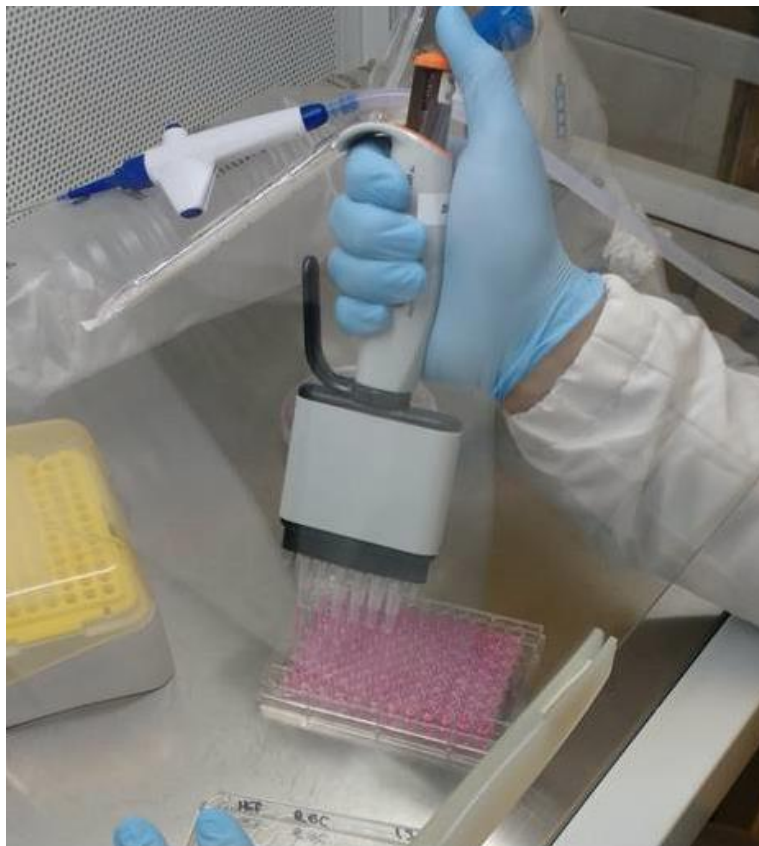


Figura 23. Colocación de solución MDA-medio en diferentes concentraciones. Fuente propia.



Figura 24. Colocación de solución MTT en las placas a 24 y 48 horas. Fuente propia.

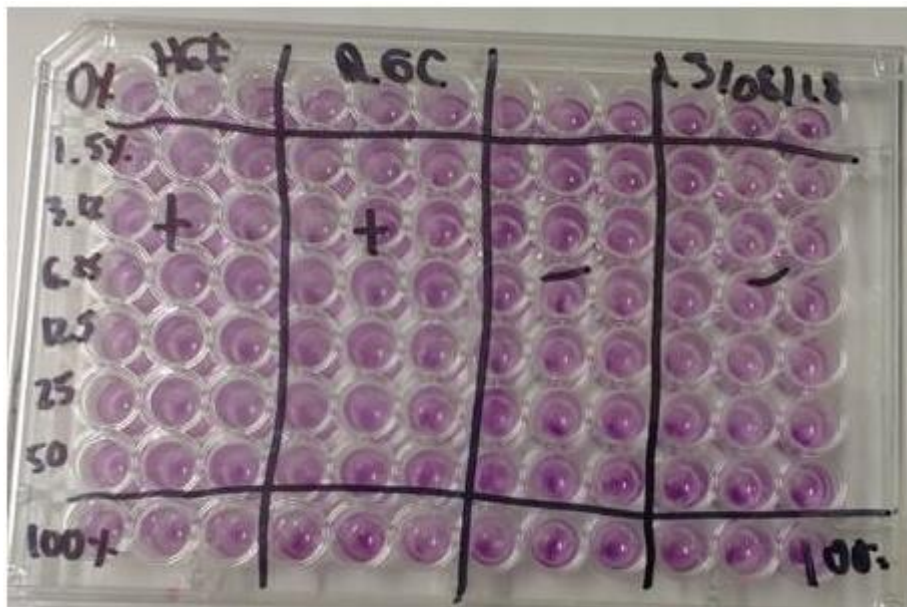


Figura 25. Colocación de Dimetil Sulfóxido en la placa a 24 horas. Fuente propia.

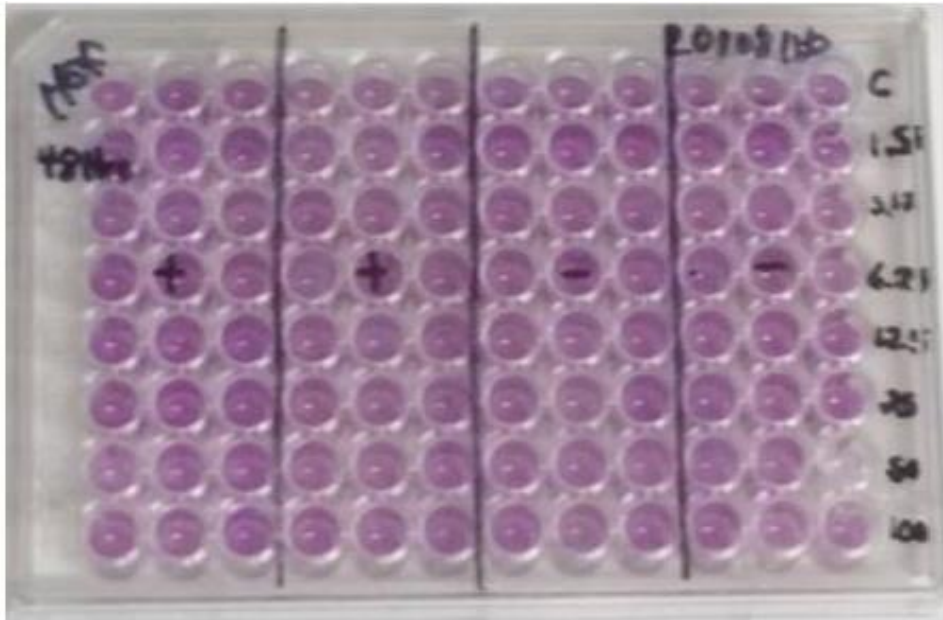


Figura 26. Colocación de solución MTT en la placa a 48 horas. Fuente propia.

12 Resultados

12.1 Prueba de caracterización de la MDA:

Se tomaron fotografías de las muestras de MDA con la ayuda del microscopio estereoscópico y usando el Software LAS V4.5.Ink con las siguientes magnitudes de observación en el microscopio estereoscópico 2.0x, 3.2x, 4.0x y 5.0x, por lo que no se encontraron diferencias antes y después de la re-esterilización de la MDA. En donde se describió una MDA con las siguientes características: Color beige, superficie rugosa de un lado y del lado opuesto una superficie tersa y ondulada del injerto y el costado de la MDA se pudo observar un entramado o red de fibras de un color amarillo paja uniforme sin detectar cambios físicos en ambos momentos **(Ver figuras 27, 28 y 29)**.



Figura 27. Superficie tersa y ondulada de la MDA en el microscopio estereoscópico a una magnitud de 3.2x (A. Antes del tratamiento con luz UV y B. Después del tratamiento con luz UV). Fuente propia.

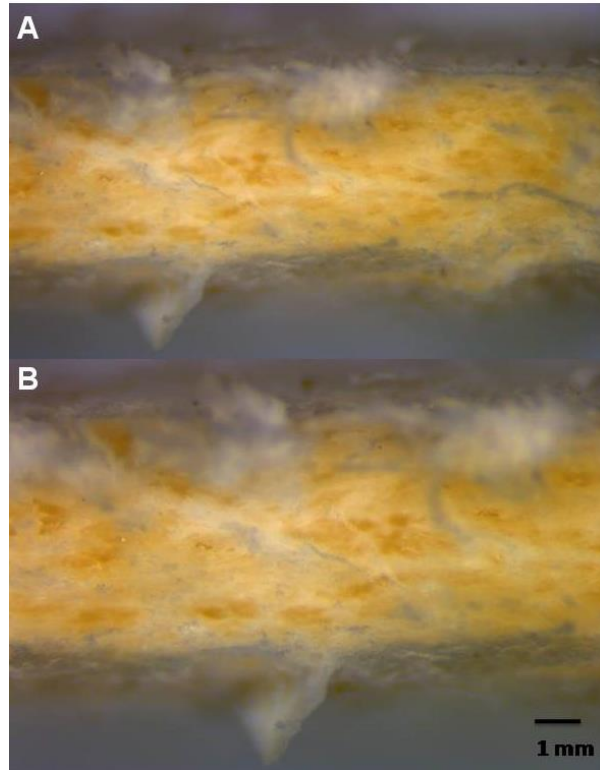


Figura 28. Costado de la MDA en el microscopio estereoscópico (A. Antes del tratamiento con luz UV magnitud 3.2x y B. Después del tratamiento con luz UV magnitud 5.0x). Fuente propia.

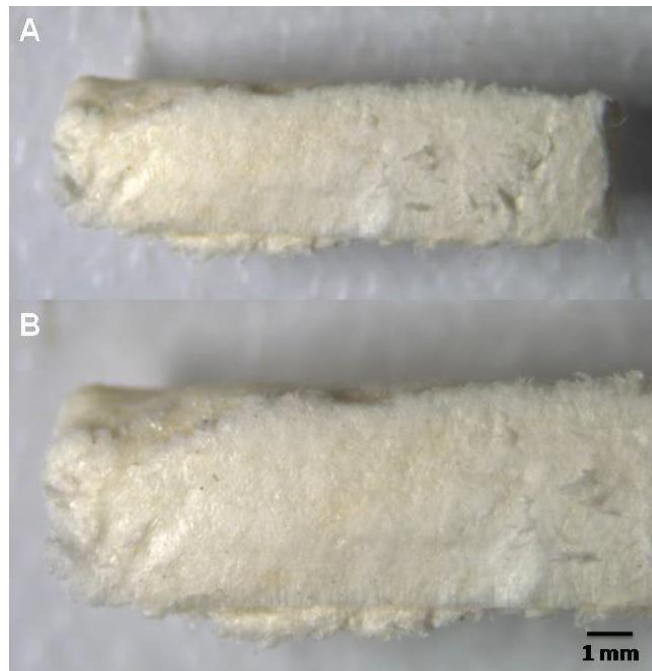


Figura 29. Cara rugosa de la MDA en el microscopio estereoscópico (A. Antes del tratamiento con luz UV magnitud 2.0x y B. Después del tratamiento con luz UV magnitud 4.0x). Fuente propia.

12.2 Prueba de degradación de la MDA:

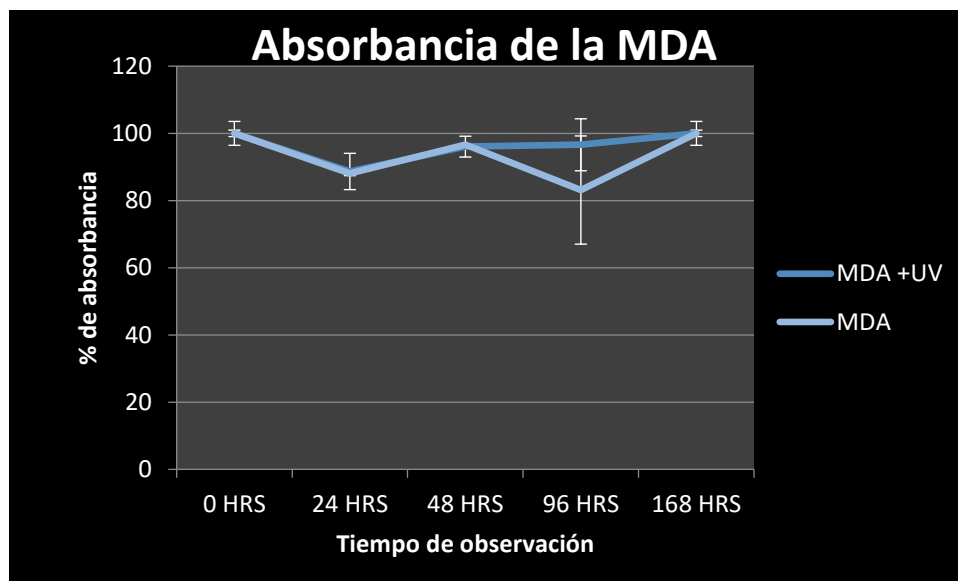
Se obtuvieron las lecturas del espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm según el tiempo de observación establecido (0 hrs., 24 hrs., 48 hrs., 96 hrs. y 168 hrs), se sacaron los promedios de absorbancia de cada muestra, desviación estándar y sus correspondientes porcentajes, lo cual dio como resultado al aplicar las prueba de normalidad t-student no hay significancia estadística ($p < 0.05$) por lo tanto la degradación la MDA re-esterilizada con luz UV es muy similar a la degradación de la MDA sin tratamiento excepto a las 96 horas de ser observadas las MDA, pues la muestra sin tratamiento tuvieron una menor degradación en ese tiempo, comparando con la MDA, la cual se observó una degradación de su estructura más constante (**Ver tabla 1 y gráfica 1**).

Tabla 1. Valores de la absorbancia de la MDA tratada con luz UV. Fuente propia.

Tiempo	Control	Promedio MDA +UV	Desv. Estándar MDA +UV	% Promedio
0 Hrs	0.2996	0.2981	0.0106	100 ± 3.55
24 Hrs	0.3596	0.2643	0.0161	88.6 ± 5.4
48 Hrs	0.4266	0.2863	0.0092	96.1 ± 3.09
96 Hrs	0.4048	0.2879	0.0231	96.6 ± 7.73
168 Hrs	0.2996	0.2981	0.0106	100 ± 3.55

Tabla 2. Valores de la absorbancia de la MDA sin tratamiento. Fuente propia.

Tiempo	Control	Promedio MDA	Desv. Estándar MDA	% Promedio
0 Hrs	0.2996	0.2925	0.002804857	100 ± 0.95
24 Hrs	0.3596	0.2577	0.00205061	88.10 ± 0.7
48 Hrs	0.4266	0.2826	0.0000	96.62 ± 0.01
96 Hrs	0.4048	0.2431	0.047069741	83.12 ± 16.09
168 Hrs	0.2996	0.2925	0.002804857	100 ± 0.95

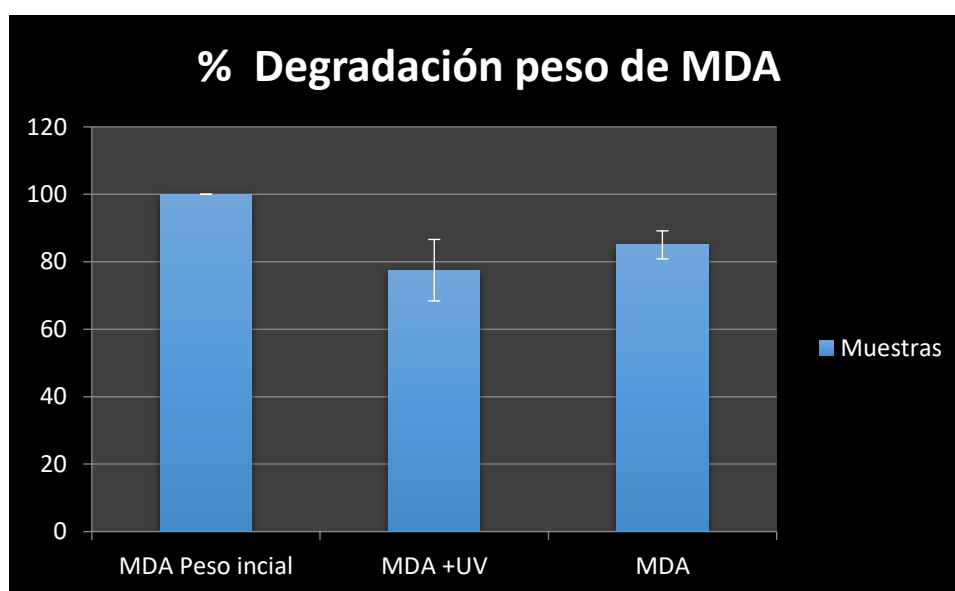


Gráfica 1. Porcentaje de absorbancia de la MDA con y sin luz UV. Fuente propia

Además del peso inicial y final de dicha muestra fueron tomados en cuenta, resultando en la prueba de normalidad t-student que no hay significancia estadística comparando la pérdida de masa que tuvo la MDA con la re-esterilización UV y la MDA sin tratamiento (**Ver tabla 3 y grafica 2**). Al término del ensayo las muestras 1 y 2 que fueron re-esterilizadas con UV conservaron el color antes de ser degradadas, mientras que las muestras 3 y 4 que no recibieron tratamiento adquirieron un color marrón (**Ver figura 30**).

Tabla 3. Peso inicial-final de prueba de degradación y porcentaje de pérdida de masa. Fuente propia

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia	% Masa perdida
1 MDA +UV	0.0038	0.0033	0.0005	13.15
2 MDA +UV	0.0036	0.0029	0.0007	19.44
3 MDA	0.0044	0.0035	0.0009	20.45
4 MDA	0.0042	0.0033	0.0009	21.43



Gráfica 2. Porcentaje de degradación en el peso de la MDA con y sin luz UV. Fuente propia.

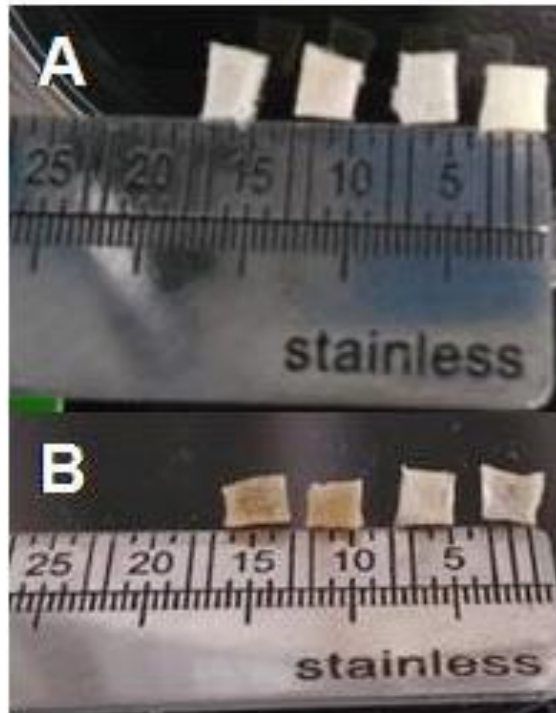


Figura 30. Comparación de las MDA de derecha-izquierda muestras 1, 2, 3 y 4 (A. Antes de la prueba de degradación y B. Después de la prueba de degradación). Fuente propia.

12.3 Prueba de actividad antimicrobiana de la MDA:

Se observaron los medios de cultivo de cada incubadora tanto para bacterias anaerobias y anaeróbicas, no se registró ningún crecimiento bacteriano para los grupos con y sin re-esterilización a excepción del grupo de control positivo el cual fueron inoculadas con bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*.

Tabla 4. Crecimiento bacteriano de las muestras de MDA con medios de cultivo en incubadora para bacterias aerobias. Fuente propia (**Ver figuras 31, 32, 33, 34, 35 y 36**).

Medio	MDA	MDA + UV	Control (+)	Control (-)
<i>E. coli</i>				
Mueller Hinton	No	No	Sí	No
Infusión cerebro-corazón	No	No	Sí	No
Mac Conkey	No	No	Sí	No
Sangre de canero al 5%	Sí	No	Sí	No

Tabla 5. Crecimiento bacteriano de las muestras de MDA con medios de cultivo en incubadora para bacterias anaerobias. Fuente propia (**Ver figuras 37, 38 y 39**).

Medio	MDA	MDA + UV	Control (+)	Control (-)
<i>E. faecalis</i>				
Mueller Hinton	Sí	No	Sí	No
Sangre de canero al 5%	Sí	No	Sí	No

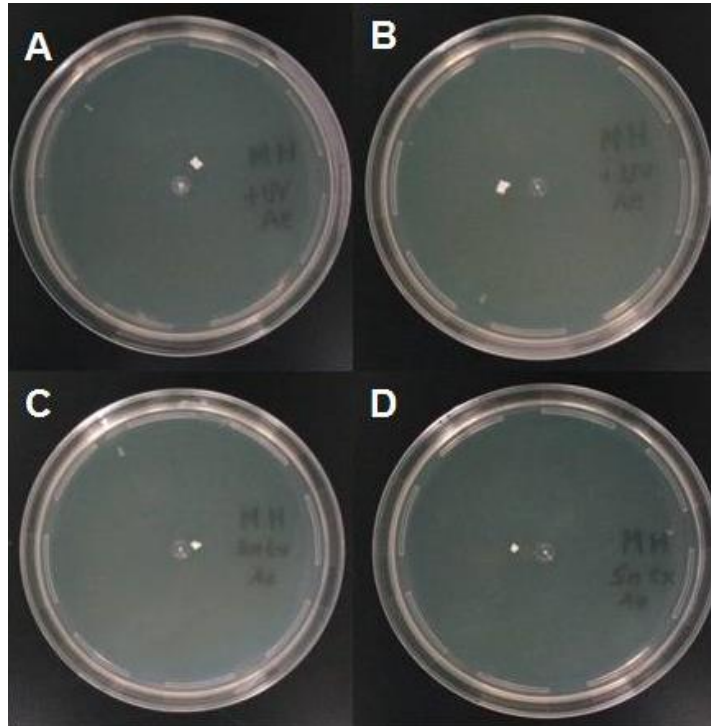


Figura 31. Medios de cultivo Mueller-Hinton con muestras de MDA en incubadora de aerobios (A. Muestra 1 y B. Muestra 2 re-esterilizados con luz UV) (C. Muestra 3 y D. Muestra 4 sin tratamiento). Fuente propia.

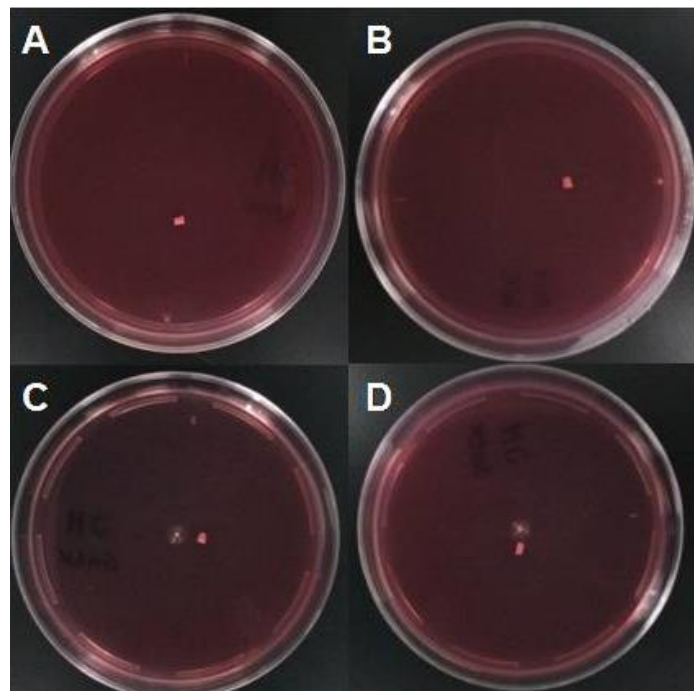


Figura 32. Medios de cultivo Mac Conkey con muestras de MDA en incubadora de aerobios (A. Muestra 1 y B. Muestra 2 re-esterilizados con luz UV) (C. Muestra 3 y D. Muestra 4 sin tratamiento). Fuente propia.

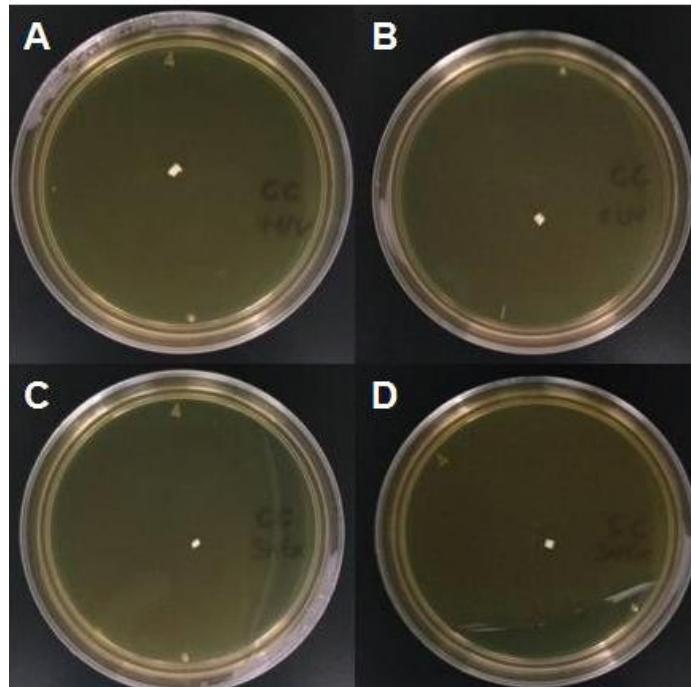


Figura 33. Medios de cultivo Infusión cerebro-corazón con muestras de MDA en incubadora de aerobios (A. Muestra 1 y B. Muestra 2 reesterilizados con luz UV) (C. Muestra 3 y D. Muestra 4 sin tratamiento). Fuente propia.

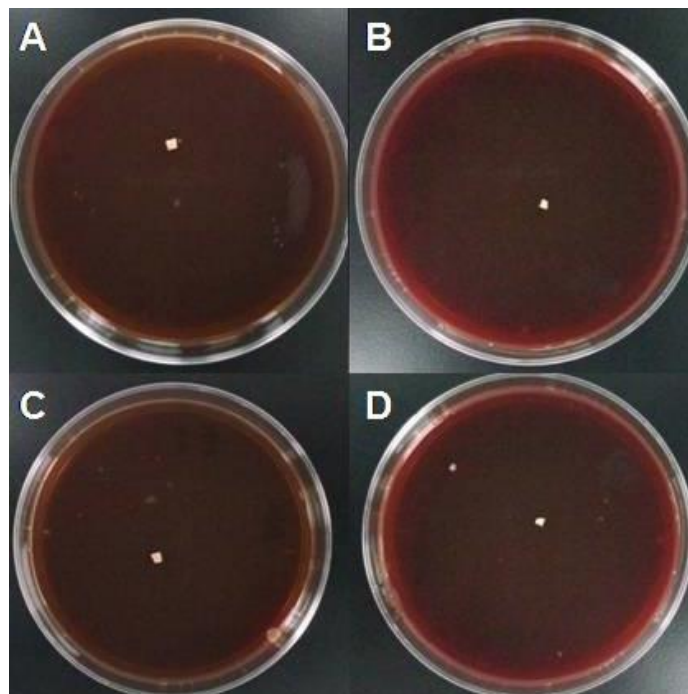


Figura 34. Medios de cultivo Sangre de carnero al 5% con muestras de MDA en incubadora de aerobios (A. Muestra 1 y B. Muestra 2 reesterilizados con luz UV) (C. Muestra 3 y D. Muestra 4 sin tratamiento). Fuente propia.

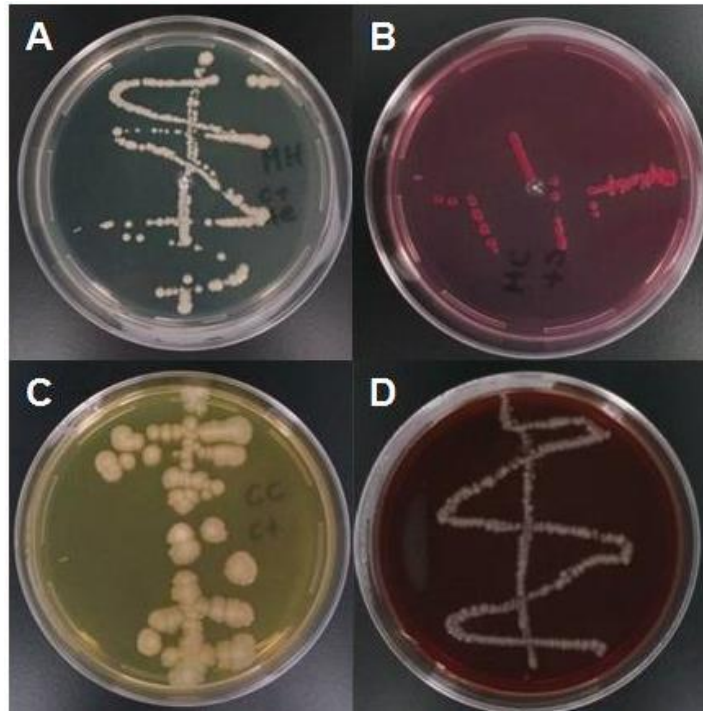


Figura 35. Control positivo de medios de cultivo inoculados con *E. coli* (A. Mueller-Hinton, B. Mac Conkey, C. Infusión cerebro-corazón y D. Sangre de carnero 5%). Fuente propia.

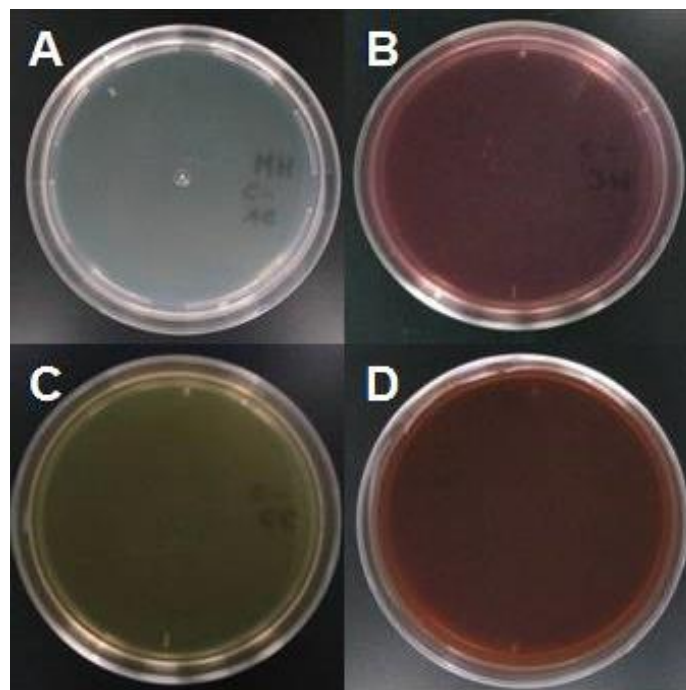


Figura 36. Control negativo de medios de cultivo (A. Mueller-Hinton, B. Mac Conkey, C. Infusión cerebro-corazón y D. Sangre de carnero 5%). Fuente propia.

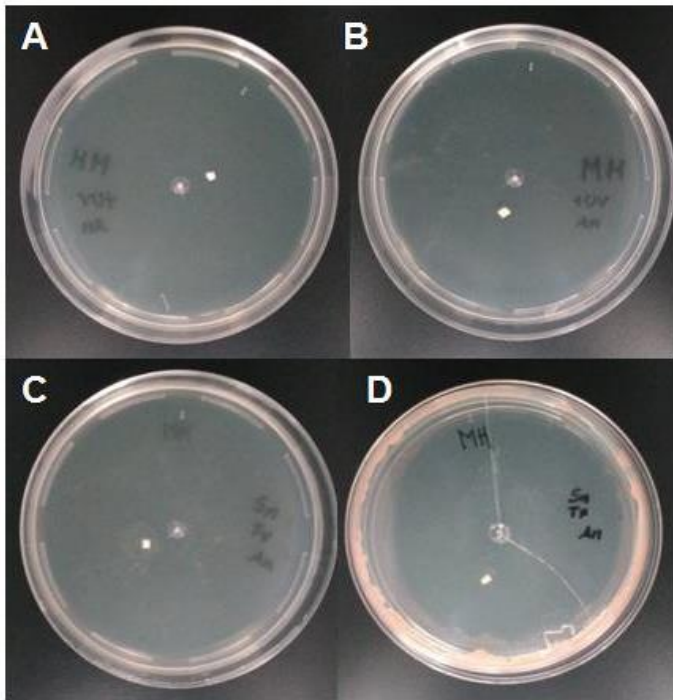


Figura 37. Medios de cultivo A. Mueller Hinton en incubadora para bacterias anaerobias (A. Muestra 1 y B muestra 2 con re-esterilización UV) (C. Muestra 3 y D muestra 4 sin tratamiento). Fuente propia.

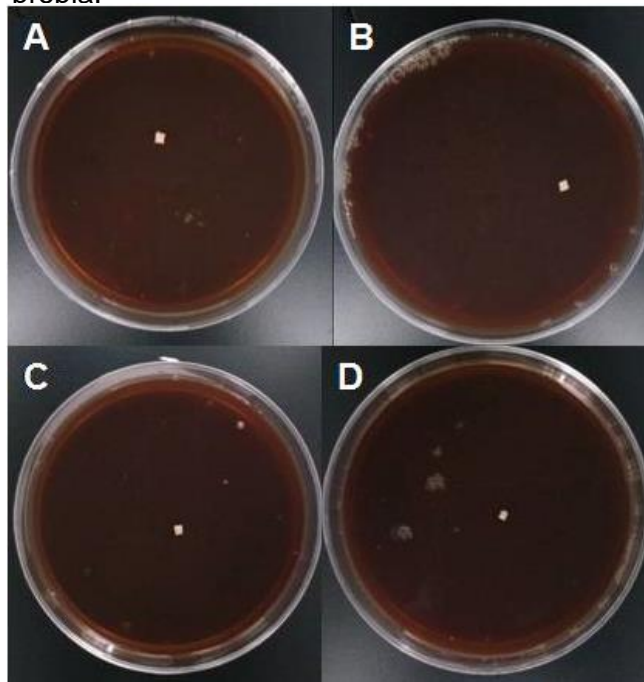


Figura 38. Medios de cultivo A. Sangre de carnero al 5% en incubadora para bacterias anaerobias (A. Muestra 1 y B muestra 2 con re-esterilización UV) (C. Muestra 3 y D. muestra 4 sin tratamiento). Fuente propia.

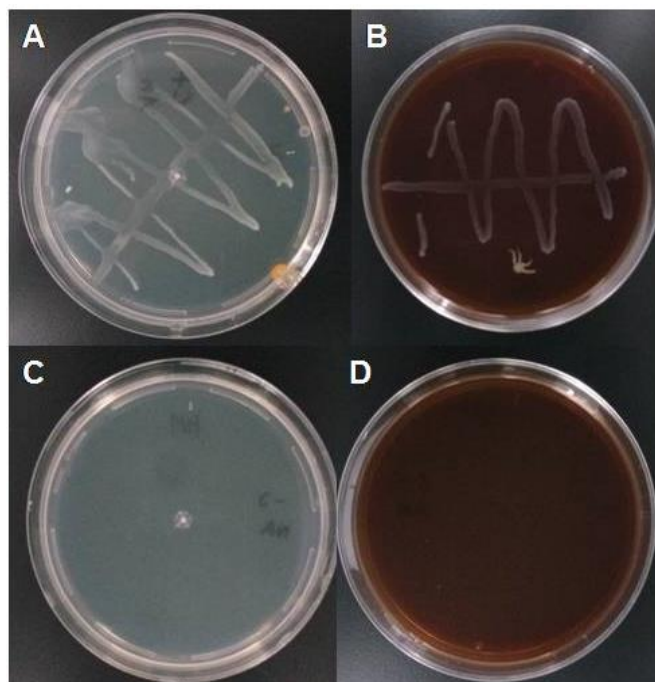


Figura 39. Control positivo inoculados con *E. faecalis* en incubadora de anaerobios (A. Muestra Mueller-Hinton y B muestra 2 Sangre de carnero 5%) Control negativo en incubadora de anaerobios (C. Muestra 3 Mueller-Hinton y D. muestra 4 Sangre de carnero 5%). Fuente propia.

12.4 Prueba de citotoxicidad de la MDA:

Se sacaron los valores de absorbancia para cada muestra de MDA, obteniendo el porcentaje de viabilidad celular, desviación estándar y porcentaje de desviación estándar de cada uno de los experimentos con método indirecto y directo. Tomando en cuenta los parámetros que indican si un material es o no es citotóxico (Ver tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de citotoxicidad de un material. Fuente propia.

Parámetro de citotoxicidad	% de viabilidad celular
No tóxico	75 – 100
Toxicidad ligera	50 - 74.9
Toxicidad moderada	25 - 49.9
Toxicidad severa	0 - 24.9

12.4.1 Citotoxicidad contacto directo

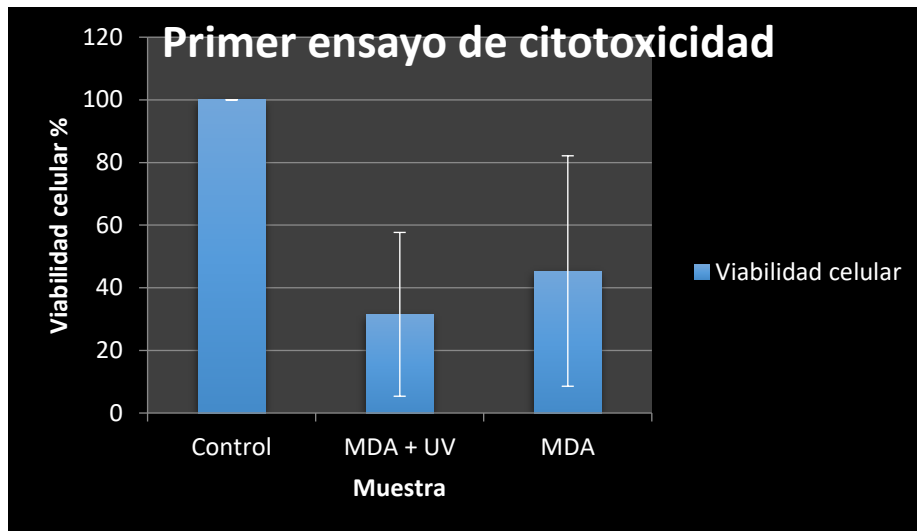
Se realizaron 2 ensayos de citotoxicidad con contacto directo, obteniendo los siguientes resultados:

Primer ensayo de citotoxicidad de contacto directo: Se evaluaron los resultados a las 24 horas, obteniendo que la MDA con tratamiento re-esterilizante con luz UV hubo una **citotoxicidad moderada** sobre los FGH al igual que la MDA que no recibió ningún tratamiento (**Ver tabla 7**).

Segundo ensayo de citotoxicidad de contacto directo: Se evaluaron los resultados a las 24 y 48 horas, obteniendo que la MDA con tratamiento re-esterilizante con luz UV y la MDA sin tratamiento, ambas tuvieron una toxicidad **ligera** sobre los FGH al observarlas a las 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas el resultado fue que las MDA con y sin tratamiento de luz UV resultaron en **no tóxicos** sobre los FGH lo cuales hubo una mayor población de éstas células orales que a las 24 horas (**Ver tabla 8**).

Tabla 7. Resultados de primero ensayo por contacto directo de citotoxicidad. Fuente propia (**Ver gráfica 3**).

Muestra	Promedio absorbancia	% Viabilidad celular	Desviación Estándar	Toxicidad
Control	0.5871	100 ± 7.52	0.044186809	
MDA + UV	0.1851	31.52 ± 26.14	0.153512882	Moderada
MDA	0.2662	45.34 ± 36.78	0.215950411	Moderada



Gráfica 3. Viabilidad celular del primer ensayo de citotoxicidad con contacto indirecto. Fuente propia (Ver figura 40).

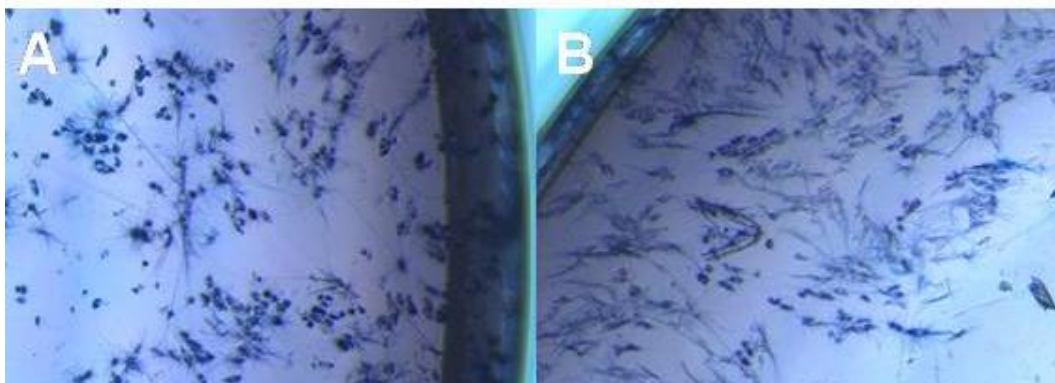
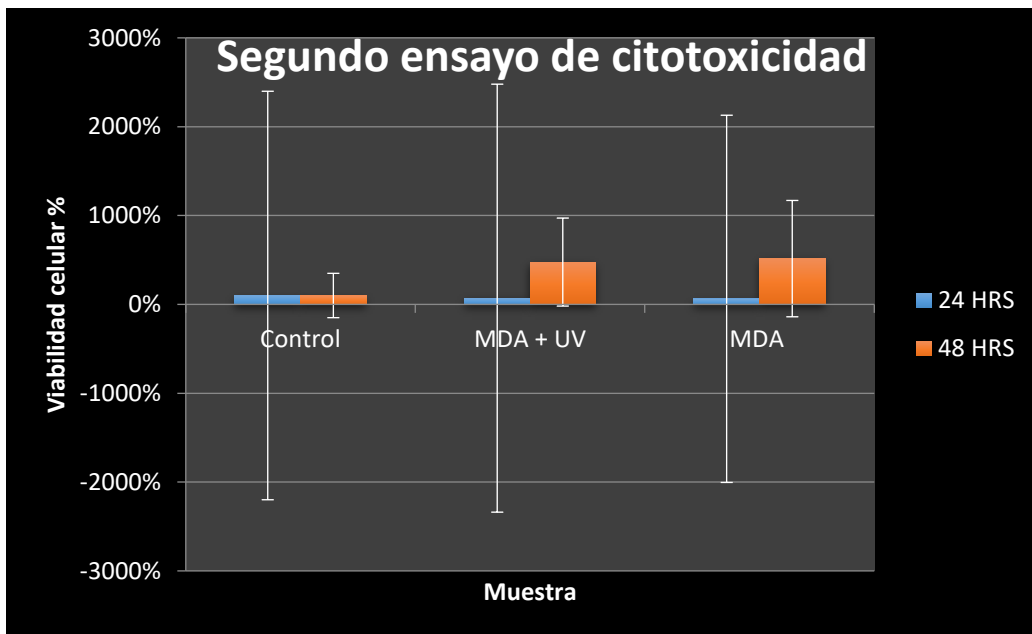


Figura 40. FGH en primero ensayo de citotoxicidad directo (A. MDA con luz UV y B. MDA sin tratamiento). Fuente propia.

Tabla 8. Resultados de segundo ensayo por contacto directo de citotoxicidad. Fuente propia (Ver gráfica 4).

Muestra	Promedio absorbancia	% Viabilidad celular	Desviación Estándar	Toxicidad
Control	0.4900	100 ± 22.99	0.11264211	
MDA + UV	0.3455	70.31 ± 24.08	0.11801612	Ligera
MDA	0.3070	64.49 ± 20.66	0.10125769	Ligera
Control	0.3683	100 ± 2.49	0.00919239	
MDA +UV	1.7565	476.92 ± 4.95	0.01824335	No tóxico
MDA	1.8976	515.22 ± 6.54	0.02411234	No Tóxico



Gráfica 4. Viabilidad celular del segundo ensayo de citotoxicidad con contacto directo. Fuente propia (Ver figura 41).

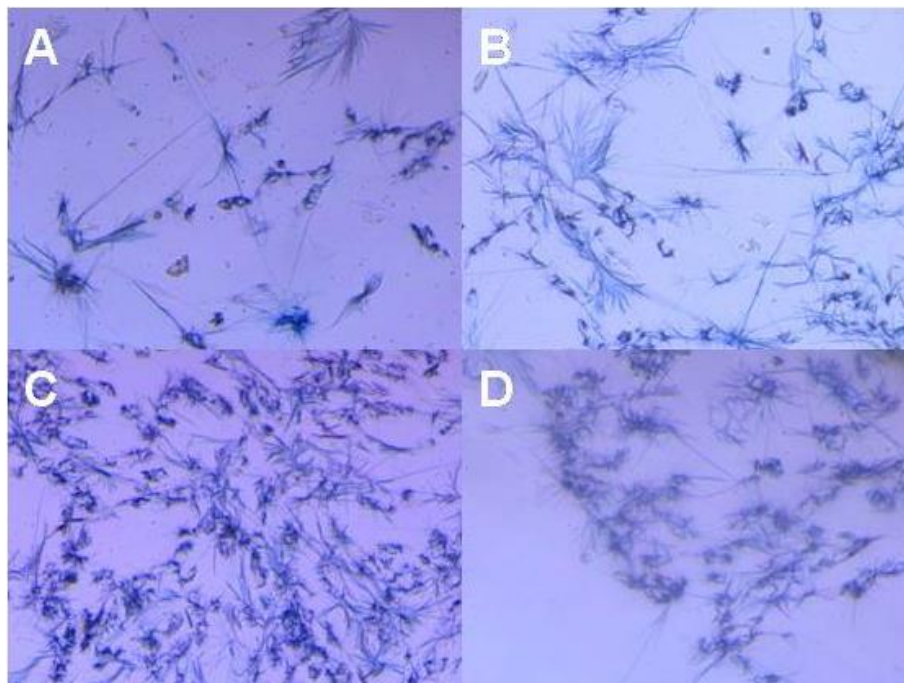
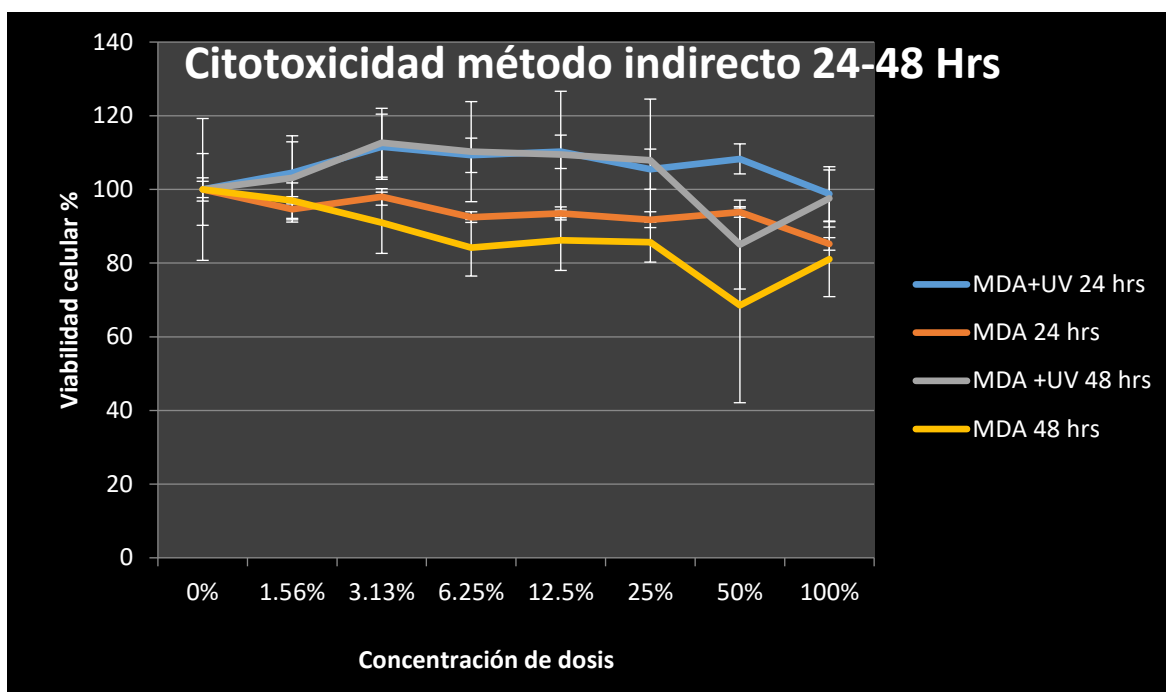


Figura 41. FGH después del segundo ensayo de citotoxicidad contacto directo: **observación 24 horas** (A. MDA mas luz UV y B. MDA sin tratamiento) **observación 48 horas** (C. MDA mas luz UV y D. MDA sin tratamiento). Fuente propia.

12.4.2 Citotoxicidad contacto indirecto

En el método de contacto indirecto de la MDA, se obtuvo que la MDA **no es tóxica** al entrar en contacto indirecto con los FGH tanto a las 24 y 48 horas de ambos grupos; sin embargo, el porcentaje de viabilidad celular en el grupo re-esterilizado con luz UV fue mayor comparándolo con el grupo que no tuvo tratamiento con re-esterilización usando la luz UV en ambos tiempos de observación (**Ver gráfica 5**). También cabe señalar que no hay significancia estadística realizando la prueba t-student comparando la MDA con re-esterilización UV contra la MDA sin tratamiento, traduciendo en que tienen el mismo efecto no tóxico sobre los FGH ambos grupos (**Ver tabla 9 y figura 42**).



Gráfica 5. Viabilidad celular a diferentes concentraciones de solución MDA-medio de cultivo para FGH. Fuente propia.

Tabla 9. Comparación de significancia estadística de la MDA con y sin tratamiento de luz UV. Fuente propia.

DOSIS	24 Hrs		48 Hrs	
	MDA (%)	MDA +UV (%)	MDA (%)	MDA + UV (%)
Control	100 ± 2.2	100 ± 19.2	100 ± 3.1	100 ± 9.7
1.56%	94.5 ± 3.4	104 ± 8.4	96.9 ± 4.8 *	103.1 ± 11.4
3.13%	97.9 ± 2.2	111.5 ± 8.8	90.9 ± 8.3 ¥	112.6 ± 9.3 *¥
6.25%	92.5 ± 1.4	109.2 ± 4.6	84.1 ± 7.6 *¥	110.2 ± 13.5 ¥
12.50%	93.4 ± 1.7	110.2 ± 4.5	86.2 ± 8.1 *	109.4 ± 17.1
25%	91.7 ± 2.1	105.5 ± 5.4	85.7 ± 5.4 *	107.9 ± 16.6
50%	93.8 ± 1.4	108.2 ± 4.0	68.5 ± 26.4 *	85 ± 12.06 *
100%	85.2 ± 1.7 *	98 ± 7.3	81 ± 10.01 *	97.5 ± 7.73

Valores con significancia estadística

*p<0.05, Prueba t-student pareada intra-grupos

¥p<0.05 Prueba t-student de medias entre-grupos

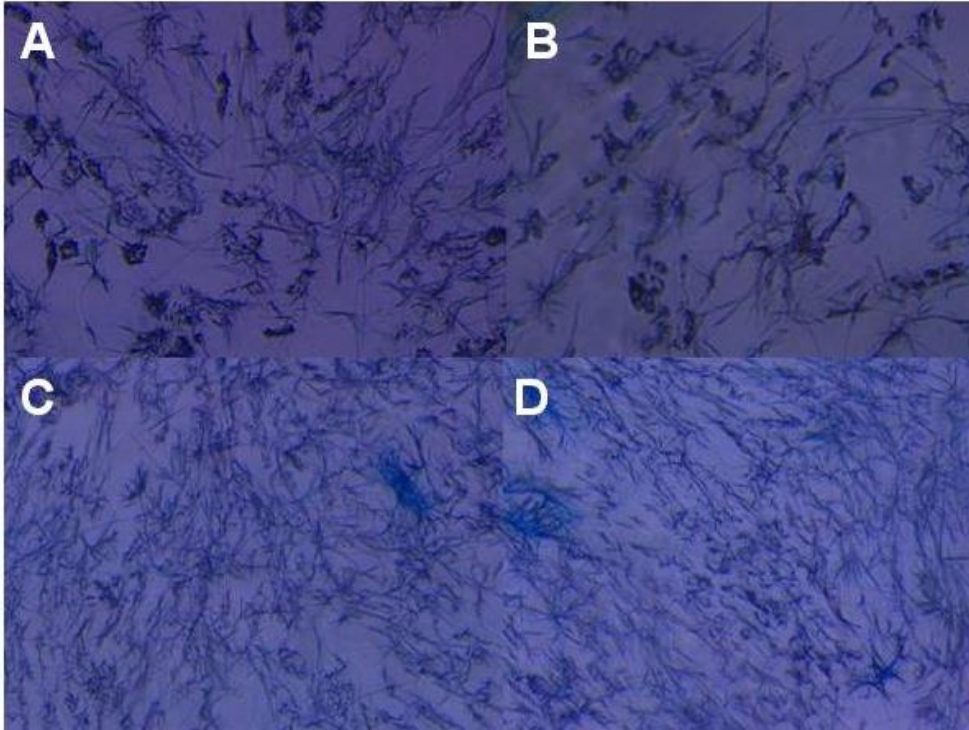


Figura 42. FGH en ensayo de citotoxicidad indirecto: **observación a 24 horas** (A. MDA con luz UV y B. muestra con MDA sin tratamiento) **observación a 48 horas** (C. MDA con luz UV y D. MDA sin tratamiento). Fuente propia

13 Implicaciones bioéticas

El presente proyecto se realizó mediante evaluaciones *in vitro*, por lo que no causará daños en animales ni en seres humanos.

14 Discusión

En cuanto a las diferentes formas de obtención y fabricación de la MDA de las distintas casas comerciales, varias optan por procesos asépticos o menos agresivos contra estos aloinjertos para no repercutir o dañar las propiedades biomecánicas del material, perjudicando su uso quirúrgico⁷. Pero siempre con la advertencia de que cualquier injerto puede no estar libre completamente de bacterias o virus, además de que aún no hay pruebas serológicas adecuadas que puedan evaluar los posibles riesgos de contaminación de algunas bacterias y virus. En las pruebas que se realizaron en éste estudio, las características físicas y biomecánicas del injerto no arrojaron datos negativos o significativos de que éste tipo de MDA re-esterilizada por luz UV hayan cambiado drásticamente, ya que la luz UV no tiene una longitud de onda tan potente como lo es la irradiación gamma pura o el haz de electrones. Otros estudios sobre ingeniería tisular usando membranas ricas en fibrina para cicatrización de heridas, señalan que el mejor método de esterilización de equipo médico es de 25 kGy¹⁶ de irradiación gamma, sin embargo usando la misma dosis o más en un aloinjerto puede cambiar las propiedades mecánicas del tejido, Gouk y cols. Mencionan que sobre un injerto periodontal usando dosis menores a 15 kGy de irradiación gamma es suficiente para esterilizar sin afectar las propiedades mecánicas de éste y Balsly y col. Corroboraron estos estudios al usar dosis de irradiación gamma baja entre 18.3-21.8 kGy con aloinjertos de tejido blando y duro.⁷ Por lo tanto hay una gran controversia en el uso de energía irradiante para esterilizar estos aloinjertos, no obstante en este estudio al usar la luz UV no afectó dicha MDA, teniendo más proliferación celular que una MDA no re-esterilizada lo cual fue un hallazgo

durante la experimentación de citotoxicidad con contacto indirecto, conservando su color y estando estéril completamente al no ver crecimiento bacteriano en los cultivos, siendo el tiempo suficiente de esterilización de 10 minutos. Sin embargo, también el uso de la luz UV a una longitud de onda diferente (365-370 nm) con potencia de 3 mW/cm² por 30 minutos para tratamiento de úlcera corneal resultó ser efectiva, no obstante se optó con este tiempo en nuestro estudio y se demostró que no hubo crecimiento bacteriano, por lo tanto la hipótesis planteada en este estudio pudo cumplirse; pero a pesar de los resultados obtenidos una de las principales limitantes de nuestro estudio fue la poca muestra de MDA que se obtuvo, por lo que valdría la pena realizar estos mismos estudios con más muestra de MDA e incluso otros para completar la investigación de éste primer estudio, ya que el uso de la luz UV tuvo buenos resultados los cuáles podrían empezar a aplicarse sobre el injerto para estudios con animales e incluso más adelante con humanos.

15 Conclusiones

Hoy en día la MDA es una buena opción para el tratamiento de diferentes problemas periodontales, pues su capacidad de regenerar tejidos por más de 20 años ha sido respaldada.

En base a los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que el proceso de re-esterilización con luz UV puede ser opción viable para eliminar completamente las bacterias resistentes a los procesos asépticos a los que fueron sometidos durante su fabricación las MDA, garantizando la esterilidad completa de estos biomateriales, además de que al ser un tratamiento costoso, esto puede reducir significativamente costo del proceso quirúrgico y ser más accesible a la población en general, pues la MDA no solo se utiliza para procesos estéticos sino también procesos regenerativos como los aumentos en reborde alveolar, lo que ayudaría a tener un buen soporte de tejido para prótesis totales o removibles y mejorar la calidad de vida del paciente.

También las pruebas han demostrado no solo que el material está estéril, sino que ha aumentado el porcentaje de repoblación celular comparándolo con el material que no fue re-esterilizado, lo cual nos garantiza que el material no es citotóxico, sin dejar atrás de que se podría obtener mejores resultados regenerativos con la luz UV. No obstante, es necesario realizar más pruebas experimentales y sobretodo clínicas para poder conjuntar la investigación y reforzar los estudios obtenidos en estas pruebas que tuvieron resultados satisfactorios pero en un ambiente controlado.

16 Bibliografía

1. Nilsen JT., Dasgupta A., Chen Huang Y., et al. Do processing methods make a difference in acellular dermal matrix properties? *Aesthetic Surgery Journal* 2016; 36: s7-s22.
2. Nart J., Carbonelli J., Sanz J., et al. Matriz de colágeno en cubrimiento radicular, revisión y caso clínico. *Revista de Periodoncia y Osteointegración* 2011; 21: 163-168.
3. Navarro-Navarro C., Zerón A. Comparación entre la MDA y el tejido conectivo como materiales de injerto para el recubrimiento de recesiones gingivales. *Revista mexicana de periodontología* 2011; 2: 115-123.
4. Morillo-Monegro LM., Rodríguez-Pulido JI., Martínez-Sandoval G. et al. Matriz dérmica acelular en cirugía mucogingival. *Rev ADM* 2016; 73:121-126.
5. Bailey PS and Bailey CA. *Organic Chemistry. A brief of concepts and applications*, 5a Ed. Pearson prentice hall; 1995.
6. Roessner ED., Vitacolonna M. and Hohenberger P. Confocal laser scanning microscopy evaluation of an acellular dermis tissue transplant (Epiflex). *PLOSEone* 2012; 7: 1-8.
7. Ardila-Medina CM. Propiedades biomecánicas y proceso de esterilización de las matrices alodérmicas usadas en periodoncia. *Avances en periodoncia e implantología* 2011; 23: 187-193.
8. Macadam SA., Lennox PA. Acellular dermal matrices: use in reconstructive and aesthetic breast surgery. *Canadian Journal Plastic Surgeons* 2012; 20(2): 75-89.
9. Badylak SF., Freyetes DO., Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *ActaBiomater* 2009; 5(1): 643-646.
10. Cheung DT., Perelman N., Tong D., et al. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *Journal Biomed MaterRes* 1990; 24(5): 581-589.

11. Mollers S., Heschel I., Damink LH, et al. Cytocompatibility of a novel, longitudinally microstructured collagen scaffold intended for nerve tissue repair. *Tissue Engineering Part A* 2009; 15(3): 461-472.
12. Noah EM., Chen J., Jiao X., et al. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering. *Biomaterials* 2002; 23(14): 2855-2861.
13. Bouchez LC., Boitano AE., De Lichetervelde L., et al. Small-molecule regulators of human stem cell self-renewal. *Chembiochem* 2011; 12(6): 854-857.
14. Sun WQ., Xu H., Sandor M., et al. Process-induced extracellular matrix alterations affect the mechanisms of soft tissue repair and regenerations. *Journal of tissue Engineering* 2013; 4: 1-13.
15. Matsuka AM., McFetridge PS. The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold; implications for stem cell adhesion. *Journal Biomedical Materials Research B Applications Biomaterials* 2015; 103(2): 397-406.
16. Mrazova H., Koller J., Kubisova K., et al. Comparison of structural changes in skin and amnion tissue grafts for transplantation induced by gamma and electron beam irradiation for sterilization. *Cell Tissue Banking* 2016; 17(2): 255-260.
17. Midwood KS., Mao Y., Hsia HC., et al. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings* 2006; 11(1): 73-78.
18. Rawlani V., Buck DW II., Johnson SA., et al. Tissue expander breast reconstruction using prehydrated human acellular dermis. *Annals of plastic surgery* 2011; 66(6): 593-597.
19. Vicario Juan M., Pascual La Rocca A., Vives Bonet MT., et al. Técnicas de cirugía mucogingival para el cubrimiento radicular. *RCOE* 2006; 11(1): 61-73.
20. Ardila-Medina CM. Aplicación de la MDA para prevenir recesiones gingivales. *Avances en periodoncia* 2009; 21: 27-34.

21. Harris RJ. Histologic evaluation of root coverage obtained with GTR in humans: a case report. *International Journal Periodontics Retorative Dentistry* 2001; 21(3): 240-251.
22. Henderson RD., Greenwell H., Drisko C. et al. Predictable multiple site root coverage using an acellular dermal matrix allograft. *Journal of Periodontology* 2001; 75(5): 571-582.
23. Rose LF., Mealey BL., Genco RJ., et al. *Periodontics medicine, surgery, and implants*. 1 ed. Elsevier Mosby; 2004.
24. Newman GM., Takei HH., Klokkevold PR., et al. *Periodontología clínica de carranza*. 11 edición. Amolca; 2014.
25. Vargas-Casillas AP., Yañez-Ocampo BR. y Monteagudo-Arrieta CA. *Periodontología e implantología*. Médica Panamericana; 2016.
26. Gouk SS., Lim TM., Teoh SH., et al. Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling. *Journal biomedical material research part b applied biomaterials* 2008; 84: 205-217.
27. Barker TS., Cueva MA., Rivera Hidalgo F., et al. A comparative study of root coverage using two different acellular dermal matrix products. *Journal of Periodontology* 2010; 81(11): 1596-1603.
28. Cummings L., Kaldahl Wayne., Allen E. Histologic evaluation of autogenous connective tissue and acellular dermal matrix grafts in humans. *Journal Periodontology* 2005; 76(2): 178-186.
29. Lindhe J., Lang NP. *Periodontología clínica e implantología o dentológica*. 5a edición. Médica Panamericana; 2009.
30. Soledispa Cañarete K. Radiación ultravioleta y su efecto en salud. *Ciencia UNEMI* 2010; 1: 26-33.
31. Tippens P. *Física, conceptos y aplicaciones*. 7ª edición. McGraw Hill; 2001.
32. Welch D., Buonanno M., Shurryak I., et al. Effect of far ultraviolet light emitted from an optical diffuser on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*. *Ploose one* 2018; 13(8): 1-10.

33. Roshani Edirisinghe EA., Anuruddhika Dissanayake DR., Abayasekera CL., et al. Efficacy of calcium hypochlorite and ultraviolet irradiation against *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. The International Journal of Mycobacteriology 2017; 6: 311-4.
34. El Haddad L., Ghantaji SS., Stibich M., et al. Evaluation of a pulsed xenon ultraviolet disinfection system to decrease bacterial contamination in operating rooms. BMC infectious diseases 2017; 17:1-5.
35. Castellanos Franco TE., Muñoz Solórzano B., Saucedo Rodríguez LR., et al. Queratitis infecciosas en el hospital civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde. Revista médica 2017; 9(1):1-5.
36. Akbari Saeed T., Ahmadi Zeyd Abadi M., Fatemi A., et al. In vitro evaluation of decontamination effects on mechanical properties of fibrin membrane. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran 2018; 32 (2):1-7.
37. Cabrera Morales CM. y López Nevot MA. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. Oncología 2006; 29 (7): 291-298.
38. Sánchez JP., Arias Echandi M., Armenta Prada J., et al. Luz ultravioleta germicida y control de microorganismos ambientales en hospitales. Rev Costarr Salud Pública 2012; 21 (1): 19-22.
39. Espinosa Meléndez MT. Farmacología y terapéutica en odontología. fundamentos y guía práctica. 1a Edición. Médica panamericana; 2012.
40. Marsh P. y Martin M. Microbiología oral. 5a Edición. Amolca; 2010.
41. Feres M., Figueiredo L. y Silva Soares MF. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. Periodontology 2000 2015; 67: 131-186.
42. Maverakis E., Miyamura Y., Bowen M., et al. Light, including ultraviolet. J Autoimmun 2010; 34 (3): J247-J257.