



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**NIVELES DE PROLIFERACIÓN CELULAR, ACTIVIDAD  
METABÓLICA Y CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS EN  
UN MODELO IN VITRO DE UN BIOIMPLANTE A PARTIR  
DE FIBROBLASTOS GINGIVALES CULTIVADOS SOBRE  
UNA MEMBRANA BIOLÓGICA.**

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

VÍCTOR MANUEL SOTO SÁNCHEZ

TUTOR: C.D. CARLOS ALBERTO MONTEAGUDO ARRIETA

ASESOR: Mtro. SAÚL CANO COLÍN



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.

## Sólo quiero agradecer . . .

A mis padres, Laura y Jesús, por su apoyo, sus regaños, su inspiración, su ejemplo, su esfuerzo para hacer de mi una mejor persona, de verdad no saben cuánto los amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de ella.

A todas las personas que conocí en la Facultad, por hacerme pasar grandes momentos.

A mi tutor y amigo C.D Carlos Monteagudo Arrieta, por mostrarme el camino.

A mis hermanos, Laura y Daniel ¡sigan así!

A Tannya, por tu inmenso apoyo. . . Te amo.

A mis amigas, Verónica, Liliana, Ileana, por todo lo que hemos pasado, por sus consejos y por estar ahí cuando las he necesitado.

A mis amigos Iván, Héctor, Carlos, Luis, Franco, Gustavo, por hacer más ameno el viaje desde hace once años.

A mi asesor, el Dr. Saúl Cano Colín, por su enseñanza, su amistad y permitirme ser parte del equipo.



---

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN . . . . .	4
2. ANTECEDENTES . . . . .	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . .	12
4. JUSTIFICACIÓN . . . . .	12
5. OBJETIVOS . . . . .	13
5.1 General. . . . .	13
5.2 Específicos . . . . .	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	14
6.1 Tipo de estudio . . . . .	22
6.2 Variables de estudio . . . . .	22
7. RECURSOS . . . . .	23
7.1 Humanos . . . . .	23
7.2 Materiales . . . . .	23
7.3 Financieros . . . . .	24
8. RESULTADOS . . . . .	25
9. DISCUSIÓN . . . . .	38
10. CONCLUSIONES . . . . .	40
11. FUENTES DE INFORMACIÓN . . . . .	41



## 1. INTRODUCCIÓN

La poca disponibilidad de órganos y tejidos existentes para ser transplantados, que supera por mucho el número de pacientes que los necesitan, son problemas que han motivado al estudio de la medicina regenerativa, la cual ha ganado gran impacto conforme aumenta el conocimiento de los mecanismos naturales de la regeneración de los tejidos y así para su aplicación se diseñan e implementan métodos que permiten la regeneración de tejidos dañados que de otra manera, serían reparados por fibrosis (cicatrización).

Existen tres estrategias básicas en la medicina regenerativa:

- La inyección o trasplante de células para reemplazar el tejido dañado (terapia celular).
- La construcción de un tejido bioartificial u órgano para reemplazar el original (ingeniería de tejidos).
- La inducción farmacológica de la regeneración a partir de los tejidos propios del organismo.

La creación de tejidos y estructuras biológicas *in vitro* requiere un considerable conocimiento de biología celular para garantizar la supervivencia, crecimiento y estimular su funcionalidad. En concreto manteniendo ciertos requisitos durante el cultivo de la célula, como son, oxígeno, pH, humedad, temperatura, nutrientes y el mantenimiento de la presión osmótica, se garantizara la viabilidad de esta.

En los últimos años han surgido enfoques biológicos basados en los principios de la ingeniería tisular como alternativas a los tratamientos convencionales, tratamientos como la administración local de membranas biocompatibles con células y factores de crecimiento, entre otros, ofrecen



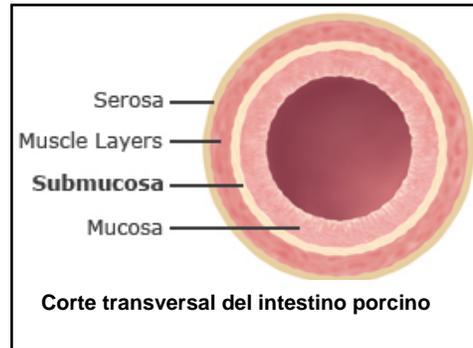
alternativas diferentes a las terapias de regeneración periodontal ya existentes.

La aplicación más eficaz en la ingeniería de tejidos hasta ahora ha sido el desarrollo de tejidos muy parecidos a la piel. Como en los tratamientos estéticos de pacientes que han sido severamente dañados por quemaduras, en tratamientos radicales de recesiones de cáncer, o en el tratamiento de cicatrices.

La Ingeniería de tejidos no solo se ha limitado al área dermatológica, sino que también ha incursionado en la odontología, tal es el caso de la Periodoncia; sobre todo en tratamientos mucogingivales como: cobertura radicular en recesiones gingivales, aumento de tejido queratinizado y regeneración de papila interdental, por mencionar algunos tratamientos. Dentro del campo de ingeniería de tejidos la utilización de matrices para guiar la proliferación de tejidos ha incluido los procedimientos de regeneración tisular guiada (RTG), la cual busca la nueva formación de hueso, cemento y ligamento periodontal.

Los substitutos de mucosa oral desarrollados hasta el momento incluyen los que están basados en substitutos monocapa, tomadas de queratinocitos de mucosa oral de tejido epitelial o de piel humana cadavérica; substitutos bicapa constituidos por una capa de tejido conectivo equivalente a la matriz extracelular y otra capa semejante al epitelio, submucosa intestinal de cerdo, la cual es tomada del intestino porcino, esta submucosa se encuentra entre la capa mucosa y muscular del intestino.

Esta membrana estimula la producción de tejido de granulación y la reepitelización de heridas de la dermis, ofreciendo grandes ventajas para tratamientos como el manejo de úlceras en las venas.



El SIS se extrae del intestino de forma que se remueven todas las células y se deja intacta solamente la matriz compleja.

**The Components of OASIS® Wound Matrix**

Components*	OASIS® Wound Matrix	Human Dermis
<b>COLLAGEN MATRIX</b>		
Type I	■	■
Type III	■	■
Type IV	■	■
Type V	■	■
Type VI	■	■
<b>ELASTIN</b>		
	■	■
<b>GLYCOSAMINOGLYCANS</b>		
Heparin Sulfate	■	■
Hyaluronic Acid	■	■
Chondroitin	■	■
<b>GLYCOPROTEINS</b>		
Fibronectin	■	■
Laminin**	■	■
<b>PROTEOGLYCANS</b>		
Decorin	■	■
HSPG***	■	■

**Componentes bioquímicos de la membrana de submucosa intestinal de cerdo**

La reparación y regeneración de tejidos a través de un andamiaje natural como lo da la membrana de submucosa intestinal de cerdo ha sido analizada desde el punto de vista bioquímico, porque contienen dentro de sus propiedades, colágena (tipo I, III y IV), glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, condroitin sulfato A y B, heparina y heparan sulfato), proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina), los cuales se sabe que tienen un papel importante en la

reparación y regeneración de los tejidos del huésped; además de factores de crecimiento que proporcionan un ambiente conductivo para la angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular.



---

## 2. ANTECEDENTES

La creación *in vitro* de tejido vivo que se pudiera transplantar fue uno de los objetivos más importantes de la ingeniería tisular. Uno de los primeros antecedentes realizados por bioingeniería en odontología, consistió en el cultivo de células epiteliales autólogas derivadas de una biopsia, utilizadas como sustituto epitelial, lo cual abrió paso a la aplicación de la Ingeniería de Tejidos para tratamientos bucales<sup>1</sup>.

Hacia 1960 los avances en la ingeniería mecánica, química y eléctrica junto con la investigación en fisiología y medicina empezaron a producir dramáticos avances en el área de la salud.<sup>2</sup>

En 1965, Urist reportó la generación de tejidos estructurados, lo cual significó la autoinducción de hueso.

En la década de 1970, Green describió una serie de experimentos relacionados a la generación de nuevo cartílago<sup>2</sup>.

Algunas de las primeras aplicaciones clínicas de células humanas logradas por la ingeniería de tejidos datan de la década de 1980, con tejido epitelial usando fibroblastos y queratinocitos cultivados en membranas biológicas.

En esta década es cuando comienzan algunos de los trabajos sobre Regeneración Tisular Guiada, la cuál puede ser considerada como el antecesor de la Ingeniería Tisular en la aplicación de conceptos biológicos para tratamientos odontológicos<sup>3</sup>.

En 1988, Vacanti y cols., reportaron el trasplante celular usando matrices de polímeros biodegradables. Un año después, Wakitani y cols., lograron la regeneración de las superficies articulares de un conejo utilizando cultivos de células alogenas embebidas en un gel de colágena<sup>4</sup>.



---

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conocer las características de proliferación celular, viabilidad metabólica e integración histológica de los fibroblastos gingivales sobre la membrana de submucosa intestinal de cerdo en distintas condiciones como son la densidad celular y tiempo de crecimiento en periodos de 24 y 48 horas.

### 4. JUSTIFICACIÓN

El reconocimiento de la biología del bioimplante de fibroblastos cultivados en una membrana de submucosa intestinal de cerdo, nos optimizara los fundamentos para una producción e inducción ampliándose su uso como una futura opción en el tratamiento de deformidades mucogingivales.



En 1991 Lohan van Dijk y cols., reportaron uno de los primeros estudios en la siembra de fibroblastos cultivados para la regeneración periodontal. El estudio indicó que el cultivo de fibroblastos del ligamento periodontal es una técnica útil para formar una nueva inserción periodontal, ya que estimula la formación de tejido óseo y evita que se forme epitelio de unión largo y una reabsorción radicular<sup>5</sup>.

Lianjia y cols., en 1993 observaron el papel de los odontoblastos en la formación de dentina en gérmenes dentales y en dientes permanentes. Los hallazgos sugirieron que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), juegan un rol importante en la diferenciación de odontoblastos; ya que la pulpa dental tiene la capacidad de generar dentina en respuesta a estímulos nocivos, como la caries<sup>6</sup>.

En el 2000, Piniprato y cols., reportaron un caso clínico de aumento de encía insertada; en la cual el procedimiento se aplicó en un paciente que mostraba ausencia de tejido queratinizado en el primer premolar inferior izquierdo. Al tomarse una biopsia de epitelio y tejido conectivo, se llevó al laboratorio y se derivaron fibroblastos que después fueron sembrados en una matriz de bencil-éster ácido hialurónico. Quince días después de haberse realizado la cirugía, se observó tejido de granulación sobre la membrana lo que indicaba una buena vascularización, y a los dos meses el sitio había cicatrizado reportándose aumento de tejido queratinizado<sup>7</sup>.

Dogan y cols., en el año 2000, cultivaron células derivadas del ligamento periodontal, con el fin de promover la regeneración en defectos de la furca en perros. Los resultados mostraron que los fibroblastos periodontales promueven la regeneración ósea y la inserción de fibras del tejido conectivo a la superficie dentinaria expuesta con la formación de nuevo cemento<sup>8</sup>.



Ese mismo año, Goldberg y cols., demostraron la producción de la pulpa artificialmente creada con moléculas bioactivas y agentes inductores condrogénicos en canales radiculares de molares superiores extraídos. Este hallazgo ofrece cambios significativos en los tratamientos endodónticos<sup>9</sup>.

Más tarde en el año 2003, Hou y cols., divulgaron un estudio para buscar cuales eran los resultados a largo plazo de un injerto de hidroxiapatita con fibroblastos gingivales cultivados en defectos periodontales en tres pacientes; el estudio mostró que los sitios tratados con hidroxiapatita y fibroblastos gingivales lograron una ganancia en la reducción de la profundidad de la bolsa periodontal, así como en el nivel de inserción<sup>10</sup>.

Un año después Nakahara y cols., utilizaron células derivadas del ligamento periodontal para ser evaluadas histomorfológicamente en una esponja de colágena en fenestraciones óseas en perros. Se encontró que la regeneración del cemento se lograba observar uniformemente en la superficie radicular. Concluyendo que el uso de células sembradas induce la regeneración del cemento en la superficie radicular<sup>11</sup>.

McGuire y Scheyer en el 2007 publicaron estudios de aumento de papila interdental por medio de terapia celular. Los fibroblastos fueron extraídos de una biopsia, cultivados y reintroducidos por medio de inyecciones en la papila interdental para expandir el tejido papilar a través del propio proceso del paciente para producir colágena. El objetivo principal de este estudio era evaluar la eficacia de los fibroblastos autólogos cultivados en inyecciones para el tratamiento de pérdida de papila interdental. Las áreas tratadas, mostraron un porcentaje de incremento de tejido a los dos meses después de la cirugía<sup>12</sup>.



Este mismo año Novaes y cols., utilizaron una matriz dérmica acelular para evaluar histológicamente si los fibroblastos gingivales afectan el proceso de cicatrización.

Se cultivaron fibroblastos derivados de un explante primario tomados de tejido conectivo gingival de perros, posteriormente se sembraron en la matriz dérmica acelular y se dejó otro grupo solo con la matriz sin fibroblastos (grupo control). Los resultados indicaron que la cantidad de vasos sanguíneos era más alta en el grupo de matriz dérmica acelular con fibroblastos, concluyéndose el papel de los fibroblastos gingivales en el funcionamiento del injerto al aumento de la vascularización<sup>13</sup>.

En el 2008, Nakajima y su grupo de colaboradores publicaron un estudio para investigar el efecto regenerativo de un injerto compuesto de una matriz multicapa de fibronectina con fibroblastos gingivales modificados para expresar fosfatasa alcalina (FN-ALP) en defectos periodontales creados en ratas. Los resultados mostraron que la FN-ALP promovió la formación de hueso en fenestraciones formándose también ligamento periodontal y cemento. Este es el primer reporte en donde los injertos de fibroblastos incrementan la formación ósea y por lo tanto la regeneración periodontal, sin manipulación genética<sup>14</sup>.

Actualmente una de las líneas de investigación de la ingeniería tisular aplicada a la Periodoncia en la cirugía mucogingival, mediante el cultivo de fibroblastos sembrados en una membrana, buscando la reconstrucción tridimensional de los tejidos afectados<sup>1</sup>.

Monteagudo y cols., en el año de 2009, desarrollaron injertos autólogos a partir del cultivo de fibroblastos gingivales en una matriz biológica para la cobertura radicular como opción para el tratamiento de recesiones gingivales.



El seguimiento a los dos meses posteriores de la colocación del bioimplante mostraron buena epitelización y estabilización del tejido en la cobertura radicular de algunos dientes, mientras que en otros no se mostró ganancia. Concluyéndose la importancia del fenotipo de los fibroblastos para poder reconocer y determinar qué tipo de actividad celular se puede llevar a cabo en los sitios en los que se injerten las células<sup>16</sup>.



---

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Comparar los niveles de proliferación celular, viabilidad metabólica e integración de fibroblastos gingivales en un modelo *in vitro* de un bioimplante.

### 5.2 Objetivos específicos

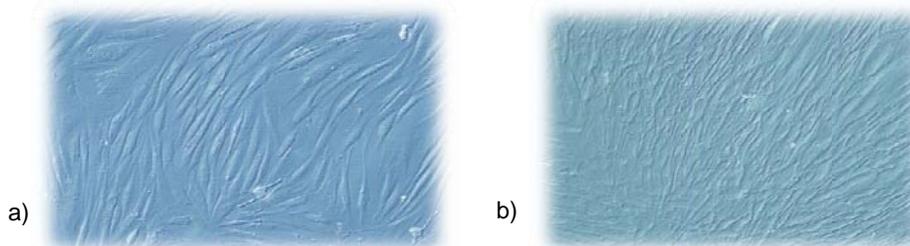
- Analizar la proliferación celular y la viabilidad metabólica en el bioimplante por el método de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).
- Analizar histológicamente la integración de los fibroblastos en el bioimplante, mediante tinciones de hematoxilina-eosina (H-E).
- Analizar todos estos parámetros a 24 y 48 horas.
- Comparar la proliferación celular y la viabilidad metabólica en las dos presentaciones de la membrana biológica: fenestrada y mallada.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Descongelamiento y mantenimiento de fibroblastos criopreservados

Del contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) se sacaron tres viales, que correspondían a 3 líneas de fibroblastos gingivales humanos distintas a un millón de células/ml en solución criopreservadora (95% de SFB [suero fetal bovino] y 5% de DMSO [dimetil sulfóxido]) y se descongelaron en un baño a 37°C, posterior a su descongelamiento se vertió el contenido de cada vial en tubos cónicos de 15 ml, a los cuales se les agregaron 5 ml de medio de cultivo D-MEM (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, por sus iniciales en inglés). Cada tubo cónico se centrifugó (1500 rpm por 5 minutos a 20°C) para retirar los excedentes de la solución criopreservadora y obtener un botón celular. Posteriormente se decanta la solución y se agregan 10 ml de D-MEM al tubo cónico resuspendiéndose las células, enseguida la suspensión celular se siembra en una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> donde se mantendrán y crecerán los fibroblastos. Las células se alimentaron dos veces por semana con D-MEM suplementado con 10% SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina 10 000 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml y anfotericina B 25µg/ml).

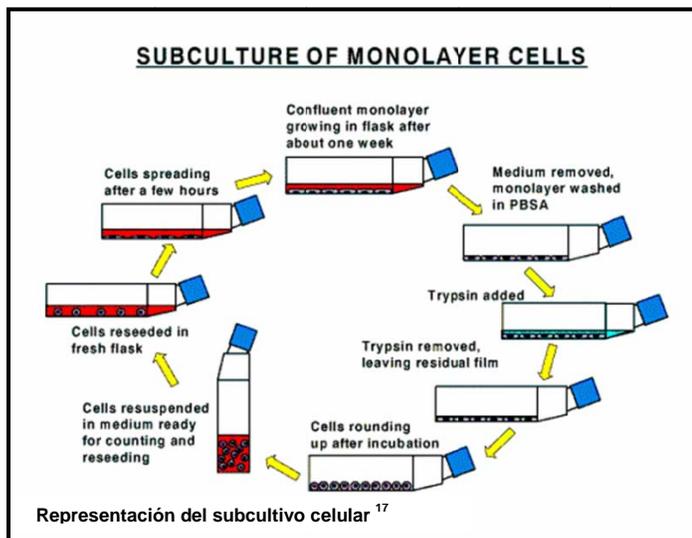
Cuando las células alcanzaron la confluencia, se subcultivaron por tripsinización.



- a) Microfotografía a 100 X de un cultivo de fibroblastos gingivales en semiconfluencia. (Fuente directa)  
b) Microfotografía a 100 X de un cultivo de fibroblastos gingivales en confluencia. (Fuente Directa)

Se decantó el medio de cada botella T-75 en un vaso de precipitados y enseguida se agregaron 5 ml de verseno (PBS [solución amortiguadora de fosfatos]-EDTA [ácido-etilen-diamino-tetraacético]) y se enjuagó por un período de 2 minutos, esto se hizo para atrapar los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  y así debilitar la interacciones de la células por su actividad quelante, transcurrido este tiempo se decantó la solución. A continuación se agregaron 5 ml de una solución de tripsina (0.25%) en verseno, la cual por su acción proteolítica desprende a las células de la superficie de la botella, se siguió el mismo procedimiento que con el verseno.

Posterior a esto se dan golpes secos con la palma de la mano en los bordes de la botella T-75 para desprender las células, enseguida se toman 10 ml de D-MEM y se enjuaga toda la superficie de la botella para levantar y resuspender las células. De los 10 ml de la suspensión se derivaron dos cultivos celulares, sembrándose 5 ml de la suspensión en una botella T-75 para obtener células que se criopreservaron cuando alcanzaron la



confluencia. De los 5 ml restantes sólo se sembraron 2ml en otra botella para mantener fibroblastos que se utilizaran en los experimentos posteriores. Las células se evaluaron al microscopio y se les cambió el medio de cultivo 2 veces por

semana. Se mantuvieron en condiciones de cultivo en una incubadora ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y 95% de aire)<sup>18</sup>.



Es importante señalar que este procedimiento se realizó con las 3 líneas celulares (F-ULA, T. Bejarano, Lucía) de 3 a 4 pases (subcultivos) antes que se sembraran los experimentos.

### Método para criopreservación de fibroblastos

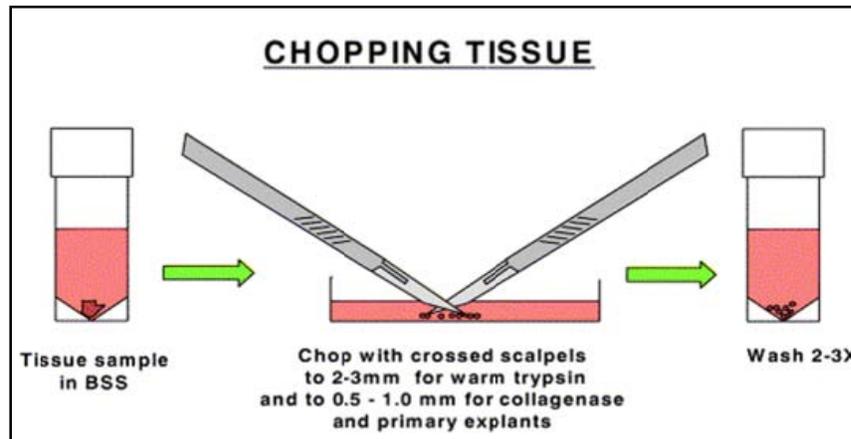
Cuando se llega a la confluencia, los fibroblastos se desprenden por tripsinización y el contenido de la botella se vierte en un tubo cónico de 15ml se tomó una alícuota para contarlas en un hemocitómetro, el resto se centrifugó (1200 rpm por 5 minutos a 20°C) para obtener el botón celular. Se resuspendieron en un volumen adecuado de medio para criopreservación (5% de DMSO y 95% de SFB), para obtener una densidad de un millón de células por mililitro, repartidos por cada vial necesario. Los viales resultantes se introdujeron al contenedor de nitrógeno líquido para su criopreservación.<sup>18</sup>

### Obtención de fibroblastos gingivales humanos por método enzimático rápido

Bajo anestesia local se tomó una biopsia excisional de 3mm de diámetro a 1.5mm de profundidad de la zona de retromolar de un sujeto donador voluntario.

El tejido gingival obtenido en condiciones de asepsia se transportó en un tubo estéril de 50 ml con medio de cultivo (D-MEM 5ml) y una mezcla de antibióticos y antimicótico.

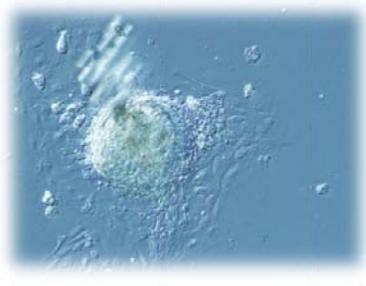
Ya en el laboratorio, en una campana de flujo laminar se colocaron 4 cajas de petri P-60, en cada una de ellas se vertieron 3 ml de D-MEM para enjuagar la biopsia y así retirar los residuos de sangre y diluir al mínimo la posible carga bacteriana que pudiera existir; en la 4ª caja el tejido gingival se fragmentó con bisturí hoja No. 22 en porciones de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>.



Representación de fragmentación del tejido gingival <sup>17</sup>

A continuación se tomó el contenido de esta última caja con una pipeta de 25 ml y se vació en un tubo cónico de 15ml para centrifugar (1500 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente).<sup>18</sup>

Transcurrido este tiempo se decantó la muestra y se agregaron 5ml de solución de colagenasa IV al 0.25 %. Se llevó el tubo cónico para incubarse en un baño a una temperatura de 37°C por 2 horas, cada 15 minutos se agitó la muestra en un agitador mecánico, para acelerar la disgregación del tejido. Al finalizar este tiempo, se centrifugó en las condiciones ya mencionadas. El botón celular obtenido se resuspendió en 4 ml de D-MEM suplementado con 10% SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico para sembrarse en una botella de cultivo T-25 y se incubó en condiciones estándares <sup>18</sup>.



Microfotografía a 100 X del cultivo derivado a partir de la biopsia gingival, después de 4 días de procesada. (Fuente directa)



---

## PRUEBAS PAR DETERMINAR PROLIFERACIÓN CELULAR Y VIABILIDAD METABÓLICA

### Ensayo de MTT

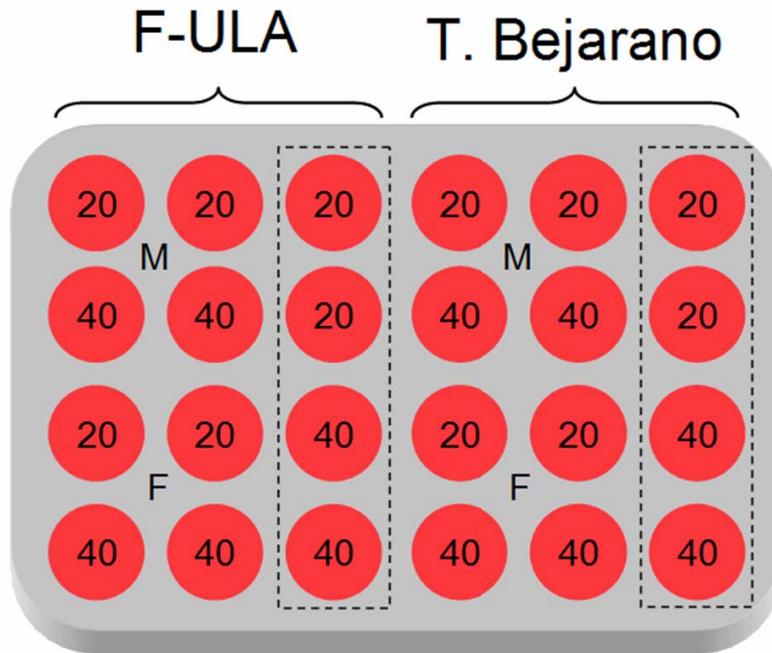
Este método ha sido utilizado para medir supervivencia, proliferación celular y citotoxicidad.

El ensayo está basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto insoluble de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

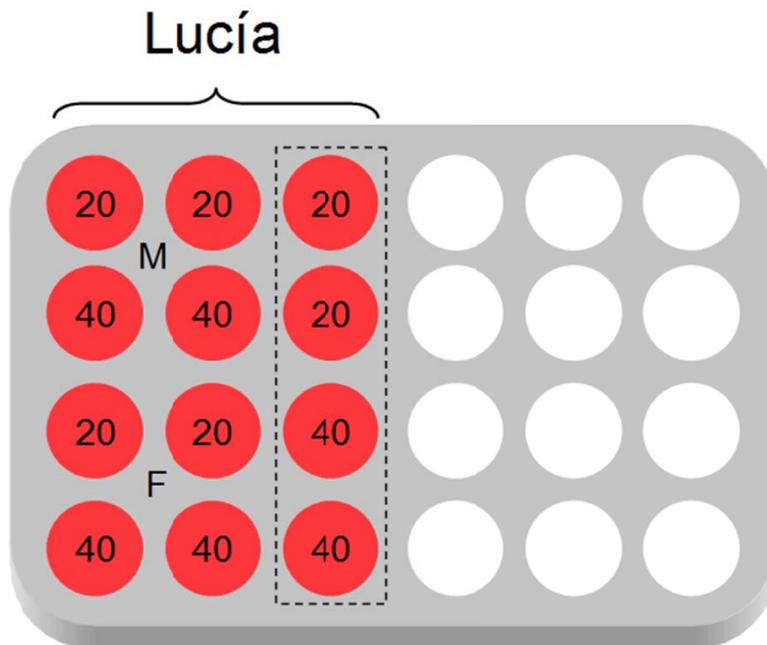
La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Los resultados son cuantificados a partir de los valores de la absorbencia en densidades ópticas (DO) en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 570nm, ya que es la longitud en la que se tiene el pico máximo de absorción del formazán producido; este método muestra un alto grado de precisión <sup>19 20 21</sup>.

Cada una de las líneas celulares se sembraron en placas de 24 pozos, utilizándose 12 pozos de cada placa para cada una de las líneas, y las condiciones a evaluar fueron las siguientes: Densidad Celular (10 y 20 mil células/cm<sup>2</sup>), tipo de membrana (mallada y fenestrada) y los controles sembrados sobre el plástico del pozo. Todas estas condiciones se evaluaron por duplicado y en los períodos de 24 y 48 horas.

La disposición en las placas fue la siguiente:



Fuente directa



Fuente directa

En estas condiciones se dejaron las placas en una incubadora en condiciones estándares por los períodos de 24 y 48 horas.

Transcurrido el período de incubación, se retiró el medio de cada uno de los pozos y se agregaron 100 $\mu$ l de MTT estéril a cada pozo en una concentración de 5mg/ml. Habiendo terminado de agregar el MTT se regresó la placa a la incubadora por un lapso de 4 horas.

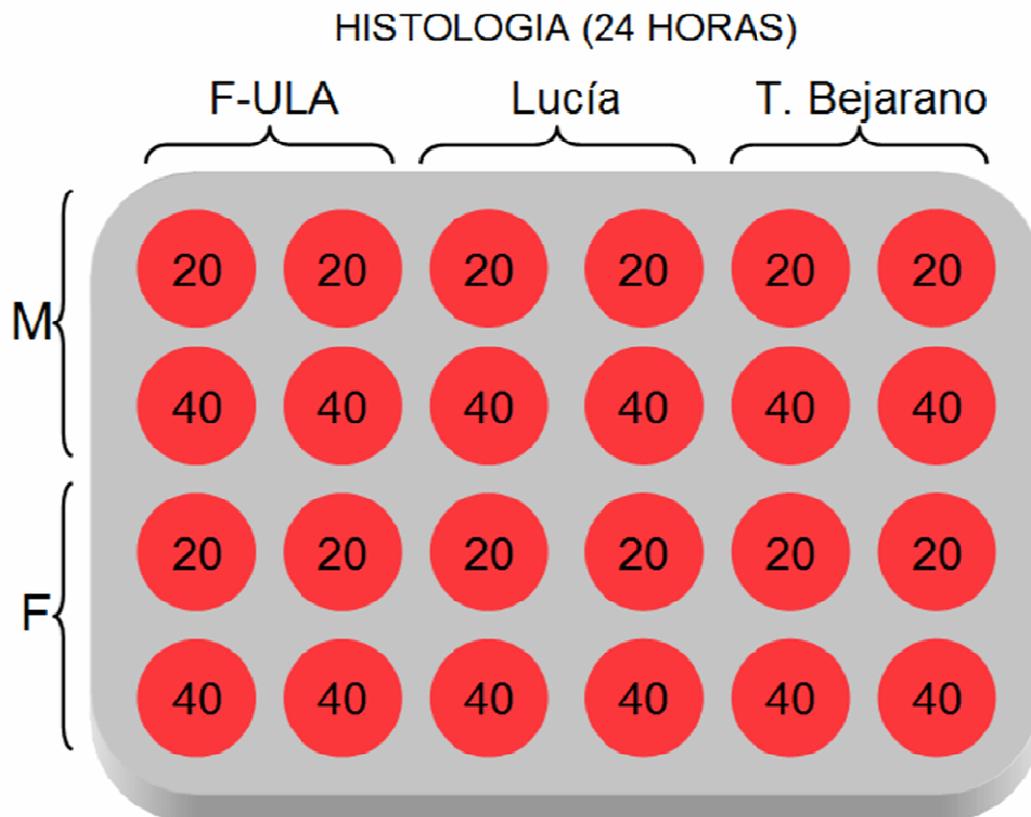


Imagen que representa la forma en que se agregó la solución de MTT a los cultivos celulares.  
Fuente directa

Después de este tiempo se sacaron las placas de la incubadora y cada pozo se enjuagó dos veces con 500  $\mu$ l de PBS. Posteriormente se añadieron 500  $\mu$ l de DMSO, esto con el fin de solubilizar el precipitado azul de formazán generado por la actividad mitocondrial. Esta mezcla se agitó vigorosamente hasta su disolución completa por un período de 40 minutos. Al término de este tiempo se valoró espectrofotométricamente, la cantidad de formazán producido en cada uno de los pozos.

## CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL BIOIMPLANTE

Se analizaron tres condiciones: tipo de membrana (mallada y fenestrada), densidad celular (10 000 y 20 000 células/cm<sup>2</sup>) y tiempo (24 y 48 horas). La disposición fue la siguiente:



Fuente directa



## 6.1 Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental para comparar los niveles de proliferación celular, viabilidad metabólica e integración de fibroblastos gingivales en un modelo *in vitro* de un bioimplante.

## 6.2 Variables de estudio

Variables independientes:

- Tiempo: 24 y 48 horas
- Densidad Celular: Dos densidades celulares (10 000 y 20 000 células/cm<sup>2</sup>).
- Tipo de membrana: Membrana de submucosa intestinal de cerdo (mallada y fenestrada).

Variables dependientes:

- Proliferación celular.
- Viabilidad metabólica.
- Características histológicas.



## 7. RECURSOS

### 7.1 Humanos

Un tesista, un tutor y un asesor

### 7.2 Materiales

- Agitador automático
- Balanza Analítica
- Baño con agitación y control de temperatura
- Botellas de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup>
- Cajas de Petri P-60 (6cm Ø) estériles
- Campana de Flujo laminar
- Centrifuga con refrigeración
- Contador manual de células
- Criopreservador de nitrógeno líquido
- Criotubos
- DMSO [dimetil sulfóxido, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO] al 100%
- Espectrofotómetro
- Filtros de perinola millipore estériles de 0.20µm Ø de poro
- Hemocitómetro
- Incubadora húmeda y ambiente de CO<sub>2</sub>
- Jeringas estériles de 10ml
- Mango y hojas de bisturí No. 22
- Medio de cultivo (D-MEM suplementado con 10% SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico)
- Membrana fenestrada (OASIS<sup>MR</sup>)
- Membrana mallada (OASIS<sup>MR</sup>)
- Micropipetas
- Microscopio óptico de contraste de fases Olympus
- Microscopio invertido con contraste de fases, óptica de relieve y cámara digital Olympus



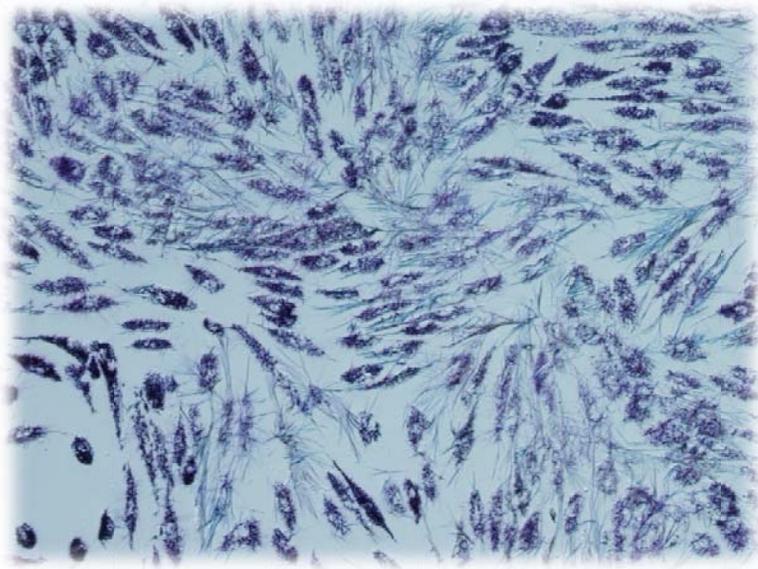
- Pipetas estériles de 1, 5, 10 y 25ml
- Placas de cultivo de 24 pozos
- Propipeta automática
- Solución de colagenasa IV al 0.25%
- Solución criopreservadora (95% de SFB y 5 % de DMSO)
- Solución estéril de MTT (5mg/5ml de PBS)
- Solución de paraformaldehído al 4%
- Solución de tripsina 0.4% en verseno
- Solución de verseno (EDTA+PBS)
- Tres líneas celulares de fibroblastos gingivales humanos
- Tubos estériles cónicos de 15 y 50ml
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100ml

### 7.3 Financieros

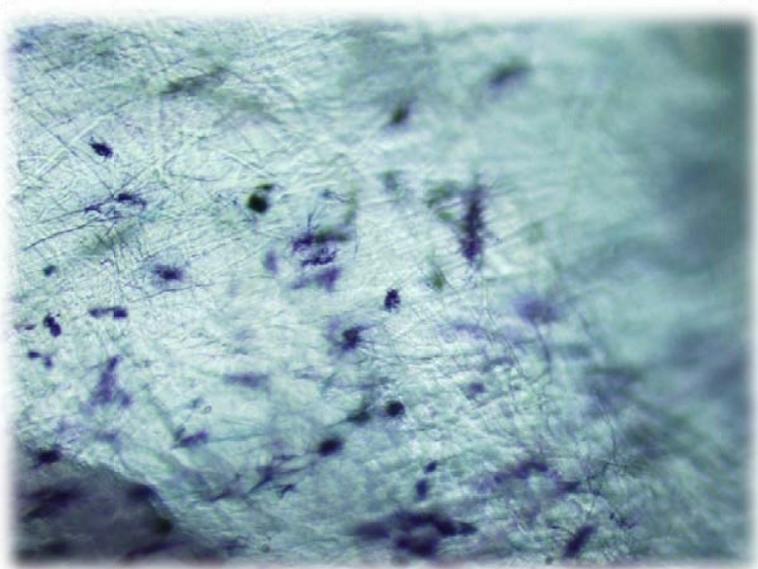
Todos los recursos materiales y de infraestructura se obtuvieron del Laboratorio de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de la División de Investigación Biomédica del CMN “20 de Noviembre” del ISSSTE a cargo del Dr. Saúl Cano Colín.

## 8. RESULTADOS

### Ensayo de MTT



Fotomicrografía a 100 X de las células sembradas sobre plástico, después de metabolizar el MTT a formazán (24 hrs).  
Fuente directa



Fotomicrografía a 100 X de las células cultivadas sobre la membrana  
mallada a las 24 horas en una densidad celular de 20mil cel/cm<sup>2</sup>.  
Fuente directa

Evaluación de la proliferación celular y viabilidad metabólica de 3 líneas de fibroblastos gingivales sembrados en dos tipos de membranas en distintas densidades celulares en dos periodos de tiempo.

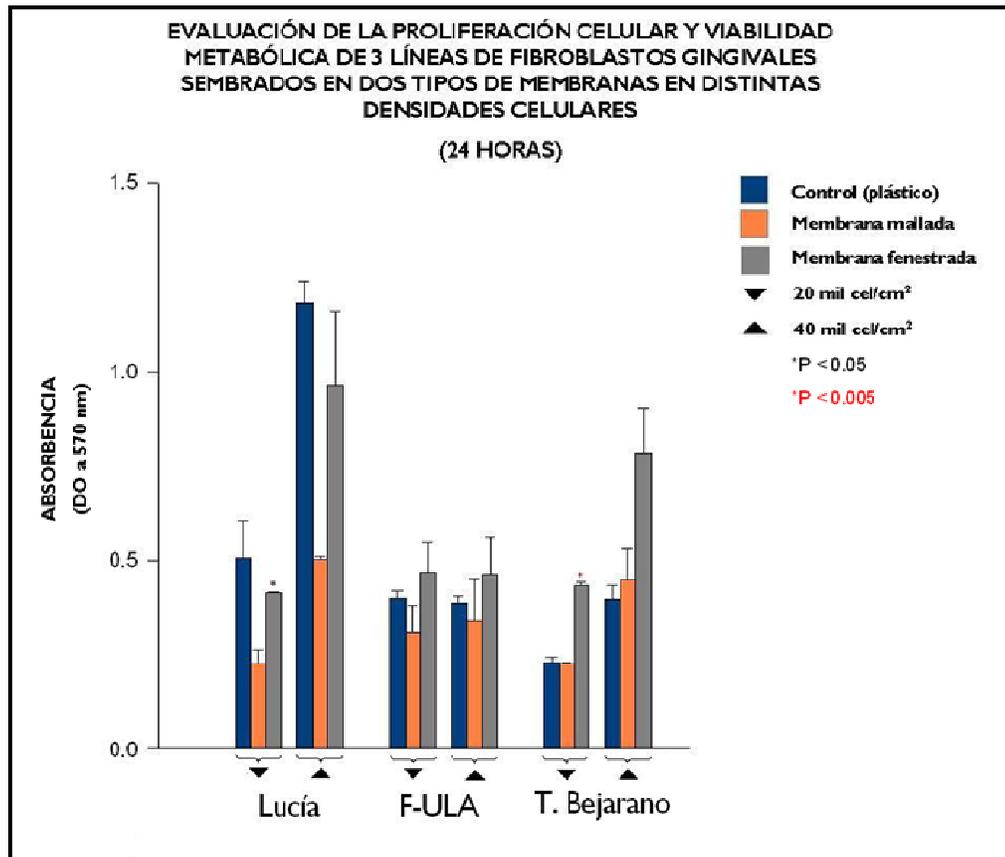


Figura 1 Fuente directa

Como se observa en la figura 1 y 2, no se ve afectada la viabilidad metabólica de las tres líneas celulares en ninguna de las condiciones evaluadas (tipo de membrana, densidad celular y tiempo); además de esto, en la figura 1, existen dos líneas celulares (Lucía, en la condición de 20 mil cel/cm<sup>2</sup> P<0.05 y T. Bejarano, en la misma condición [P< 0.005]) que presentan una diferencia estadísticamente significativa, cuando se aplicó la prueba de T de student, respecto al tipo de membrana utilizada. Asimismo, en la figura 2, se observa también una diferencia estadísticamente

significativa ( $P < 0.01$ ) en la línea T. Bejarano, evaluado en la condición de 20 mil cel/cm<sup>2</sup>.

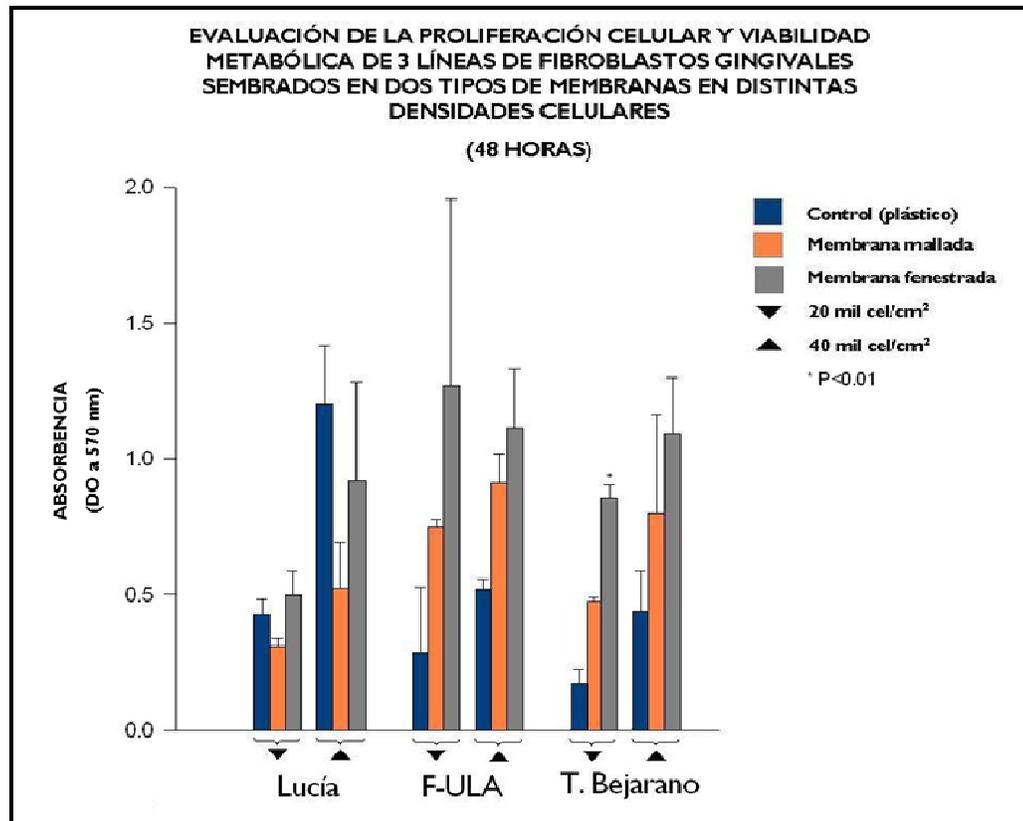


Figura 2 Fuente directa

Respecto a la proliferación celular, la figura 1 muestra que, de las tres líneas evaluadas sólo T. Bejarano, en las dos densidades celulares (20 y 40 mil cel/cm<sup>2</sup>) proliferó aún después de las 24 horas transcurridas; por otro lado, la figura 2 muestra que de las tres líneas celulares evaluadas, sólo dos de ellas (F-ULA y T. Bejarano) proliferaron a las 48 horas. Como se puede observar en los resultados cuantitativos presentados en la Tabla 1.



Tabla 1. Cuantificación espectrofotométrica de la absorbencia del formazán en dos períodos de tiempo en distintas densidades celulares.

Linea Celular	Sustrato	24 horas		48 horas	
		20 mil cel/cm <sup>2</sup> (DO)	40 mil cel/cm <sup>2</sup> (DO)	20 mil cel/cm <sup>2</sup> (DO)	40 mil cel/cm <sup>2</sup> (DO)
Lucia	<b>Control (plástico)</b>	<b>0.505 ±0.100</b>	<b>1.183 ±0.058</b>	<b>0.429 ±0.055</b>	<b>1.204 ±0.214</b>
	<b>Membrana Mallada</b>	<b>0.228 ±0.038</b>	<b>0.502 ±0.009</b>	<b>0.308 ±0.030</b>	<b>0.524 ±0.167</b>
	<b>Membrana Fenestrada</b>	<b>0.415 ±0.001</b>	<b>0.962 ±0.198</b>	<b>0.497 ±0.090</b>	<b>0.917 ±0.368</b>
F-ULA	<b>Control (plástico)</b>	<b>0.401 ±0.017</b>	<b>0.385 ±0.019</b>	<b>0.286 ±0.239</b>	<b>0.519 ±0.038</b>
	<b>Membrana Mallada</b>	<b>0.309 ±0.070</b>	<b>0.343 ±0.108</b>	<b>0.748 ±0.030</b>	<b>0.910 ±0.108</b>
	<b>Membrana Fenestrada</b>	<b>0.489 ±0.077</b>	<b>0.485 ±0.099</b>	<b>1.288 ±0.888</b>	<b>1.115 ±0.217</b>
T. Bejarano	<b>Control (plástico)</b>	<b>0.231 ±0.012</b>	<b>0.398 ±0.035</b>	<b>0.173 ±0.053</b>	<b>0.439 ±0.147</b>
	<b>Membrana Mallada</b>	<b>0.228 ±0.002</b>	<b>0.450 ±0.080</b>	<b>0.477 ±0.012</b>	<b>0.801 ±0.381</b>
	<b>Membrana Fenestrada</b>	<b>0.432 ±0.009</b>	<b>0.784 ±0.121</b>	<b>0.854 ±0.050</b>	<b>1.094 ±0.203</b>

Tabla 1 Fuente directa

Evaluación de la Proliferación y Viabilidad Metabólica de tres líneas de fibroblastos gingivales sembrados en dos tipos de membranas en distintos periodos de tiempo.

Como se muestra en la figura 3, no se ve alterada la viabilidad metabólica de las tres líneas celulares en ninguna de las condiciones estudiadas, y existen diferencias estadísticamente significativas en dos líneas (F-ULA [ $P < 0.01$ ], en las dos densidades celulares evaluadas y en T. Bejarano [ $P < 0.001$ ] en la densidad celular de 20 mil cel/cm<sup>2</sup>).

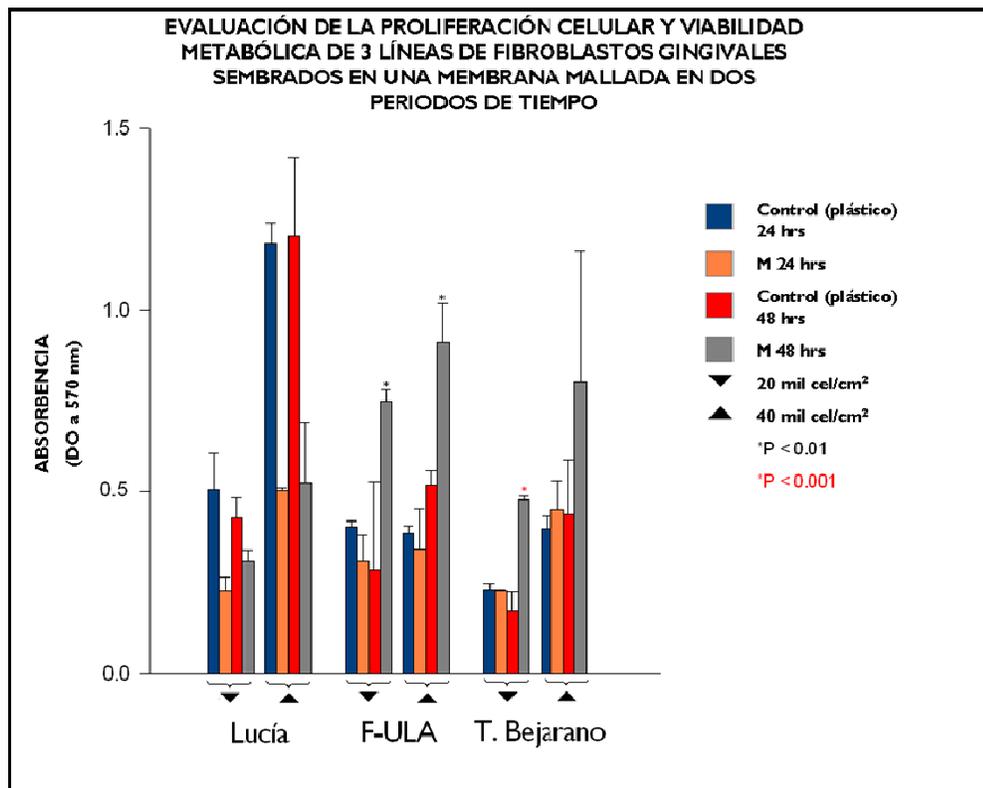


Figura 3 Fuente directa

En las líneas F-ULA y T. Bejarano, observamos que hubo proliferación celular a las 48 horas, como se puede notar en los datos cuantitativos presentados en la Tabla 2.

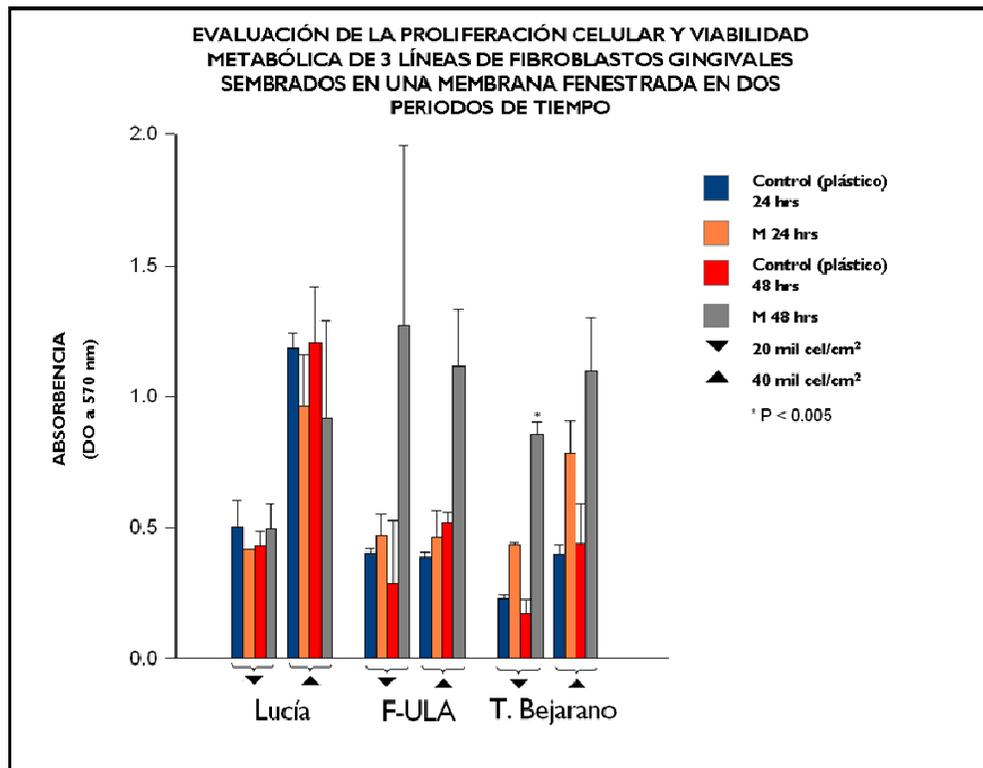


Figura 4 Fuente directa

En la figura 4 se hace evidente que no se vio afectada la viabilidad metabólica de las tres líneas celulares, en ninguna de las condiciones probadas; además existen diferencias estadísticamente significativas en T. Bejarano ( $P < 0.005$ ) en la condición celular de 20 mil cel/cm<sup>2</sup>.

Respecto a la proliferación celular dos de las tres líneas (F-ULA y T. Bejarano) muestran que continuaron proliferando, esto se observa mejor a las 48 horas transcurridas (Tabla 2).



Tabla 2. Cuantificación espectrofotométrica de la absorbencia del formazán en dos tipos de membrana en distintos períodos de tiempo y a dos densidades celulares.

Línea Celular	Densidad Celular	Control (plástico)		M. Mallada		M. Fenestrada	
		24 hrs (DO)	48 hrs (DO)	24 hrs (DO)	48 hrs (DO)	24 hrs (DO)	48 hrs (DO)
Lucía	20 mil cel/cm <sup>2</sup>	0.505 ±0.100	0.429 ±0.055	0.228 ±0.036	0.308 ±0.030	0.415 ±0.014	0.497 ±0.090
	40 mil cel/cm <sup>2</sup>	1.183 ±0.056	1.204 ±0.214	0.502 ±0.009	0.524 ±0.167	0.962 ±0.198	0.917 ±0.368
F-ULA	20 mil cel/cm <sup>2</sup>	0.401 ±0.017	0.286 ±0.239	0.309 ±0.070	0.748 ±0.030	0.469 ±0.077	1.268 ±0.688
	40 mil cel/cm <sup>2</sup>	0.385 ±0.019	0.519 ±0.038	0.343 ±0.108	0.910 ±0.108	0.465 ±0.099	1.115 ±0.217
T. Bejarano	20 mil cel/cm <sup>2</sup>	0.231 ±0.012	0.173 ±0.053	0.228 ±0.002	0.477 ±0.012	0.432 ±0.091	0.854 ±0.050
	40 mil cel/cm <sup>2</sup>	0.398 ±0.035	0.439 ±0.147	0.450 ±0.080	0.801 ±0.361	0.784 ±0.121	1.094 ±0.203

Tabla 2 Fuente directa

Evaluación de la Proliferación y Viabilidad Metabólica de tres líneas de fibroblastos gingivales sembrados en dos tipos de membranas en distintas densidades celulares en dos periodos de tiempo.

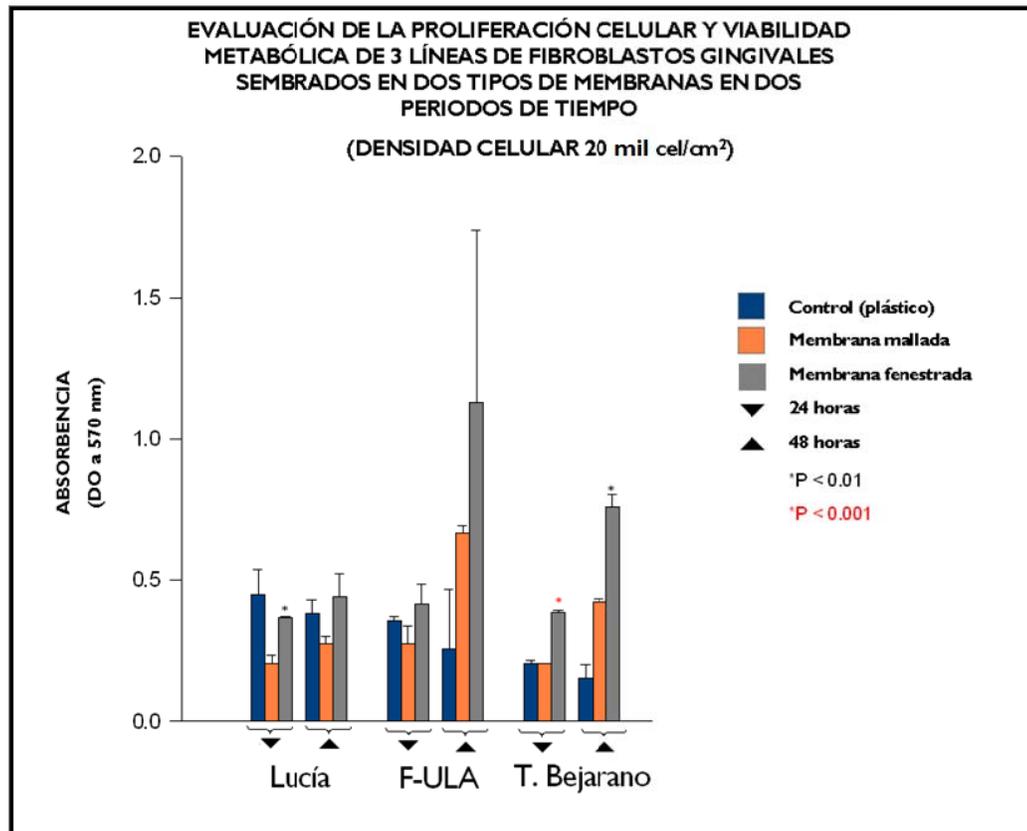


Figura 5 Fuente directa

En la figura 5 no se ve afectada la viabilidad metabólica de ninguna de las tres líneas celulares y como podemos observar en dos de las tres líneas (Lucía [P<0.01 y T. Bejarano [P<0.001]) hubo actividad proliferativa, siendo más notorio a las 48 horas en F-ULA y T. Bejarano.

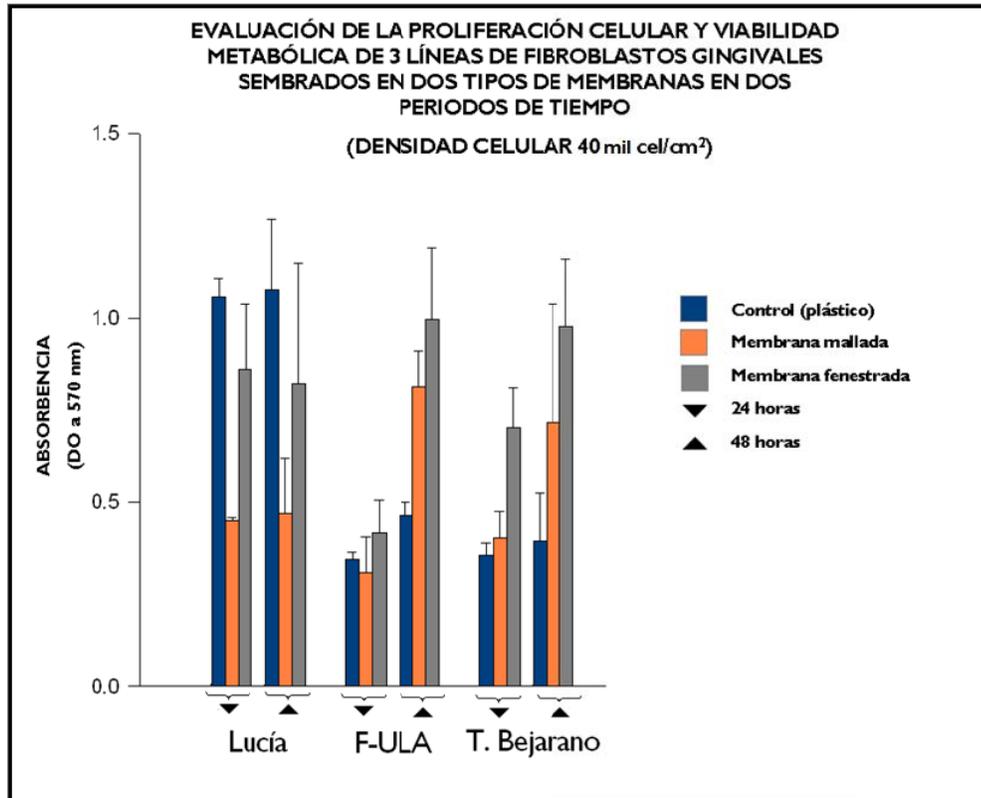


Figura 6 Fuente directa

Por otra parte en la figura 6 la viabilidad metabólica no es afectada en ninguna de las tres líneas celulares.

En la proliferación celular sólo dos líneas (F-ULA y T. Bejarano) proliferaron a las 48 horas respecto a sus controles, mostrando mayor actividad proliferativa en la membrana fenestrada (Tabla 3).



Tabla 3. Cuantificación espectrofotométrica de la absorbencia del formazán en dos densidades celulares en dos tipos de membrana y en dos períodos de tiempo.

Línea Celular	Sustrato	20 mil cel/cm <sup>2</sup>		40 mil cel/cm <sup>2</sup>	
		24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
Lucía	Control (plástico)	0.505 ±0.100	0.429 ±0.055	1.183 ±0.056	1.204 ±0.214
	Membrana Mallada	0.228 ±0.038	0.308 ±0.030	0.502 ±0.008	0.524 ±0.167
	Membrana Fenestrada	0.415 ±0.001	0.487 ±0.090	0.862 ±0.188	0.917 ±0.368
F-ULA	Control (plástico)	0.401 ±0.017	0.288 ±0.239	0.385 ±0.019	0.519 ±0.038
	Membrana Mallada	0.308 ±0.070	0.748 ±0.030	0.343 ±0.108	0.910 ±0.108
	Membrana Fenestrada	0.409 ±0.077	1.266 ±0.688	0.485 ±0.098	1.115 ±0.217
T. Bejarano	Control (plástico)	0.231 ±0.012	0.173 ±0.053	0.398 ±0.035	0.439 ±0.147
	Membrana Mallada	0.228 ±0.002	0.477 ±0.012	0.450 ±0.080	0.801 ±0.361
	Membrana Fenestrada	0.432 ±0.009	0.854 ±0.050	0.784 ±0.121	1.094 ±0.203

Tabla 3 Fuente directa

## Caracterización histológica del bioimplante

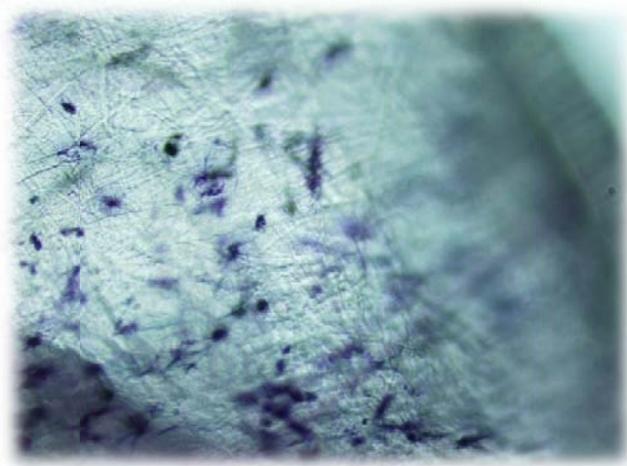


Fig. 7. Fotomicrografía a 100 X  
Fuente directa

La figura 7 nos muestra un bioimplante a las 24 horas después de haberse sembrado los fibroblastos y 4 horas posteriores a la metabolización del MTT, donde se puede observar su integración en distintos planos.

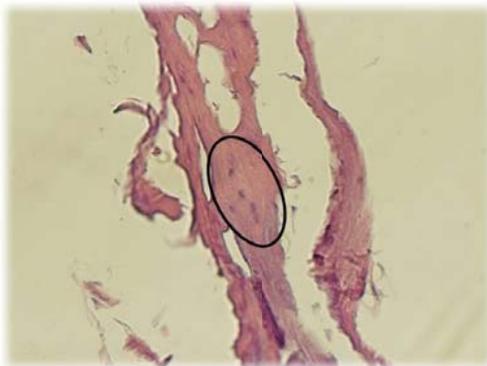


Fig. 8. Fotomicrografía a 320 X de la  
membrana, teñida con H-E.  
Fuente directa



Fig. 9. Fotomicrografía a 320 X de la  
membrana, teñida con H-E.  
Fuente directa



Fig. 10. Fotomicrografía a 320 X de la membrana mallada a las 24 horas de cultivo, teñida con H-E.  
Fuente directa

Las figuras 8 y 9 muestran un corte histológico de la membrana de submucosa intestinal de cerdo, en donde se observan núcleos propios de la membrana; sin embargo, no se puede observar la presencia de células delimitadas por la propia manufactura de este material que se comercializa como una membrana biológica acelular; comparándola con las figuras 10, 11 y 12 que muestran cortes histológicos de dicha membrana en donde si se observan células bien delimitadas, que corresponden a los fibroblastos gingivales sembrados. (Zonas dentro de los círculos)



Fig. 11. Fotomicrografía a 320 X de la membrana mallada a las 24 horas de cultivo, teñida con H-E. Fuente directa

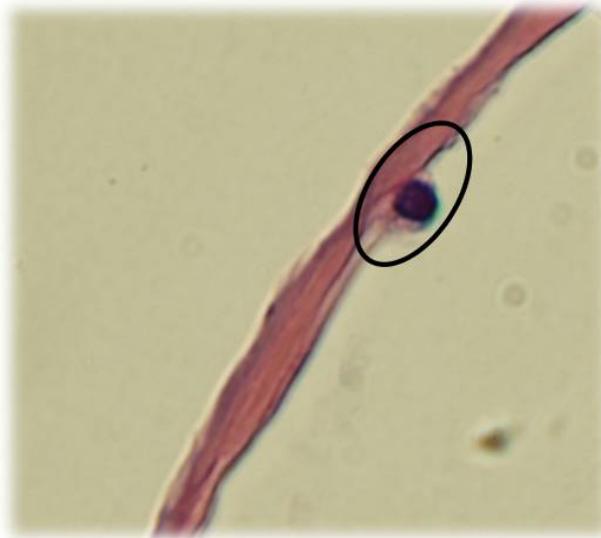


Fig. 12. Fotomicrografía a 320 X de la membrana mallada a las 24 horas de cultivo, teñida con H-E. Fuente directa



## 9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que en ninguna de las condiciones evaluadas se ve afectada la viabilidad metabólica de las líneas celulares cultivadas en la membrana, ya que si las células son capaces de metabolizar el MTT en formazán por su actividad mitocondrial esto es evidencia de que las células están vivas y por lo tanto la membrana no produce citotoxicidad.

Sin embargo, al analizar los niveles de proliferación celular y viabilidad metabólica en los tres cultivos celulares, se observó que la respuesta celular puede variar biológicamente, al igual que los procesos fisiológicos en humanos, considerando que los cultivos celulares son de tres individuos diferentes. Así mismo, es importante señalar que pese a las diferencias previamente citadas, los objetivos de este estudio no se vieron alterados ya que la viabilidad celular tanto en los controles y en las dos tipos de membranas empleadas, no se vio alterada. Además, los resultados obtenidos bajo la condición de 20 000 células/cm<sup>2</sup> a 48 horas mostraron una marcada proliferación celular en comparación a las otras condiciones evaluadas, sobre todo aquellos obtenidos en la membrana fenestrada.

En términos del área total de la membrana utilizada, observamos que cuando se cubrió el área del fondo del pozo con la membrana, los niveles de proliferación de las líneas fueron mayores que los controles crecidas sobre plástico. Por lo mismo, cuando se cultivaron sobre un área menor no se observó este incremento, lo cual podría implicar que las características bioquímicas de la membrana influyen en la actividad proliferativa de las células, puesto que está compuesta por una gran cantidad de moléculas señalizadoras, tanto de matriz extracelular como de factores de crecimiento.



Además, en este trabajo hemos demostrado que las células cultivadas sobre la membrana de submucosa intestinal de cerdo se integran a ella en distintos planos, lo que nos indica que hay una interacción dinámica de las células con dicha membrana; como se puede evidenciar en las fotomicrografías presentadas.

Por consiguiente, debido a los resultados obtenidos podemos proponer que es posible estandarizar la preparación de un bioimplante de fibroblastos gingivales cultivados en la membrana fenestrada, durante 48 horas a una densidad celular de 20 000 células/ cm<sup>2</sup>, por ser las condiciones donde se observó mayor proliferación celular.

Con este conocimiento, probablemente se mejorarán los resultados al aplicarse este bioimplante, en comparación a los obtenidos anteriormente.



---

## 10. CONCLUSIONES

- La membrana de submucosa intestinal de cerdo confiere las condiciones metabólicas óptimas de crecimiento de las células, sin afectar su viabilidad metabólica.
- El área total de la membrana de submucosa intestinal de cerdo, sobre la cual se siembran las células, influye directamente en la proliferación celular.
- Las células sembradas sobre la membrana de submucosa intestinal de cerdo se integran a esta desde las 24 horas de cultivo.
- Las condiciones óptimas para el cultivo de células en la membrana de submucosa intestinal de cerdo es de 20 000 células/cm<sup>2</sup> a 48 horas en la membrana fenestrada, ya que se obtuvieron resultados de mayor proliferación celular.



---

## 11. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Lynch S, Marx R, Nevins M; Tissue engineering: Applications in Oral and Maxillofacial and Periodontics. 2<sup>a</sup> ed. Quintessence Books; 2008, p.p110-120
2. [http://europa.eu.int/comm/enterprise/library/enterpriseeurope/issue11/articles/es/enterprise21\\_es.htm](http://europa.eu.int/comm/enterprise/library/enterpriseeurope/issue11/articles/es/enterprise21_es.htm)
3. Baum B, Mooney D. The Impact of Tissue Engineering on Dentistry. *J Am Dent Assoc* 2000;131;309-318
4. Vasita R, Katti D. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1(1):15-30
5. Van Dijk, Shakenraad J, Van der Voort H, Herkströter F, Busscher H. Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment. A pilot study. *J Clin Periodontology*, 1991;18:196-199
6. Lianjia Y, Yuhao G, White F. Bovine bone morphogenetic protein induced dentinogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;295:305-12
7. Pini Prato G, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report. *Int J Periodont Restorative Dent*. 2000;20:553-559
8. Dogan A, Özdemir A, Kubar A, Oygür T. Assessment of Periodontal Healing by Seeding of fibroblast-like-cells derived from regenerated



peridontal ligament in artificial furcation defects in a dog: A Pilot Study.  
Tissue engineering 2002;8(2):273-282

9. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, Veis A. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. Am J Dent. 2003 Feb;16(1):66-76
10. Hou L, Tsai A, Liu C, Feng A F. Autologous Transplantation of Gingival Fibroblast-Like Cells and Hidroxylapatite Complex Graft in the Treatment of Periodontal Osseous Defects: Cell Cultivation and Long term report of cases. Cell Transplantation 2003;12:787-797
11. Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E; In situ Tissue Engineering of Periodontal Tissues by seeding with Periodontal Ligament-Derived Cells. Tissue engineering. 2004; 10(3/4): 537-544
12. McGuire M. Scheyer T; A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study to Determine the Safety and Efficacy of Cultures and Expanded Autologous Fibroblast Injections for the Treatment of Interdental Papillary Insufficiency Associated With the Papilla Priming Procedure; J Periodontol 2007;78:4-17
13. Novaes Jr A., Marchesan J, Macedo G; Effect of In Vitro Gingival Fibroblast Seeding on the In Vivo Incorporation of Acellular Dermal Matrix Allografts in Dogs; J Periodontol 2007;78(2);296-303
14. Nakajima K, Abe T, Tanaka M, Hara Y. Periodontal tissue engineering by transplantation of multilayered sheets of phenotypically modified gingival fibroblasts. J Periodont Res 2008, Jun 25th, publication online before printing



15. Wong T, McGrath J.A, Navsaria H; The Role of fibroblast in Tissue Engineering and Regeneration: Conclusion; The British Journal of Dermatology; 2007;156(6):1149-1155.
16. Monteagudo C, Marín M, Enríquez F, Penilla I, Kröttsch E, Cano S. Caracterización clínica de injertos autólogos a partir de fibroblastos gingivales crecidos sobre una matriz biológica para el tratamiento de recesiones gingivales: Reporte de un caso clínico. Revista Odontológica Mexicana 2009;13 (2): 115-121
17. Freshney I. Culture of Animal Cells: A Multimedia Guide; Wiley-Liss; 4a ed; US 2000
18. Freshney I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique; Wiley-Liss; 4a ed; US 2000
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 1983;65: 55–63.
20. Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods 1986; 89: 271–277.
21. Penilla I, Marín M, Salgado RM, Kröttsch E, Cano S. Efectos de la mezcla de colágena-PVP, sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales. Revista Odontológica Mexicana 2008;12 (4): 184-191.



- 
22. Rhee, Friedman, Riedge JA, Kusiak J. The use of processed allograft dermal matrix for intraoral resurfacing. *Arch Otolaryngo Head Neck Surg.* 1998; 124:1201-1204
23. Demling RH, Niezgoda JA, Haraway GD “Small intestinal submucosa wound matrix and full-thickness venous ulcers: Preliminary Results.” *Wounds* 2004;16:18-22.
24. <http://www.cookbiotech.com/technology.php>
25. Martin P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75–81
26. Aukhill I. Biology of wound healing. *Periodontology* 2000; 22:44-50
27. Lekic P, McCulloch C. Periodontal Ligament Cell Populations: The Central Role of Fibroblasts in creating a unique tissue. *The anatomical record* 1996;245:327-341
28. Isaka J. Participation of periodontal Ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Clin Periodontol* 2001; 72: 314-323.