



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y METABÓLICA
DE UN BIOIMPLANTE MUCOGINGIVAL *IN VITRO*.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

PRESENTA:

ELIZABETH LÓPEZ HUITRÓN

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.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad. Albert Einstein.

Yo agregaría a la sabia frase de Albert Einstein: el amor, como único cometido en esta vida.

Mis padres: quienes me facilitaron las herramientas con las que he obtenido tantos logros a lo largo de esta vida y a la vez me permitieron conseguir las mías. Gracias por los buenos ratos, por apoyar mis sueños, por su amor, por las duras enseñanzas y por estar incondicionalmente a mi lado. Nos esperan muchos momentos más por compartir.

Mi hermana: gracias por reír, jugar y aprender juntas. Quiero que sepas el inmenso cariño que siento por ti y que cuentas conmigo hoy y siempre.

Alberto: llegaste a mi vida para cambiarla por completo. Eres un gran hombre. Gracias por tu amor, tu comprensión, pero sobre todo por permitirme crecer a tu lado. Te deseo éxito.

Mis maestros: Carlos Alberto Monteagudo Arrieta y Saúl Cano Colín. Gracias por confiar en mí, darme la genial oportunidad de trabajar a su lado. He aprendido mucho de ustedes no sólo en el ámbito académico sino también como seres humanos. Fue una excelente experiencia que enriqueció mi vida. Los mejores deseos para ustedes.

Todos nosotros tenemos un propósito en la vida... un don único o talento especial para ofrecer a los demás. Y cuando combinamos ese talento único con el servicio, experimentamos júbilo en nuestro espíritu, que es la última meta de todas. Yo estoy en búsqueda de ese don o talento único...

Gracias por la participación de la Dra. María Teresa Gorráez de la Mora. Jefa del Servicio de Anatomía Patológica del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE, la Dra. Martha Orozco Quiyono. División de Investigación Biomédica del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE y la Bióloga Nelly Raquel González Arenas.

ÍNDICE NUMERACION

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



1. INTRODUCCIÓN

Los defectos mucogingivales son producto de enfermedades periodontales, problemas anatómicos, del desarrollo y/o traumáticos; representan lesiones cuyo tratamiento es limitado, debido no solo a las características específicas de la mucosa oral sino también a causa de la insuficiente cantidad de tejido donante autólogo, obtenido generalmente del paladar, para el tratamiento de tales defectos.

Anteriormente, en respuesta a estas limitantes se reportó la necesidad de acudir a fuentes donantes extraorales, como la piel. Sin embargo, se observó que el uso de piel no tiene buenos resultados terapéuticos a causa de los problemas que implica injertar un tejido diferenciado sobre otro con características distintas. Varias investigaciones demostraron que la piel injertada en la cavidad oral conserva estructuras originales, así como su textura y apariencia, independientemente de los cambios que ocurren en el medio circundante, aún años después de ser injertada.

Las modalidades terapéuticas disponibles, comúnmente utilizadas, entre las que destacan; el injerto libre autólogo y el injerto de tejido conectivo subepitelial al presentar limitaciones e inconvenientes han justificado la exploración de nuevas alternativas de tratamiento.



La medicina regenerativa ha reportado importantes hallazgos representando un ámbito de estudio en constante desarrollo y crecimiento a nivel mundial. Esta disciplina médica, relativamente nueva es impulsada fundamentalmente por tres grandes ramas; terapia celular, inducción farmacológica e ingeniería de tejidos, ésta última se define como el campo multidisciplinario que integra tanto principios de biología, como de medicina e ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función de los tejidos; mejorando la forma en que se brinda atención médica a la población así como la calidad de vida de millones de personas a partir de optimizar la función de tejidos y órganos.

La ingeniería tisular integra tres componentes básicos que son: moléculas de señalización, células y matriz extracelular. Cada uno de estos elementos juega un rol primordial en el proceso de reparación y regeneración. Las células proveen la maquinaria para el crecimiento tisular, mientras que las moléculas de señalización modulan la actividad celular y proporcionan la estimulación necesaria para su diferenciación a la vez que inducen la producción de matriz extracelular la cual proporciona nutrición y soporte, permitiendo de esta forma un desarrollo tisular adecuado. (Figura 1)



Figura 1. Representación esquemática de los elementos en la regeneración tisular periodontal¹

En la actualidad pueden ser obtenidas, cultivadas y expandidas una amplia variedad de células autólogas en varios órdenes de magnitud *in vitro*. De hecho el cultivo de células epiteliales y dérmicas para elaborar cobertura de heridas ha sido estudiado desde hace varios años, lográndose obtener cultivos tridimensionales que semejan órganos tales como la piel. Asimismo, para producir bioimplantes de mucosa oral queratinizada se han empleado varias técnicas, desarrolladas a partir del cultivo celular *in vitro* de queratinocitos y fibroblastos. (Figura 2)

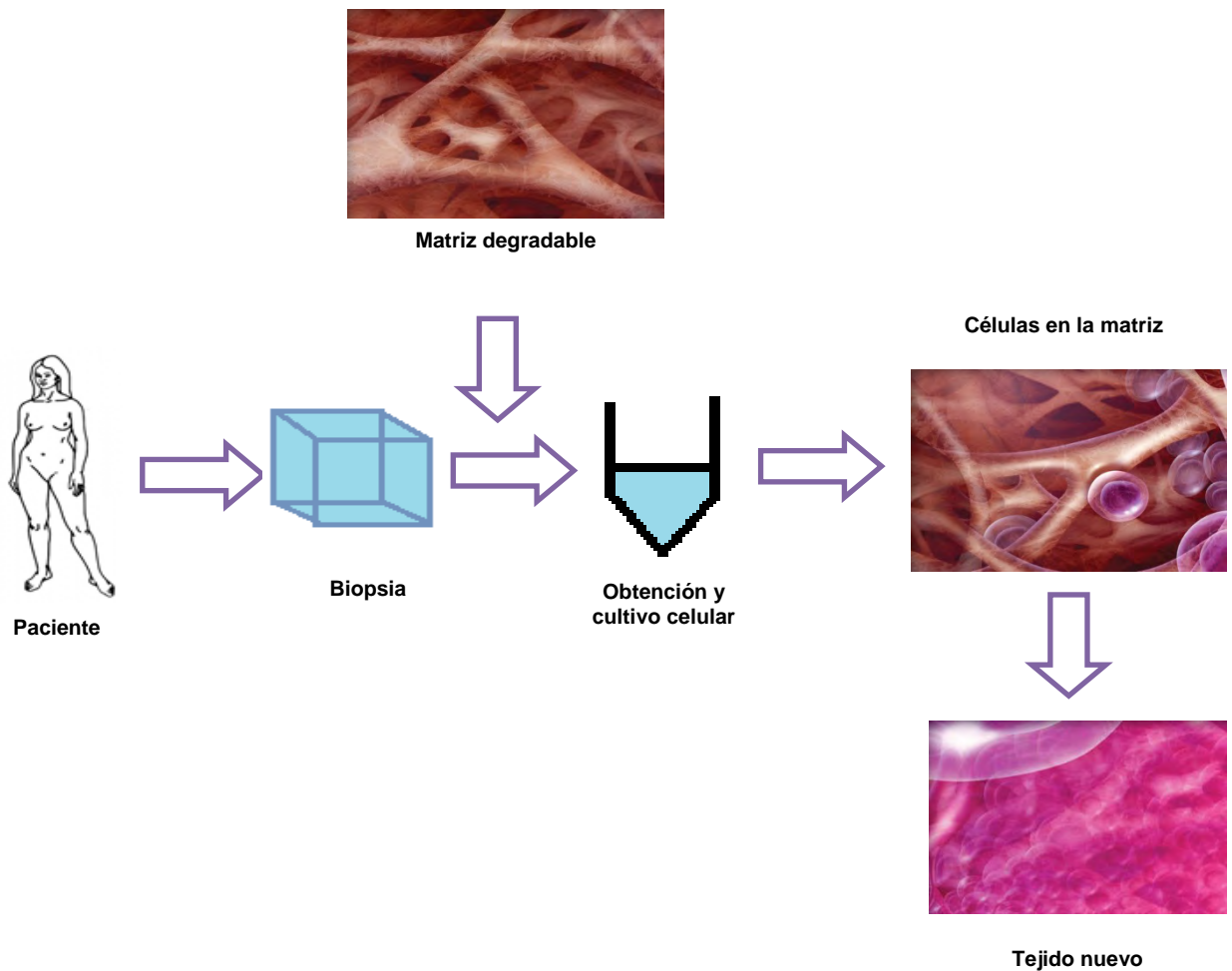


Figura 2. Avances en ingeniería tisular. Representación de células cultivadas sobre matriz biodegradable.^{2,3}

Hoy en día las técnicas de ingeniería tisular aplicadas en la terapia periodontal, alguna vez consideradas sólo como un área experimental de interés, se relacionan con la regeneración de hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal alcanzando con éxito tal propósito mediante el uso de una amplia gama de recursos, tales como; colocación de



membranas, sustitutos óseos e incorporación de moléculas de señalización, por mencionar algunos. (Figura 3)

Con respecto a la regeneración mucogingival se han empleado matrices biológicas reabsorbibles, solas o sembradas con células, para fabricar estructuras tridimensionales que sirvan como material de injerto.

La ingeniería tisular encaminada a la producción de sustitutos de mucosa oral se ha enfocado en la interacción celular, entre fibroblastos y queratinocitos. La secreción de moléculas de señalización por parte de los fibroblastos influencia de forma paracrina a los queratinocitos, permitiendo observar que estos últimos al encontrarse en monocultivo sin soporte representado por una matriz sufren apoptosis luego de dos semanas aproximadamente, con lo cual se concluye que los fibroblastos son parte fundamental para la producción de matriz extracelular y elaboración de factores de crecimiento que proveen el ambiente óptimo para generar mucosa oral *in vitro*.

Enfoques de Ingeniería tisular en Periodoncia		
Técnica	Ventajas	Complicaciones
Inyección de células	Fácil administración. Las células precursoras inyectadas pueden inducir la formación de matriz extracelular y vasos sanguíneos.	Baja supervivencia celular. Es posible que las células no se diferencien.
Tejidos cultivados	Fácil crecimiento en el laboratorio. Mayor estabilidad, en comparación con la inyección de células.	Tienden a ser de tamaño muy pequeño o sin sistema vascular. Muy frágiles .
Andamios porosos	Apoya la organización celular y promueve la vascularización.	Retraso entre la implantación y la vascularización.
Andamios inyectables	Sencilla administración. Puede mediar la regeneración proporcionando guías biomédicas .	Resultados anómalos .

Figura 3. Tabla. Enfoque de Ingeniería tisular en Periodoncia.⁴

Con el fin de aplicar la ingeniería tisular en periodoncia se ha desarrollado el uso de andamiajes como la membrana de submucosa intestinal de cerdo, para promover la reparación y regeneración de los tejidos periodontales. El SIS (Small intestinal submucosa por sus siglas en inglés) se obtiene del intestino del cerdo, dejando intacta la matriz compleja, sin rastro de componentes celulares y tiene como principal característica su composición. (Figura 4 y 5)

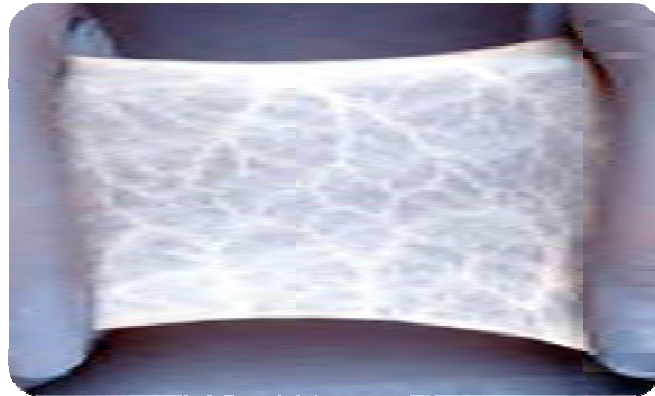


Figura 4. Aspecto clínico de SIS.⁴

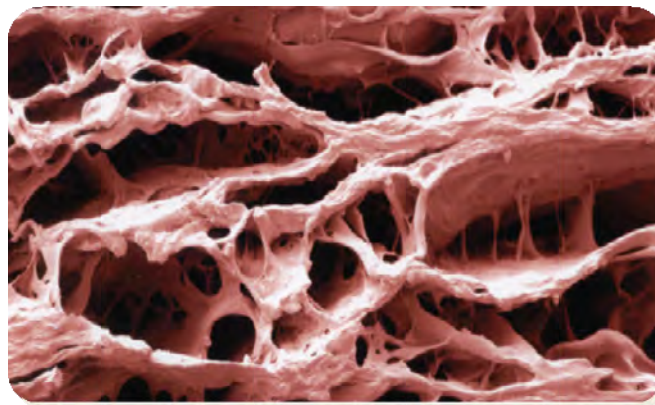


Figura 5. Aspecto microscópico de SIS.⁴



Analizada según sus características bioquímicas contiene colágena tipo I, III, IV y VI, glucosaminoglicanos (ácido hialurónico, condroitín sulfato A y B, heparina y heparán sulfato), proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina); asimismo factores de crecimiento los cuales generan un ambiente conductivo para la angiogénesis, desarrollo y diferenciación celular. (Figura 6)

Componentes	OASIS® SIS	Dermis Humana
Colágena		
Tipo I	X	X
Tipo III	X	X
Tipo IV	X	X
Tipo VI	X	X
Elastina	X	X
Glucosaminoglicanos		
Heparán	X	X
Ácido Hialurónico	X	X
Condroitín sulfato	X	X
Glicoproteínas		
Fibronectina	X	X
Laminina	X	X
Entactina		
Proteoglicanos		
Decorina	X	X
Proteoglicanos heparán sulfato (HSPG)	X	X

Figura 6. Componentes de SIS y dermis humana.⁴



Hoy por hoy, existen numerosas líneas de investigación enfocadas a la producción de equivalentes o sustitutos de mucosa oral y su aplicación en diversos defectos mucogingivales. En este trabajo se pretende generar un equivalente de mucosa oral queratinizada, el cual a partir del desarrollo de investigaciones futuras pueda ser aplicado como injerto autólogo cuando se busque tratar defectos mucogingivales, devolviendo estética y función.



2. ANTECEDENTES

Sustitutos basados en monocapas

En el proceso de elaboración de sustitutos de mucosa oral diversas aproximaciones han sido generadas, las cuales dependen en gran medida del estado de conocimiento, avance tecnológico y científico acerca de los procesos de reparación y cultivo celular.

Al describir Rheinwald y Green en 1975 un método de cultivo de queratinocitos, se abrió la posibilidad de generar láminas de estas células para ser usadas como cobertura de heridas. De esta forma, los primeros intentos de reemplazar tejido oral perdido con tejido artificial se basaron en el uso de láminas de queratinocitos como injertos^{5, 6}

En general, se utilizan dos métodos para la obtención de monocapas de queratinocitos de mucosa oral; el tejido disgregado con enzimas (dispasa, tripsina y/o colagenasa) y el tejido epitelial cortado en pedazos pequeños o explantes. Las fuentes de material para uno y otro procedimiento han sido tejido gingival de paladar duro y de otras regiones de la mucosa oral.^{5, 7, 8}

En la obtención de láminas de queratinocitos a partir de células disgregadas, la técnica más efectiva y conocida es la de Rheinwald y Green.⁶ En esta técnica, los queratinocitos se cultivan sobre una capa base de fibroblastos murinos 3T3, irradiados subletalmente para evitar su



proliferación. Sin embargo, versiones modificadas del método se han reportado, en donde las células son tratadas con mitomicina C o los fibroblastos 3T3 son reemplazados por fibroblastos humanos.⁹

Aunque algunas de las láminas epiteliales obtenidas, no exhiben signos de diferenciación terminal ciertos autores reportan queratinización. Las láminas epiteliales una vez formadas, son desprendidas de la superficie de la caja de cultivo y llevadas al lecho de la herida, donde se suturan e inmovilizan mediante una placa acrílica protectora para brindarles soporte y sostén.

Las aplicaciones clínicas de estas láminas han sido varias: cicatrización de heridas de paladar asociadas a palatoplastía convencional, vestibuloplastía, cobertura de defectos mucogingivales, reconstrucción de cavidad oral post-escisión de tumores y gingivoplastía asociada a terapia de implantes. Entre los inconvenientes de este tipo de injertos se encuentran su pobre resistencia al estrés mecánico, debido a la ausencia de tejido conectivo, y su fragilidad.

En las investigaciones desarrolladas por Izumi y colaboradores en 1999, se resalta la importancia del papel del tejido conectivo subyacente y del flujo sanguíneo en la restauración de la función mecánica, la adhesión y nutrición de la porción epidérmica.¹⁰ Por lo anterior, los esfuerzos se centran en el desarrollo de un análogo de mucosa oral constituido no sólo por



láminas de epitelio sino un bioplante en el que interactúe el componente epidérmico y dérmico, que asemeje la estructura de la mucosa oral.

Sustitutos Bicapa

Estos modelos están constituidos por dos capas: una equivalente de tejido conectivo o análogo de matriz extracelular (ECMA, por sus siglas en inglés) empleado como sustrato y otra que semeja el epitelio, esta última conformada por queratinocitos cultivados sobre la ECMA o sobre materiales sintéticos como la silicona. En general, se cree que los análogos bicapa cumplen el papel de vehículos de liberación de células o factores de crecimiento. Los materiales más comúnmente usados como ECMA son: colágena tipo I, combinación de colágena tipo I y II, Alloderm (Dermis humana cadavérica acelular no inmunogénica), mezcla de constituyentes de lámina basal; que incluye laminina, colágena tipo IV y fibronectina, entre otros.^{10, 11, 12,13}

Yannas y colaboradores en 1980, desarrollaron la primera membrana bicapa compuesta por una esponja de colágena asociada a condroitín-6-sulfato y una capa externa de silicona grado médico, de cerca de 100 mm de espesor. Cuando la membrana es injertada sobre las heridas, los fibroblastos y capilares infiltran la matriz la cual gradualmente es degradada y remodelada para proporcionar una dermis o tejido conectivo artificial sobre la



que migra el epitelio periférico. Después de la epitelización, la capa externa es removida. El sustituto desarrollado por Yannas fue evaluado como cobertura de heridas dermales y de mucosa bucal en conejos.⁵

Más adelante, Omura y colaboradores, elaboraron una esponja de colágena, desnaturalizada y entrecruzada hidrotérmicamente sin la aplicación de condroitín-6-sulfato; estas modificaciones resultaron importantes ya que la colágena desnaturalizada minimizó la antigenicidad y el entrecruzamiento térmico redujo la citotoxicidad al evitar el uso de glutaraldehído para el desarrollo de la aplicación. La membrana modificada fue aplicada sobre defectos de mucosa oral luego de resección de tumores.⁵

Co-cultivos organotípicos

El epitelio de revestimiento es un tejido superficial con capas expuestas al medio externo e interno, que se nutre por difusión de factores desde la capa basal. Esta situación es alterada en los sistemas de cultivo convencionales o sumergidos. En estos, las células epiteliales crecen inmersas en el medio de cultivo nutridas desde arriba, sin la presencia de matriz extracelular específica y privadas de su soporte mesenquimático.^{7,8}

Con el fin de mejorar estas condiciones de cultivo y crear un modelo que imite la situación fisiológica, se han desarrollado los co-cultivos organotípicos. En estos, los análogos de dermis son sembrados con fibroblastos y una vez se haya desarrollado pseudodermis, se siembran sobre



ella queratinocitos que se dejan crecer por un tiempo determinado en cultivo sumergido. Luego, la matriz se expone a la interfase aire líquido en cámaras de cultivo organotípicas.^{5, 7,8} (Figura 7)

El análisis de estos co-cultivos indica que el procedimiento mejora la arquitectura tisular y la expresión de productos de diferenciación, incluyendo componentes de la lámina basal. Se cree que entre más diferenciado el epitelio del equivalente mucoso, más estabilidad y funcionalidad presenta al ser injertado.¹⁰

Por su parte Odioso y cols., en 1995, desarrollaron un modelo de co-cultivo de queratinocitos y fibroblastos gingivales. Emplearon como soporte tridimensional para el cultivo de fibroblastos una malla de nylon en lugar de colágena, ya que de acuerdo a lo planteado por los autores ésta altera la actividad metabólica celular. Las células epiteliales fueron sembradas sobre la capa estromal confluyente, proliferaron y se diferenciaron hasta formar un epitelio escamoso estratificado. El análisis histológico reveló arquitectura celular exhibiendo interacción estroma-epitelio, la cual soporta el crecimiento y la diferenciación de la capa epitelial. De acuerdo con la prueba de azul de tiazol (MTT) para función mitocondrial y la incorporación de timidinatriada, el co-cultivo era metabólicamente activo. El modelo de co-cultivo gingival humano fue viable por más de 35 días post-siembra epitelial. Aunque este

análogo desarrolló un componente epidermal bien diferenciado al no ser biodegradable el soporte, su uso como sustituto de mucosa oral es limitado.¹³

Asimismo en 1997 Tomakidi y cols., generaron un modelo de co-cultivo organotípico de queratinocitos sobre un gel de colágena sembrado con fibroblastos aislados del surco gingival. El análisis histomorfológico reveló su estrecha similitud con epitelio gingival no queratinizado nativo. Este modelo de co-cultivo presentó un componente epidermal bien diferenciado.¹²

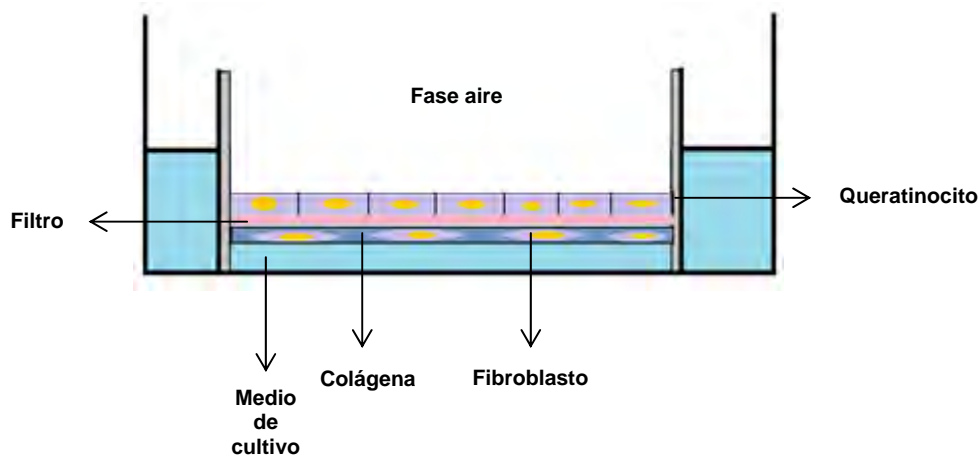


Figura 7. Esquema. Cultivo organotípico.⁷

Co-cultivo de queratinocitos sobre Alloderm

Alloderm es la marca registrada de una matriz dermal acelular obtenida a partir de piel humana cadavérica. La estructura tiene polaridad ya que en su superficie está presente la lámina basal, para permitir la adhesión y el crecimiento de los queratinocitos, y subyacente se encuentra la matriz porosa que permite la infiltración de fibroblastos y células epiteliales del



huésped. Su espesor la hace menos frágil que las láminas de queratinocitos lo cual facilita su manipulación, aplicación y estabilización dentro de la cavidad oral.^{10, 11}

Ha sido evaluado como alternativa a los injertos de piel de espesor parcial y para reducir la cicatrización y contracción de lesiones de mucosa oral. La matriz dérmica acelular es colocada sobre los defectos de forma similar a como se injerta mucosa natural, es suturada y según su localización es protegida con placas de acrílico para evitar su desplazamiento, permite la infiltración celular y neovascularización al igual que la epitelización a partir de los bordes de la herida, sin evidencia de respuesta inmune o rechazo . Las dos desventajas principales del Alloderm son su dependencia de la epitelización periférica y, ante la ausencia de epitelio, la carencia de efecto angiogénico.^{10, 11}

En 1999 Izumi y cols. , produjeron un equivalente de mucosa oral humana tipo bicapa sembrando queratinocitos cultivados sobre Alloderm. El co-cultivo presentó actividad metabólica y retuvo la membrana basal intacta en un medio químicamente definido. A los 18 días se hizo evidente la presencia de epitelio estratificado con láminas basal, espinosa y córnea.¹⁰

Un año más tarde Izumi y cols., de acuerdo con las investigaciones generadas por Jayme¹⁴ acerca de alternativas en el cultivo de células de mamíferos, desarrollan y caracterizan un equivalente de mucosa oral en un



medio de cultivo libre de suero fetal bovino y sin una línea de fibroblastos como capa alimentadora para los queratinocitos, minimizando de esta forma la exposición a virus y/o distintos agentes patógenos que pudieran estar relacionados con los fibroblastos y/o el suero fetal bovino, de esta manera los queratinocitos fueron directamente cultivados sobre Alloderm.¹⁵

Ensayos preclínicos

Varios estudios preclínicos de los sustitutos de mucosa oral se han realizado en modelos porcinos, caninos, conejos y en cerdos de guinea. Los resultados han sido diversos y el grado de éxito o fracaso de cada una de las estructuras evaluadas no han permitido generar una idea clara y definida sobre la eficacia y aplicación de un modelo de mucosa oral equivalente de forma concluyente.

Así Feinberg y colaboradores en 1989, utilizaron una matriz de colágeno bovino tipo I (ED) como sustrato sobre el cual sembraron queratinocitos autólogos obtenidos de especímenes caninos para formar un equivalente de mucosa oral (EMO). Los investigadores injertaron EMO, ED y láminas epiteliales sobre rebordes alveolares mandibulares en los cuales se había eliminado el tejido epitelial y conectivo sin remover el periostio.¹⁶

Por su parte Sugimura y colaboradores en 1997, investigaron los cambios morfológicos producidos después de trasplantar una lámina



cultivada de epitelio oral humano sobre la cara interna de un colgajo rectangular dorsal en ratones atímicos.¹⁷

Recientemente, Ophof y colaboradores en 2002 produjeron un sustituto de mucosa oral a partir del cultivo de queratinocitos gingivales obtenidos de perros beagle sobre un sustrato derivado de piel canina, el cual mostró características histológicas e inmunohistoquímicas semejantes a la mucosa oral nativa. Ellos advierten sobre la importancia del desarrollo de estudios futuros en los cuales el antes mencionado sustituto sea injertado en lesiones palatinas simuladas en especímenes caninos. Llegando así eventualmente, a la generación de investigaciones sobre modelos humanos aplicables en el tratamiento de diversas lesiones, como las presentes en pacientes con labio y paladar hendido.¹⁸

Ensayos clínicos

Ensayos clínicos de sustitutos de mucosa oral en humanos incluyen reconstrucción de estructuras orales secundaria a resección de tumores, para el cubrimiento de defectos mucoperiósticos posterior a palatoplastía, vestibuloplastía, gingivoplastía y en pacientes con déficit severo de encía adherida, por mencionar algunos.

En 1990 Langdon y cols., reportaron el trasplante de una lámina epitelial a sitios retirados por maxilectomía radical secundaria a carcinoma escamocelular de seno maxilar. En general, se observó la asimilación del



injerto y la formación de una mucosa oral saludable igual a la mucosa circundante.¹⁹

Por su parte De Luca y colaboradores en 1990, cultivaron epitelio palatino de pacientes que presentaban defectos mucogingivales y luego lo injertaron en tales sitios. Histológicamente, a las tres semanas estaba presente un epitelio bien diferenciado y un conectivo subyacente sin signos de inflamación.²⁰

Mientras que en 1994, defectos supraperiósticos generados en el procedimiento de profundización de vestíbulo fueron cubiertos con láminas cultivadas de queratinocitos gingivales autólogos. Lauer reporta a los 20 días postoperatorios la presencia de un epitelio queratinizado, además de no observarse diferencias topográficas entre el área injertada y el tejido gingival vecino.²¹

En otro estudio Raghoobar y colaboradores en 1995, cultivaron mucosa palatina autóloga y con las láminas obtenidas cubrieron defectos generados por vestibuloplastías. A los tres meses evaluaron clínica e histológicamente los injertos; la mucosa injertada semejaba la mucosa palatina original, estaba vascularizada, no presentaba reacción a cuerpo extraño y mostraba una unión sin contracción.²²



Sustitutos bicapa constituidos por una lámina externa de silicona y una esponja de colágena desnaturalizada y fibrilar entrecruzada térmicamente, también han sido ensayados. En 1997 Omura y cols., ocuparon esta clase de injerto sobre defectos mucosos generados después de la eliminación quirúrgica de tumores en paladar duro, lengua y encía. La epitelización se completó 4 a 5 semanas después de la cirugía, sin que se presentara infección local ni reacción de rechazo, mientras que la contracción postoperatoria fue mínima.²³

Asimismo en 1997 Tsai y colaboradores, cultivaron epitelio mucoso autólogo para emplearlo como injerto reconstructivo en pacientes que se les había realizado resección de tumores para proceder luego con la colocación de implantes. Los hallazgos histológicos revelaron un epitelio escamoso estratificado sin queratinización y algunas células inflamatorias en los espacios intercelulares, con un tejido conectivo que exhibía capilares ectópicos e infiltrado inflamatorio.²⁴

Para 1998 Ueda y cols., realizaron un estudio con pacientes en un rango de edad entre los 40 a 70 años, sometidos a terapia de implantes. La mucosa fue obtenida durante una primera cirugía, cultivada y posteriormente injertada en una segunda. Una semana después del injerto, en la mayoría de los casos la lámina epitelial estaba adaptada al sitio y la zona había epitelizado. Desafortunadamente, en algunos se observó necrosis parcial del



injerto, eritema, exudado y sangrado, sin embargo en todos los casos los rebordes alveolares estuvieron correctamente cubiertos por encía adherida y no se presentó inflamación alrededor de los tornillos de cicatrización.²⁵

Por su parte Rhee y colaboradores en ese mismo año, evaluaron el uso de Alloderm para la reducción de la cicatrización y contracción de lesiones de mucosa oral, luego de la resección de tumores primarios intraorales. La localización de las lesiones primarias incluían: lengua, piso de boca, maxilar, mandíbula, paladar duro y/o blando, labio y amígdalas. Los resultados histológicos demostraron epitelización desde los tejidos circundantes, al igual que infiltración celular.¹¹

Mientras que Sumi y cols., en 1999 aplicaron injertos de epitelio cultivado en pacientes con labio y paladar hendido, las láminas de epitelio fueron injertadas sobre las superficies cruentas generadas en el proceso de palatoplastía convencional. Las áreas injertadas cicatrizaron después de 2 a 3 semanas en todos los casos.²⁶

En la cobertura de amplios defectos de mucosa oral generados por la escisión de diversas patologías tales como; hiperqueratosis y paraqueratosis, épulis fisuratum y carcinoma de células escamosas, entre otras. Bodner y Grossman en 2003, reportaron la aplicación de injertos de mucosa oral cultivados a partir de queratinocitos autólogos. Tres meses después de



lacirugía el área injertada se encontraba cubierta por mucosa sana sin signos de infección o rechazo aparentes.²⁷

Mientras que en ese mismo año Izumi y cols., comparan la eficacia entre el Alloderm y un equivalente de mucosa oral generado a partir del cultivo de queratinocitos autógenos como injerto en pacientes sometidos a cirugía de escisión de lesiones premalignas o cancerosas, encontrando resultados más favorables cuando el equivalente de mucosa oral fue utilizado.²⁸

En el 2007 Hotta y cols., producen un equivalente de mucosa oral a partir de queratinocitos gingivales sin ocupar suero fetal bovino ni capa alimentadora celular, con el propósito de analizar clínica e histopatológicamente su eficacia en el proceso de epitelización y cicatrización en pacientes con carcinoma de células escamosas y leucoplasia.²⁹

En España, González y cols., durante el 2009 obtuvieron mediante cultivo *in vitro* de queratinocitos orales sobre una submucosa artificial constituida por colágena y fibroblastos humanos, láminas de tejido oral en las que se pudieron identificar estructuras de una mucosa oral completa las cuales fueron injertadas en ratones atímicos para conocer su



comportamiento *in vivo*.³⁰ Mientras que en México Monteagudo y colaboradores en 2009, desarrollaron injertos autólogos a partir del cultivo de fibroblastos gingivales sobre una matriz biológica para la cobertura radicular como opción en el tratamiento de recesiones gingivales.³¹



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las limitantes a las cuales se enfrenta la terapia mucogingival consiste en la escasez de mucosa oral autóloga suficiente como injerto para la corrección exitosa de defectos mucogingivales a nivel estético y funcional.

Los autoinjertos de piel, presentan una marcada diferencia clínica en cuanto a consistencia y color, asimismo los patrones de queratinización son diferentes con respecto a los de la mucosa oral, además de la presencia de anexos cutáneos.

Por su parte los injertos mucogingivales, requieren de dos sitios quirúrgicos, uno donador y otro receptor. Este hecho origina mayores molestias postoperatorias y dificultad en la hemostasia, además de que el sitio quirúrgico donante cicatriza, en ocasiones, por segunda intención.



4. JUSTIFICACIÓN

Basados en el hecho de la baja disponibilidad de mucosa oral como autoinjerto y las importantes desventajas que conllevan el uso de injertos epiteliales en la corrección de defectos mucogingivales. La ingeniería de tejidos busca mediante el desarrollo de bioimplantes que semejen lamucosa oral queratinizada proporcionar una opción viable, eficaz, accesible y que pueda ser aplicada de forma exitosa en la terapéutica periodontal.

Mediante el desarrollo de un biomaterial similar a la mucosa oral, producido *in vitro*, que sea capaz de interactuar con las zonas adyacentes receptoras para regenerar el tejido evitando contracción del mismo; será posible eludir la necesidad de dos lechos quirúrgicos, situación que incrementa molestias y complicaciones postoperatorias, además de hacer a un lado dificultades relacionadas con la disponibilidad del tejido donante, pues a partir de una pequeña biopsia de tejido gingival y en un tiempo relativamente corto, será posible producir dicho bioimplante con características similares a las de la mucosa oral queratinizada que servirá como autoinjerto, el cual cumplirá con los patrones necesarios para generar éxitos funcionales y estéticos en la cirugía periodontal.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Elaborar un bioplante de mucosa oral *in vitro* mediante co-cultivo de fibroblastos y queratinocitos gingivales sobre una membrana de submucosa intestinal de cerdo.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener y cultivar fibroblastos gingivales.
- Obtener y cultivar queratinocitos gingivales.
- Producir el co-cultivo de queratinocitos y fibroblastos gingivales sobre una membrana de submucosa intestinal de cerdo
- Analizar histológicamente el co-cultivo, además de evidenciar la eficacia de la membrana de submucosa intestinal de cerdo en su modalidad fenestrada, como soporte para la generación del bioimplante con características histológicas semejantes a la mucosa oral.
- Caracterizar metabólicamente el co-cultivo, utilizando el método de reducción del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).



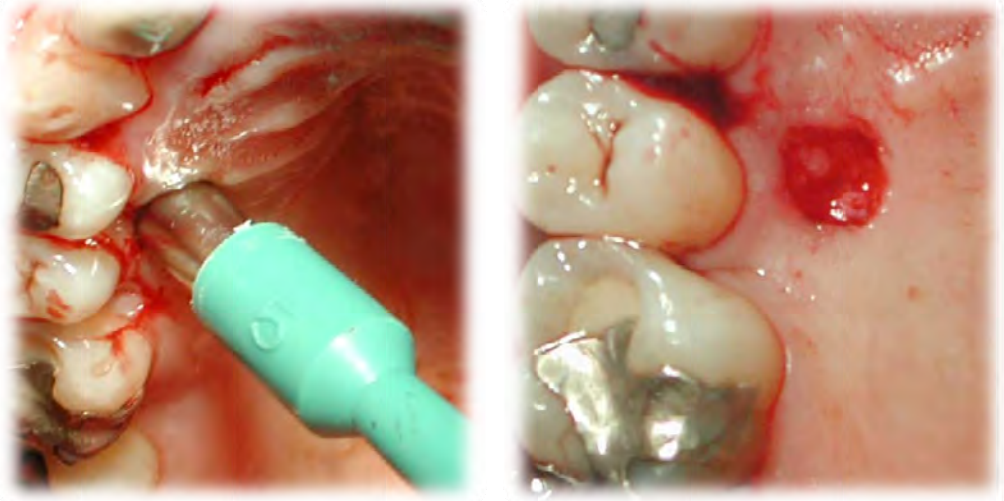
6. MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración de Helsinki

De acuerdo con lo establecido en los principios básicos y de investigación biomédica no clínica en la Declaración de Helsinki sobre las recomendaciones para la orientación en la investigación biomédica en seres humanos, adoptadas por la 18a Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, junio de 1964 y modificadas por la 29a Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, octubre de 1975, por la 35a Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, octubre de 1983 y por la 41a Asamblea Médica Mundial Hong Kong, en septiembre de 1989; se informa al paciente acerca de los objetivos, métodos, beneficios previstos y posibles peligros del estudio y las molestias que puede acarrear, procediendo a obtener de esta manera el consentimiento válidamente informado.³²

Obtención de fibroblastos gingivales humanos por método enzimático rápido

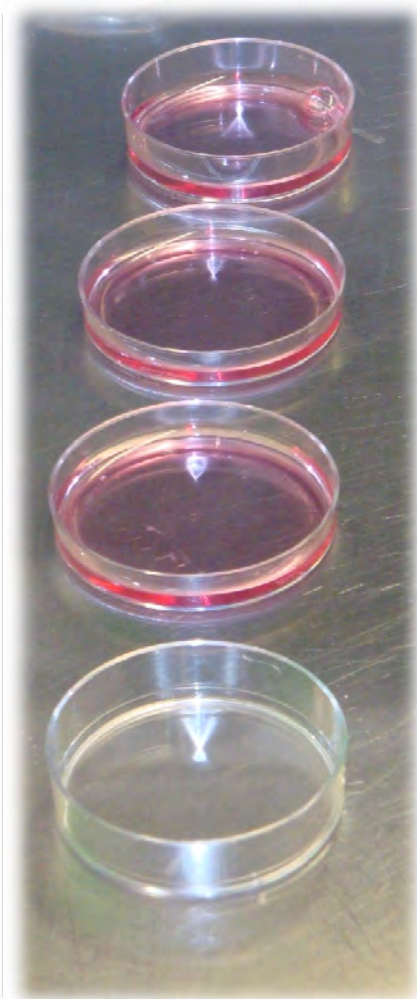
Se tomó, bajo anestesia local, una biopsia excisional de mucosa oral masticatoria con un diámetro aproximado de 3 mm y una profundidad de 2 mm de un sujeto donador voluntario.(Fotografía 1)



Fotografía 1. Toma de biopsia por punch, para obtención de fibroblastos gingivales.
(Fuente directa)

El tejido gingival obtenido en condiciones de asepsia fue preservado durante el transporte hasta el laboratorio en un tubo estéril de 50 ml con 5 ml de medio de cultivo D-MEM (Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecoe, por sus iniciales en inglés) suplementado con 10% de SFB (Suero fetal bovino) y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina 10 000 UI/ml, estreptomycin 10 mg/ml y anfotericina B 25µg/ml) conservado a 4°C.^{7, 8,33}

Una vez en el laboratorio, bajo una campana de flujo laminar se colocaron cuatro 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 reducir de esta forma al mínimo la posible carga bacteriana que pudiera existir; en la cuarta caja de Petri el tejido gingival se fragmentó con bisturí hoja # 22 en porciones de aproximadamente 1 mm³. (Fotografía 2)



**Fotografía 2. Cajas de Petri con medio de cultivo D-MEM para enjuagar la biopsia.
(Fuente directa)**

En seguida se tomó el contenido de esta última caja con una pipeta de 25 ml y se vació en un tubo cónico de 15 ml para proceder a centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se decantó la muestra y se le agregaron 5 ml de solución de colagenasa IV al 0.25% en medio de cultivo al tubo cónico para incubarse en un baño con agitación a una temperatura de 37°C por dos horas, cada 15 minutos se agitó la muestra en un agitador mecánico para acelerar de esta manera la disgregación del tejido.

Después de este tiempo, se centrifugó según las condiciones antes mencionadas, el botón celular obtenido se resuspendió en 4 ml de D-MEM suplementado con 10% de SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico para posteriormente sembrarse en una botella de cultivo T-25 y se incubó en condiciones estándares de cultivo (37° C y una atmósfera húmeda con 5% de CO₂-95% de aire).^{7, 8,33}(Figura 8)(Fotografía 3)

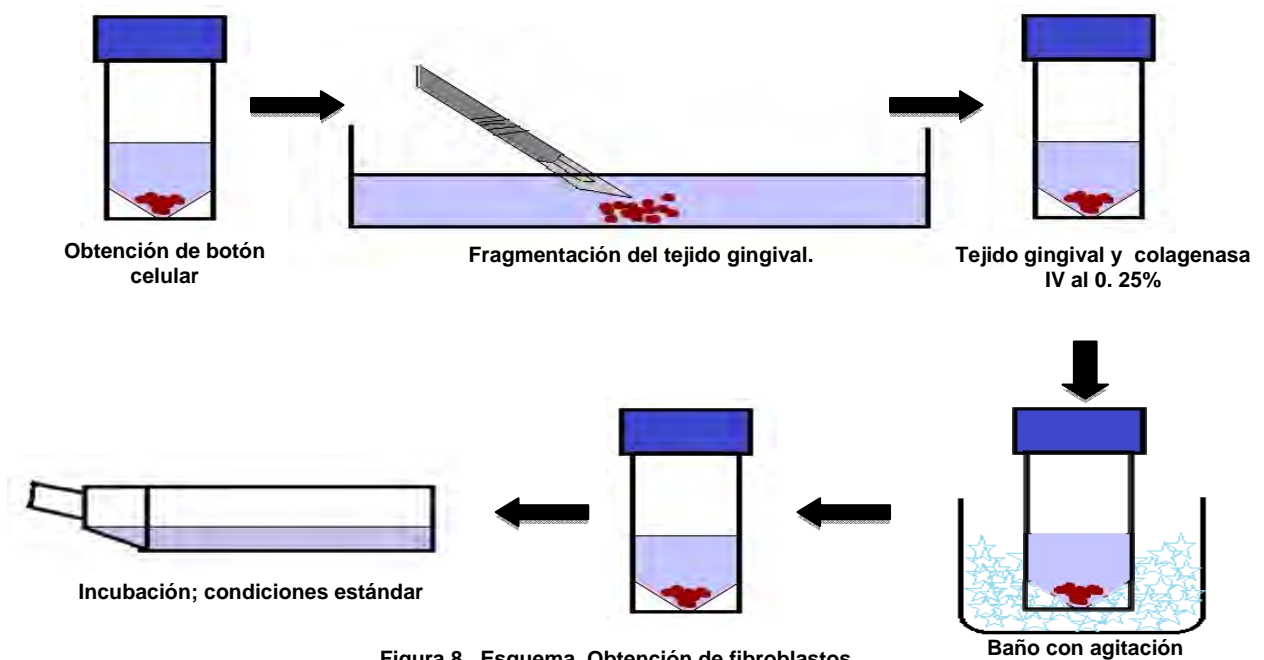
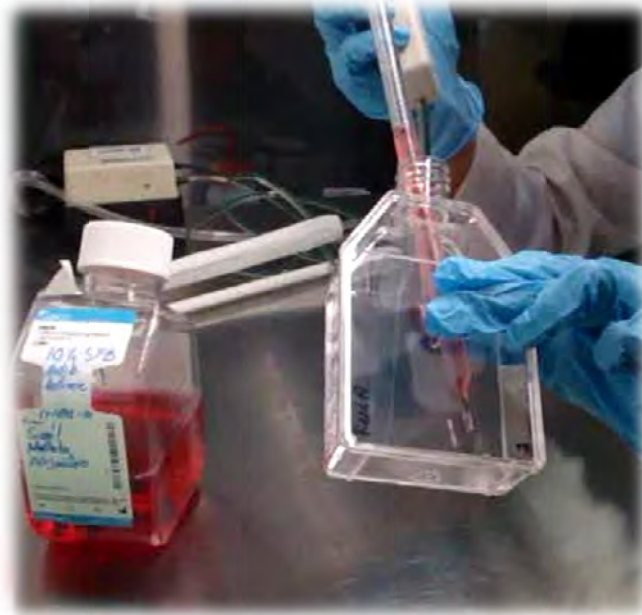


Figura 8. Esquema. Obtención de fibroblastos gingivales humanos por método enzimático rápido.



Fotografía 3. Colocación de medio de cultivo D-MEM en botella de cultivo. (Fuente directa)

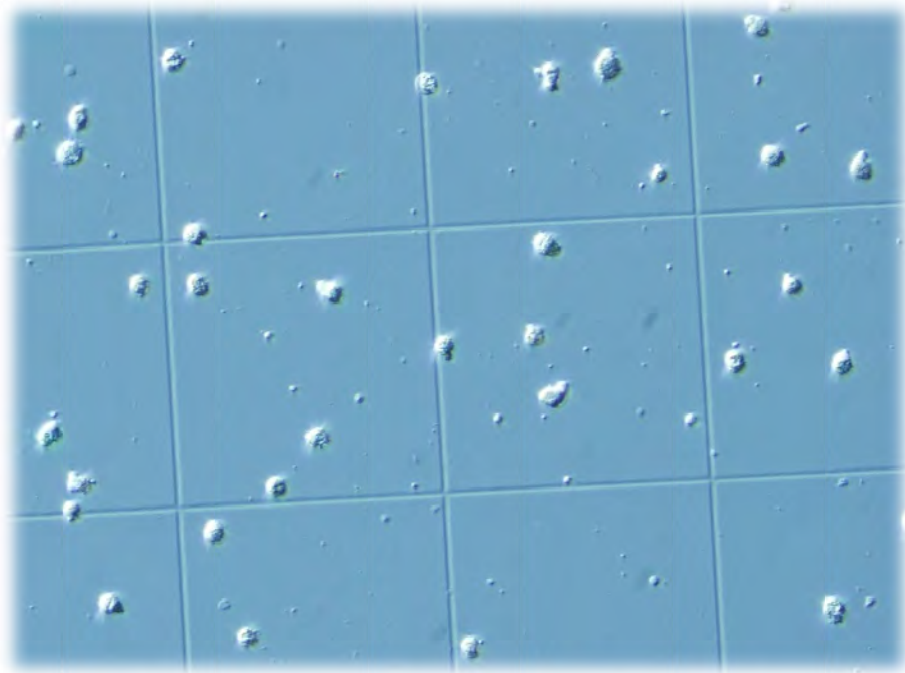
Subcultivo de fibroblastos gingivales

Una vez que se alcanzó la confluencia de las células, fueron subcultivadas mediante tripsinización. Se retiró el medio de cultivo de la caja T-25 y se enjuagó con 2.5 ml de verseno (EDTA; ácido etileno-diamino-tetracético y PBS; solución amortiguadora de fosfatos) por 30 segundos, con el fin de atrapar los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} logrando debilitar uniones intercelulares gracias a su capacidad quelante, transcurrido este tiempo se decantó la solución.

Luego, se agregaron 2.5 ml de solución de tripsina al 0.25% en verseno, la cual por su acción proteolítica es capaz de desprender las células de la superficie de la botella de cultivo y se dieron golpes secos con

la palma de la mano en las paredes de la botella de cultivo para promover el desprendimiento celular, enseguida se tomaron 10 ml de medio de cultivo D-MEM y se enjuagó toda la superficie de la botella para levantar y resuspender las células y lograr con esto la inactivación de la solución de tripsina.^{7,8,33}

Las células resuspendidas se colocaron en un tubo cónico de 15 ml, se procedió a tomar una alícuota para contar el número de células mediante un hemocitómetro o cámara de Neubauer, el resto se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos a 20°C obteniendo así el botón celular. (Fotografía 4)



**Fotografía 4. Microfotografía a 100 X. Conteo celular mediante hemocitómetro.
(Fuente directa)**

Se derivaron dos cultivos celulares, uno fue criopreservado (5% de DMSO; dimetil sulfóxido y 95% de SFB) en un contenedor de nitrógeno líquido mientras el otro se sembró en una caja T-75 manteniendo fibroblastos que fueron ocupados en experimentos ulteriores. Las células se evaluaron al microscopio y se efectuó cambio del medio de cultivo dos veces por semana, se mantuvieron en condiciones de cultivo estándares.^{7, 8,33} (Figura 9)

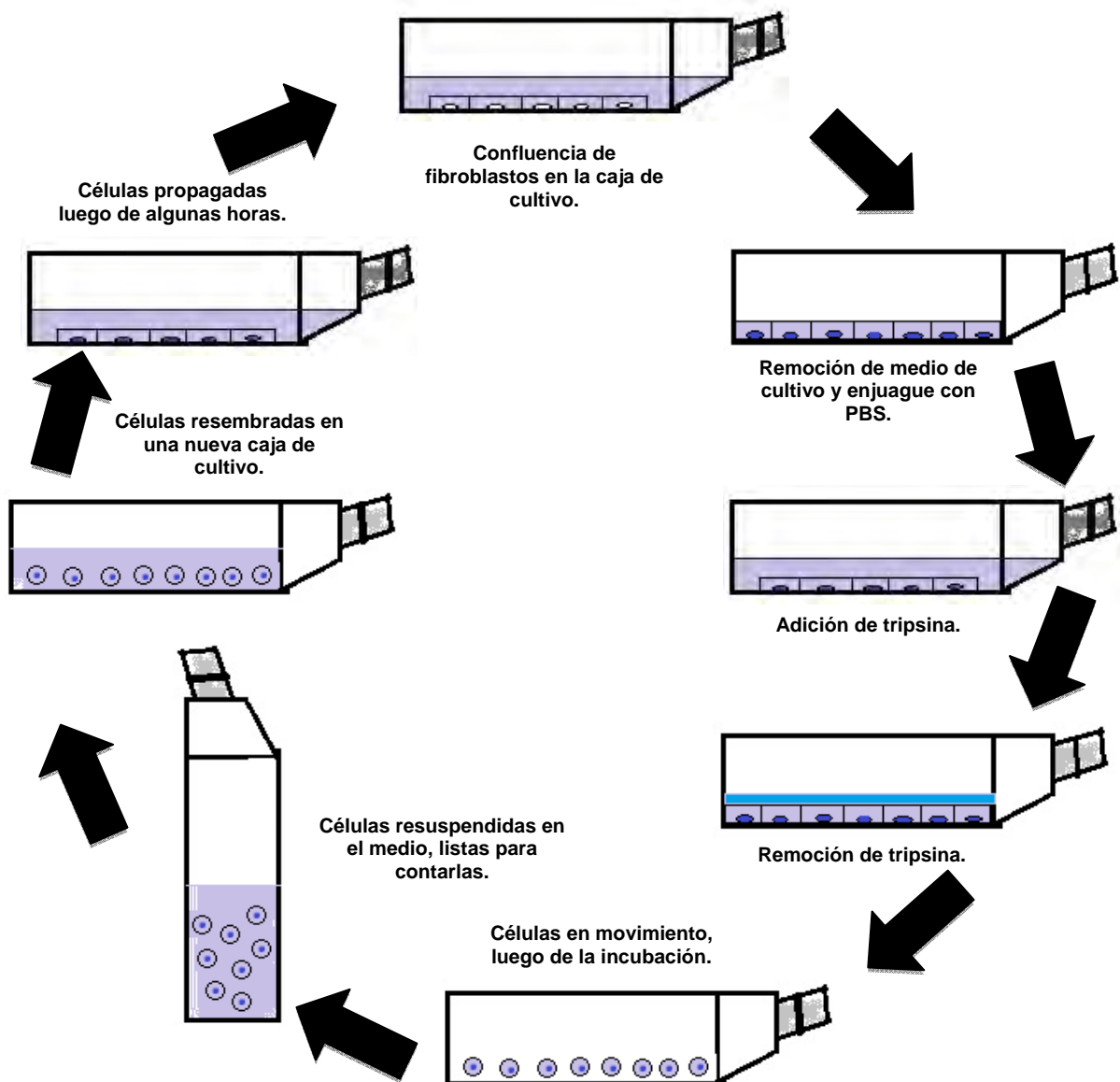


Figura 9. Esquema. Subcultivo de fibroblastos gingivales.⁷

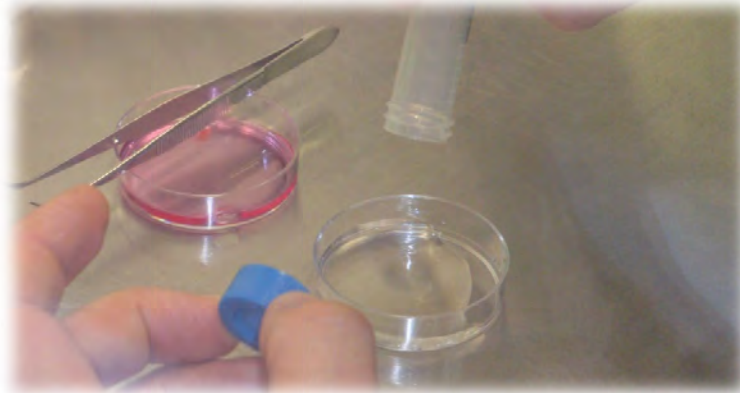
Obtención de queratinocitos gingivales humanos por método enzimático

Se tomó, bajo anestesia local, una biopsia excisional de mucosa oral masticatoria con un área aproximada de 3 mm² y una profundidad de 2 mm de un sujeto donador voluntario.(Fotografía 5)



**Fotografía 5. Toma de biopsia excisional de mucosa oral masticatoria.
(Fuente directa)**

El tejido gingival se obtuvo en condiciones de asepsia y fue preservado durante el transporte hasta el laboratorio en un tubo estéril de 50 ml con 5 ml de medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico, conservado a 4°C.

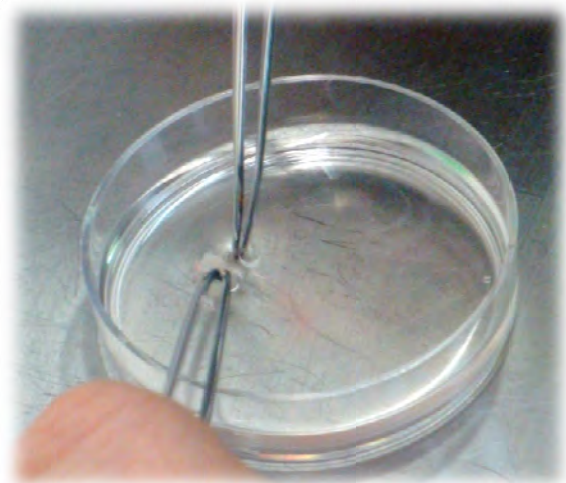


Fotografía 6. Colocación de 5 ml de tripsina al 0.6% en PBSA, en caja de Petri. (Fuente directa)

Una vez en el laboratorio bajo una campana de flujo laminar se colocaron cuatro 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 reducir de esta forma al mínimo la posible carga bacteriana que pudiera existir, posteriormente la biopsia fue colocada en otra caja de Petri a la cual se le agregaron 5 ml de solución de tripsina al 0.6% en PBSA (Solución amortiguadora de fosfatos A; Ca^{2+} , libre de Mg^{2+}), monitoreando puntualmente la separación del componente epitelial mediante el microscopio invertido. (Fotografía 6)

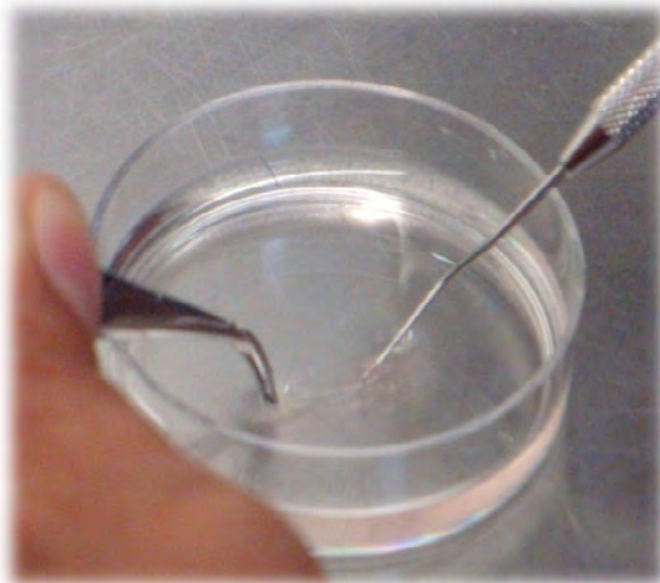
Transcurridos 20 a 30 minutos aproximadamente, cuando comenzó la disociación del componente epitelial en los extremos de la biopsia, se irrigó con 5 ml de D-MEM suplementado con 10% de



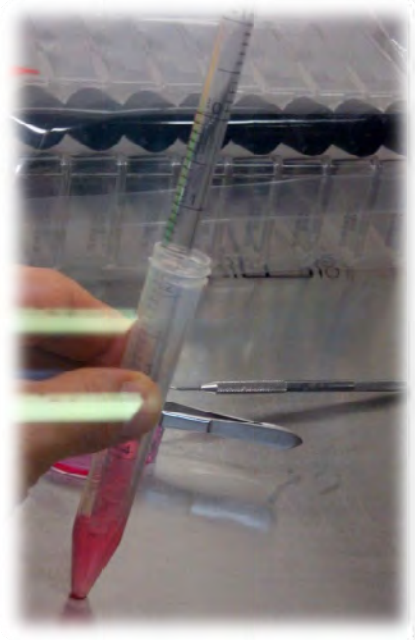
Fotografía 7. Separación del componente epitelial. (Fuente directa)

SFBY una mezcla de antibióticos y antimicótico para inactivar el efecto de la tripsina. Se procedió a separar cuidadosamente el componente epitelial y se colectó en un tubo estéril de 50 ml con D-MEM, donde se propició la obtención de queratinocitos mediante un pipeteo gentil. (Fotografías 7,8 y 9)

La suspensión obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se descartó el sobrenadante y se recuperó el botón celular.^{7, 8,34} (Figura 10)



Fotografía 8. Separación del componente epitelial. (Fuente directa)



Fotografía 9. Pipeteo para propiciar la obtención de queratinocitos (Fuente directa)

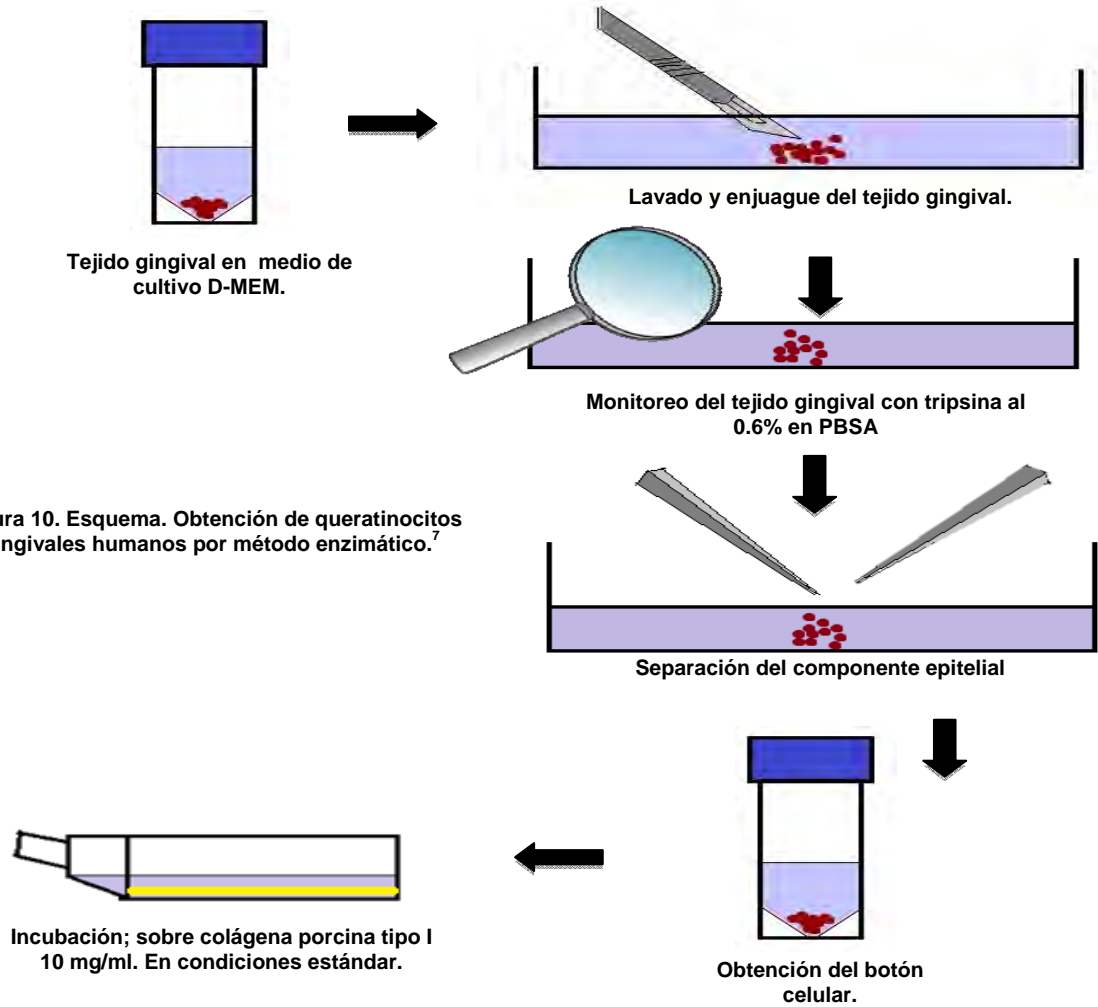


Figura 10. Esquema. Obtención de queratinocitos gingivales humanos por método enzimático.⁷

Cultivo celular primario de queratinocitos

Las células obtenidas fueron cultivadas en una botella T-25 a la cual previamente se la había aplicado una capa de colágena porcina tipo I (10 mg/ml), con el fin de propiciar una mejor adherencia celular, y se mantuvieron en un medio de crecimiento específico para queratinocitos; KGM-Gold® (Keratinocyte Growth Medium, por sus siglas en inglés) en condiciones estándares de cultivo. El medio de cultivo se cambió por primera vez a los 3 días y luego dos veces por semana.^{7, 8,34} (Figura 11 y 12)

Suplementos KGM-Gold®	
Hidrocortisona	0.5 ml
Transferrina	0.5 ml
Epinefrina	0.25 ml
GA-1000 (Gentamicina y anfotericina)	0.5 ml
BPE (Extracto de pituitaria bovina)	2.0 ml
rhEGF (Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano)	0.5 ml
Insulina	0.5 ml

Figura 11. Tabla que muestra los componentes suplementarios del medio de cultivo KGM-Gold®.³⁴



Figura 12. Medio de cultivo KGM-Gold®. Medio de cultivo específico para queratinocitos. (Fuente directa)



Subcultivo de queratinocitos gingivales

Cuando se obtuvo confluencia, los queratinocitos fueron desprendidos de la botella de cultivo por tripsinización. Se incubaron con 5 ml de tripsina al 0.1% con 1.3 mM de EDTA (0.05% EDTA) a 37°C por 5 minutos seguido de un pipeteo gentil promoviendo así la separación celular. El pretratamiento con verseno no se utilizó en este caso a causa de la baja cantidad de iones Ca^{2+} contenidos en el medio de cultivo selectivo para queratinocitos, y el contenido de la botella se vertió en un tubo cónico de 15 ml de ahí se tomó una alícuota para realizar el conteo celular con un hemocitómetro, el resto se centrifugó a 900 rpm durante 10 minutos, luego se obtuvo el botón celular, que fue sembrado en una botella T-25 con una capa de colágena porcina tipo I (10 mg/ml) en condiciones estándares de cultivo.^{7, 8}

Cultivo celular en placa de 24 pozos

Una vez obtenida la confluencia celular de fibroblastos y queratinocitos gingivales humanos, la membrana de submucosa intestinal de cerdo fue recortada y adaptada a la superficie de cada uno de los 24 pozos que conforman la placa. (Figura 13) (Fotografía 10)



Figura 13. Caja de 24 pozos con membrana. (Fuente directa)



Fotografía 10. Microfotografía a 100 X. Diferentes vistas de la membrana de submucosa intestinal de cerdo (SIS) en su modalidad fenestrada. (Fuente directa)

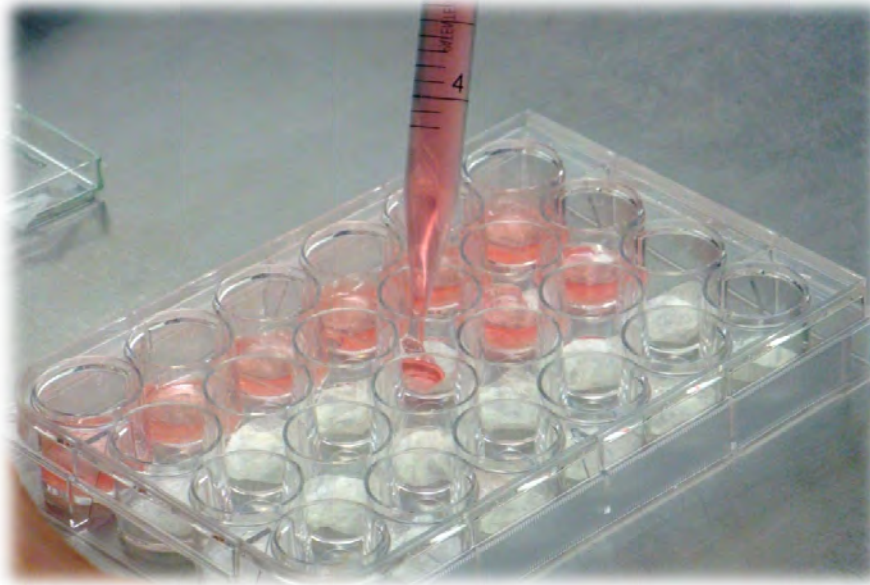
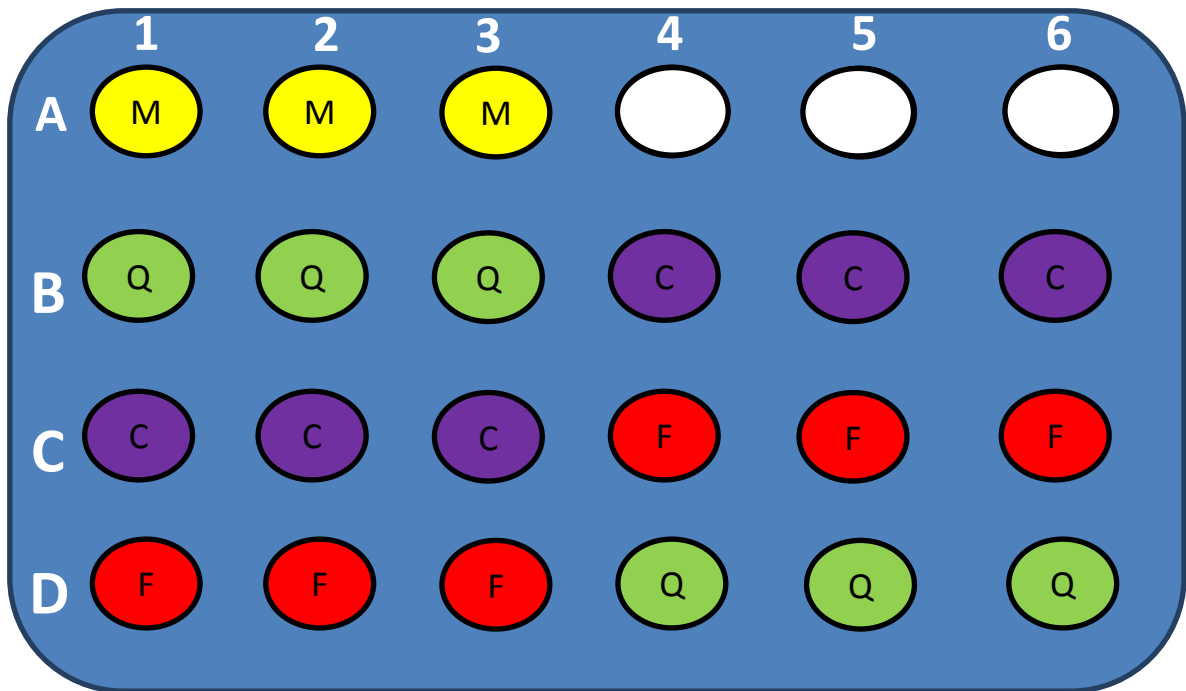


Figura 14. Colocación de 500µl de D-MEM sobre la membrana en cada uno de los 24 pozos. (Fuente directa)

Luego se agregaron 500 µl de D-MEM a cada uno de los pozos y se colocó la placa en la incubadora por 24 horas, para así acondicionar la membrana (Figura 14). Posteriormente, se procedió a distribuir las líneas celulares de la siguiente manera: primero se sembraron fibroblastos (40 000 células por pozo) en 500 µl de D-MEM en 12 pozos y se incubaron por 72 horas, luego se cultivaron queratinocitos en KGM-Gold® 500 µl por pozo en 12 pozos, que de igual forma se mantuvieron incubados durante 72 horas. Se debe destacar que cada estirpe celular se sembró en la placa para tener las condiciones de monocultivo y cocultivo, y presentar así las tres situaciones estudiadas que conciernen a disponer sólo de fibroblastos o queratinocitos y el cocultivo de ambos sembrados sobre la membrana,



dejando 3 pozos como control sólo con membrana, respetando la ubicación que se muestra en la Figura 15.



- Membrana M
- Fibroblastos F
- Queratinocitos Q
- Co-cultivo C

Figura 15. Esquema. Distribución celular en caja de 24 pozos.



Ensayo de MTT

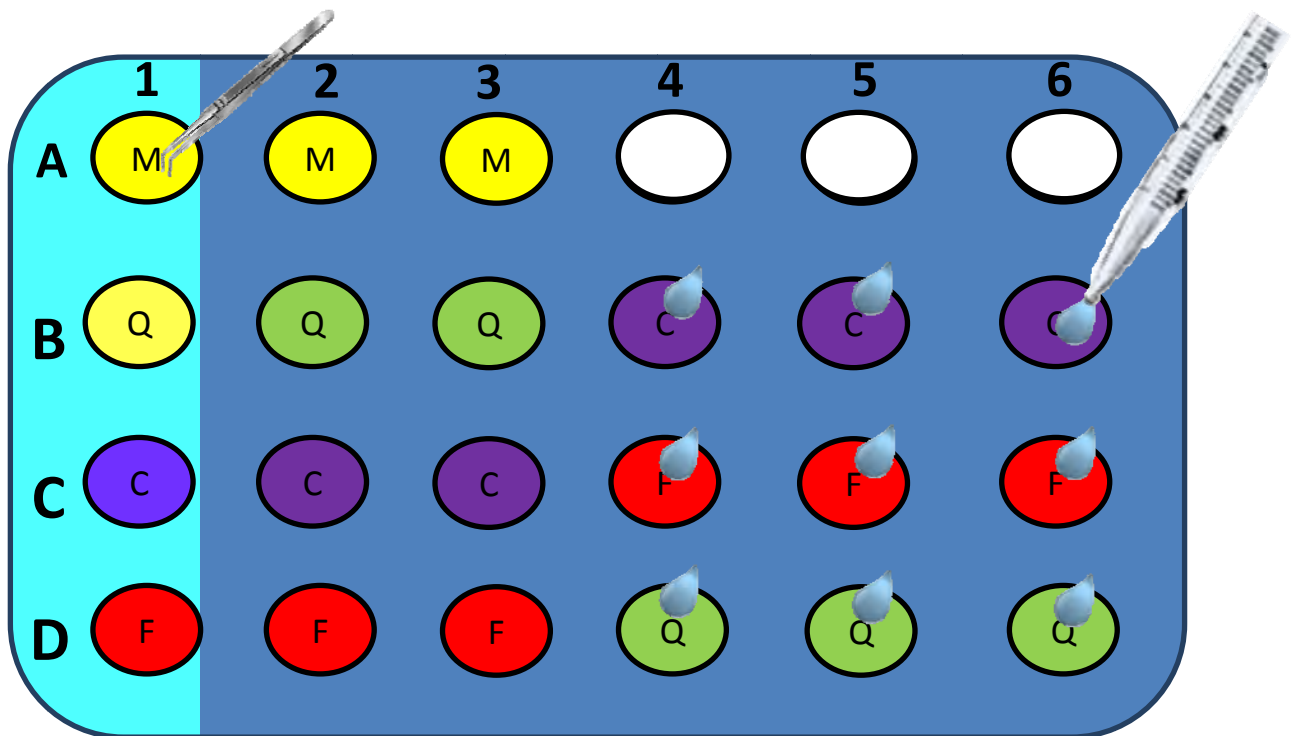
El ensayo colorimétrico de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se utiliza ampliamente como prueba de citotoxicidad en cultivos celulares, así como para medir la proliferación y supervivencia celular. Se basa en la capacidad de las células vivas para reducir bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en cristales de formazán, compuesto de color azul soluble en DMSO, mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa; permitiendo de esta forma determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Los resultados son cuantificados a partir de los valores de la absorbencia en densidades ópticas (DO) en un espectrofotómetro ocupando una longitud de onda de 570 nm, ya que es la longitud en la que se presenta el pico máximo de absorción del formazán producido. La cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán generado.

El método MTT ha reportado importantes ventajas con respecto a la velocidad de análisis, cuantificación y manejo de varias muestras. El ensayo de MTT en comparación con otras técnicas convencionales ha mostrado excelentes resultados y reproductibilidad del 90%.^{33,35}

Transcurrido el periodo de incubación de ambas líneas celulares en mono y cocultivo respectivamente, se retiró el medio de los pozos; B4, B5, B6

(células en cocultivo), C4, C5, C6 (fibroblastos), D4, D5 y D6 (queratinocitos) y se agregaron 70 μ l de MTT estéril en una concentración de 5mg/ml a cada uno de estos pozos, los demás pozos tuvieron un manejo específico para llevar a cabo la inmunohistoquímica correspondiente (Figura 16).Habiendo terminado de agregar el MTT se regresó la placa a la incubadora por un lapso de 2 horas.



Membrana	M
Fibroblastos	F
Queratinocitos	Q
Co-cultivo	C

Figura 16. Esquema. Distribución de MTT en los pozos.



Transcurrido este tiempo se sacó la placa de la incubadora y cada pozo se enjuagó dos veces con 500 μ l de PBS. Posteriormente, se añadió 500 μ l de DMSO, esto con el fin de solubilizar el precipitado de azul de formazán generado por la actividad mitocondrial de las células. Esta mezcla se agitó vigorosamente hasta su completa disolución por un periodo de 40 minutos. Al término de este tiempo se valoró espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm., la cantidad de formazán generado en cada uno de los pozos.

Caracterización histológica: Inmunohistoquímica

Técnica para detectar la presencia de un antígeno en los cortes histológicos de un tejido mediante el empleo de un anticuerpo que es específico para el antígeno y está acoplado a una enzima. La enzima convierte un sustrato incoloro en una sustancia insoluble de color que precipita en el punto donde está situado el anticuerpo y por consiguiente, el antígeno. La posición del precipitado coloreado en el corte de tejido y, por tanto, la del antígeno se observa por medio de un microscopía óptica.

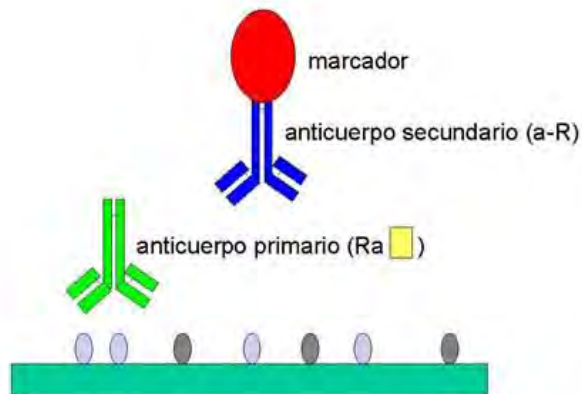


Figura 17. Esquema. Inmunohistoquímica por método indirecto.³⁶

Dentro de la inmunohistoquímica existe el método directo, donde un anticuerpo se une a un antígeno específico, y el método indirecto donde se utilizan dos anticuerpos en vez de uno; el primer anticuerpo es destinado al reconocimiento antigénico, y el segundo es dirigido contra el primero; aumentando así la sensibilidad de la técnica. (Figura 17)

De los métodos de detección inmunohistoquímica indirecta los más utilizados en microscopía óptica son; la inmunofluorescencia y el método de los complejos avidina-biotina (AB) o variaciones del mismo todavía más sensibles. La inmunohistoquímica es una técnica habitual dentro del diagnóstico anatomopatológico y en diversos campos de investigación.³⁶

Después del periodo de incubación de ambas líneas celulares en mono y cocultivo respectivamente, se retiró el medio de los pozos; A1, A2, A3 (sólo membrana, control), B1, B2, B3 (queratinocitos), C1, C2, C3 (células en cocultivo), D1, D2 y D3 (fibroblastos) para llevar las membranas contenidas en cada uno de ellos a un tubo de 15 ml con 3 ml de formol amortiguado, con el fin de fijar las mismas y así poder realizar la caracterización histológica.(Figura 16 y 18)



Figura 18.Colocación de membrana en tubo de 15 ml con 3 ml de formol amortiguado.
(Fuente directa).



6.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental *in vitro* para analizar y caracterizar histológica y metabólicamente el co-cultivo de fibroblastos y queratinocitos gingivales sobre una membrana de submucosa intestinal de cerdo.

6.2 Variables de estudio

Variables independientes:

- Tipo de membrana; membrana de submucosa intestinal de cerdo en su modalidad fenestrada.
- Densidad celular; para fibroblastos de 20 000 células/cm² y para queratinocitos que no se pueden contar utilizando el hemocitómetro se suspendieron las células en un volumen determinado y de éste se sembró la alícuota correspondiente al área de cada pozo.
- Tiempo de cultivo de todas las condiciones: 72 horas.

Variables dependientes:

- Características histológicas.
- Viabilidad metabólica.



7. RECURSOS

7.1 Humanos

Para la realización del presente estudio fue necesaria la participación de una tesista, un tutor y un asesor.

7.2 Materiales

A continuación se enlistan los materiales, soluciones y líneas celulares utilizadas. (Figura 19-23).

Material estéril:

- Botellas de cultivo de 25 y 75 cm²
- Cajas de Petri P-60 (6 cm Ø)
- Criotubos
- DMSO [Dimetil sulfóxido, (CH₃)₂SO] al 100%
- Explorador de punta doble #5
- Filtros de perinola millipore estériles de 0.20 µm Ø de poro
- Hojas de bisturí #22 y #15c
- Jeringas estériles de 10 ml
- Línea celular de fibroblastos gingivales humanos
- Línea celular de queratinocitos gingivales humanos
- Mangos de bisturí #3 y #4
- Medio de cultivo (D-MEM suplementado con 10% SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico)



- Medio de cultivo específico para queratinocitos (KGM-Gold®)
 - Membrana fenestrada OASIS®
 - Micropipetas
 - Pinzas Adson sin dientes
 - Pinzas de curación
 - Pipetas estériles de 1,5,10 y 25 ml
 - Placas de cultivo 24 pozos
 - Solución criopreservadora (95% de SFB y 5% de DMSO)
 - Solución de azul de tripán
 - Solución de colágena porcina tipo I
 - Solución de colagenasa IV al 0.25%
 - Solución de paraformaldehído al 4%
 - Solución de PBSA
 - Solución de tripsina 0.25% en verseno
 - Solución de tripsina al 0.6% en PBSA
 - Solución de verseno (EDTA+PBS)
 - Solución estéril de MTT (5mg/5ml de PBS)
 - Tubos estériles cónicos de 15 y 50 ml
- Material no estéril:
- Agitador magnético
 - Balanza analítica
 - Baño con agitación y control de temperatura
 - Cámara digital
 - Campana de flujo laminar
 - Centrífuga con refrigeración
 - Contador manual de células

- Criopreservador de relieve y cámara digital de nitrógeno líquido Olympus
- Espectrofotómetro
- Hemocitómetro
- Incubadora húmeda y ambiente de CO₂
- Lupas quirúrgicas
- Microscopio invertido con contraste de fases, óptica
- Microscopio óptico de contraste de fases Olympus
- Probeta graduada 10 ml
- Propipeta automática
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 ml
- Vórtex

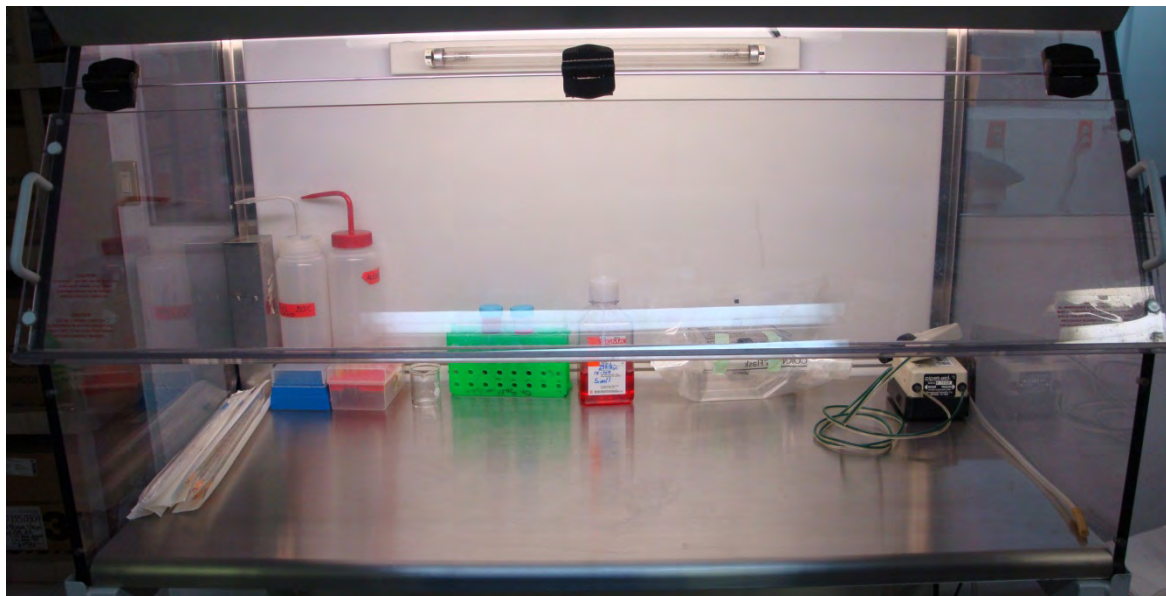


Figura 19. Campa de flujo laminar, propipeta automática, botellas de cultivo T-75, medio de cultivo D-MEM, gradilla, tubos estériles cónicos de 50 ml, vaso de precipitados de 50 ml, pipetas estériles de 5 y 10 ml. (Fuente directa)



Figura 20. Baño con agitación y control de temperatura, vórtex y centrífuga con refrigeración. (Fuente directa).

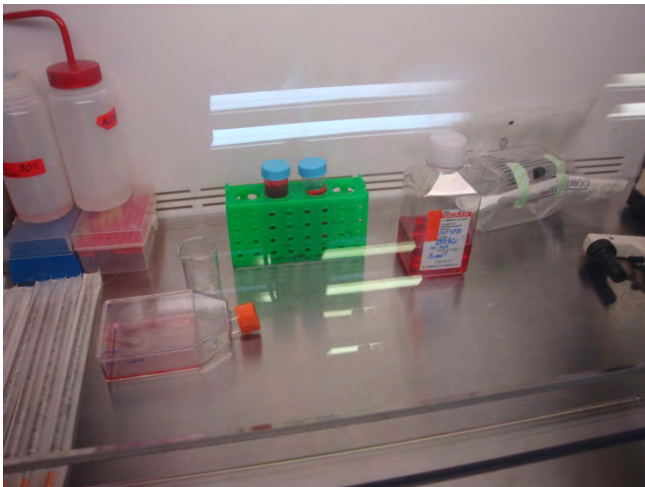


Figura 21. Propipeta automática, botella de cultivo T-75, medio de cultivo D-MEM, gradilla, tubos estériles cónicos de 50 ml, vaso de precipitados de 50 ml, caja de cultivo T-75 con medio de cultivo, pipetas estériles de 10 ml. (Fuente directa)



Figura 22 Incubadora húmeda y con ambiente de CO₂. (Fuente directa).



Figura 23. Microscopio invertido con contraste de fases, óptica de relieve y cámara Olympus. (Fuente directa).

7.3 Financieros

La totalidad de los recursos tanto materiales como de infraestructura fueron proporcionados por el 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.

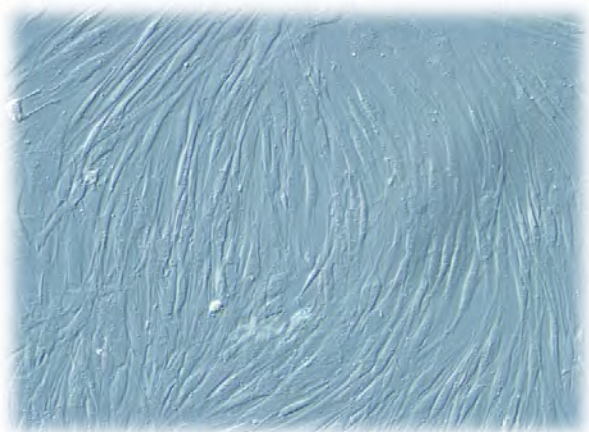
8. RESULTADOS

Obtención, cultivo y subcultivo de fibroblastos gingivales humanos.

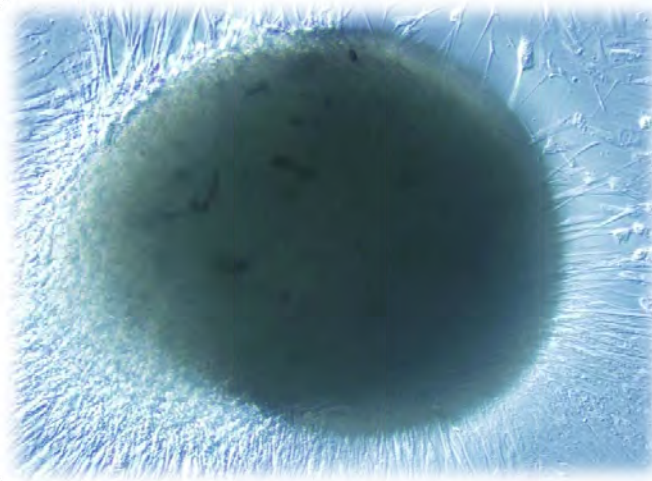
La confluencia de fibroblastos gingivales se alcanzó aproximadamente a los 10 días, se obtuvieron células mediante la técnica de disgregación enzimática y el método de explante. (Fotografías 11-13)



Fotografía 11. Microfotografía a 100 X. Fibroblastos en semiconfluencia. (Fuente directa)



Fotografía 12. Microfotografía a 100 X. Fibroblastos en confluencia. (Fuente directa)



Fotografía 13. Microfotografía a 100 X. Obtención de fibroblastos gingivales humanos mediante técnica de explante. (Fuente directa)



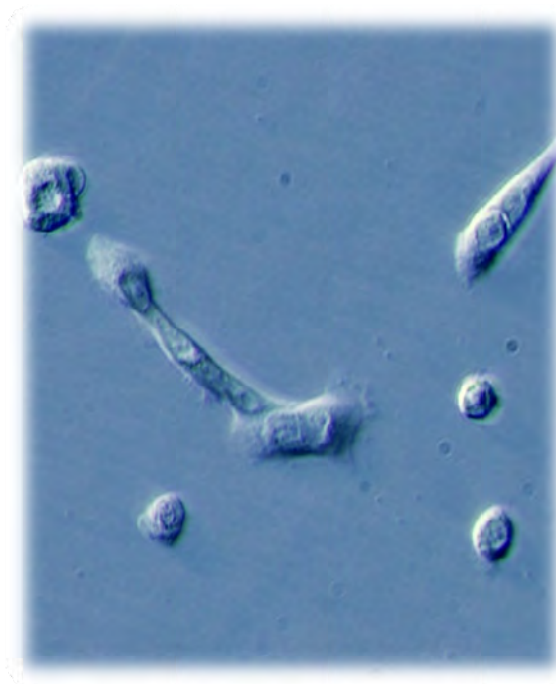
Obtención, cultivo y subcultivo de queratinocitos gingivales humanos.

Los queratinocitos gingivales sembrados sobre colágena porcina tipo I (10 mg/ml) consiguen adherirse y llegar a confluencia, mientras que los no cultivados sobre colágena como sustrato no se adhieren y eventualmente entran en apoptosis, y se pierde el cultivo.

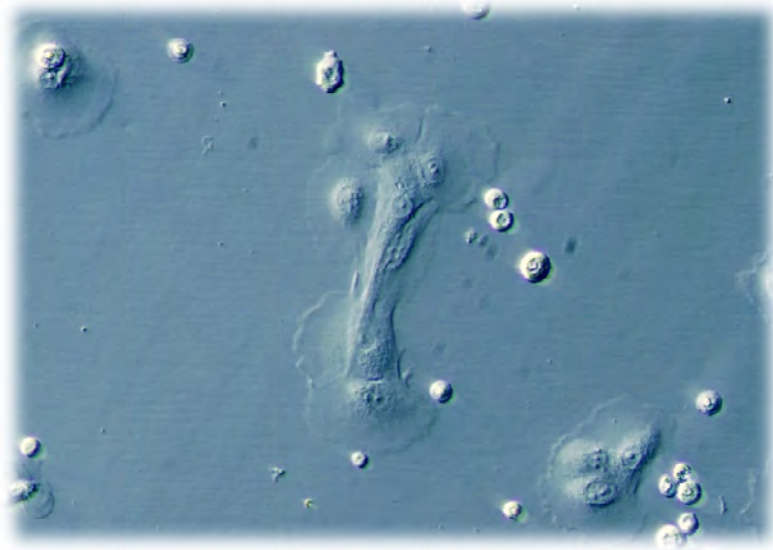
Son células muy sensibles al tratamiento enzimático utilizado para su obtención, por lo cual los tiempos de exposición en este caso a la tripsina, deben ser máximo por 30 minutos, ya que de lo contrario se obtiene una mínima cantidad de queratinocitos viables, evaluada por el método de exclusión de azul de tripano el cual nos permite determinar la viabilidad de las células ya que aquellas que no permiten la entrada del colorante representan células con la membrana intacta, mientras aquellas que lo permiten representan células con una pérdida en la integridad de su membrana.

La separación mecánica del componente epitelial de la biopsia de mucosa oral debe realizarse con sumo cuidado, procurando obtener la cantidad adecuada de tejido epitelial, pues de lo contrario el número de células obtenidas no es el propicio para generar un cultivo primario.

Los queratinocitos llegan a confluencia entre los 11 y 14 días, durante los primeros 7 a 9 días se observan poblaciones de otras estirpes celulares, como fibroblastos y melanocitos, que posteriormente y debido en gran medida al medio de cultivo selectivo para queratinocitos disminuyen.(Fotografía 14-18)



Fotografía 14. Microfotografía a 100x. División celular de queratinocitos gingivales humanos. A un día de cultivo. (Fuente directa)



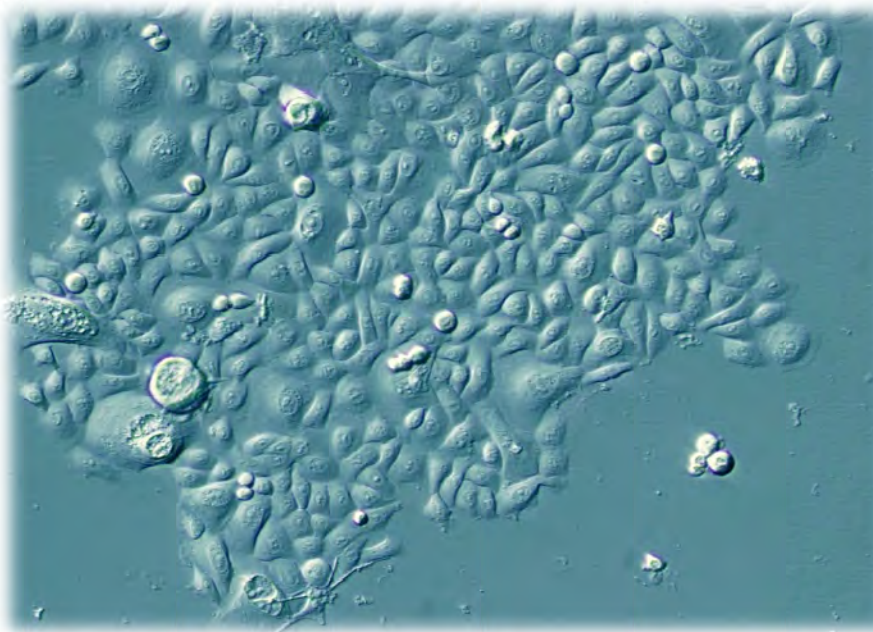
Fotografía 15. . Microfotografía a 100x División celular de queratinocitos gingivales humanos. A 5 días de cultivo. (Fuente directa)



Fotografía 16. Microfotografía a 100x. Queratinocitos gingivales humanos y melanocito. A 7 días de cultivo. (Fuente directa)



Fotografía 17. Microfotografía a 100x Queratinocitos gingivales humanos. A 7 días de cultivo. (Fuente directa)



Fotografía 18. Microfotografía a 100x. Queratinocitos gingivales humanos. A 9 días de cultivo. (Fuente directa)



Una vez adquirida la confluencia celular, al efectuar el subcultivo mediante tripsinización, se observó que las células son extremadamente sensibles no solo al tratamiento enzimático sino también al tiempo de exposición a la tripsina y su manipulación(Fotografía 19-21). Se obtuvo un reducido número de células viables, que dé inicio se creyó poco exitoso, sin embargo dicho número de células fue suficiente para generar un cultivo proliferativo y alcanzarconfluencia nuevamente. (Fotografía 22-25)



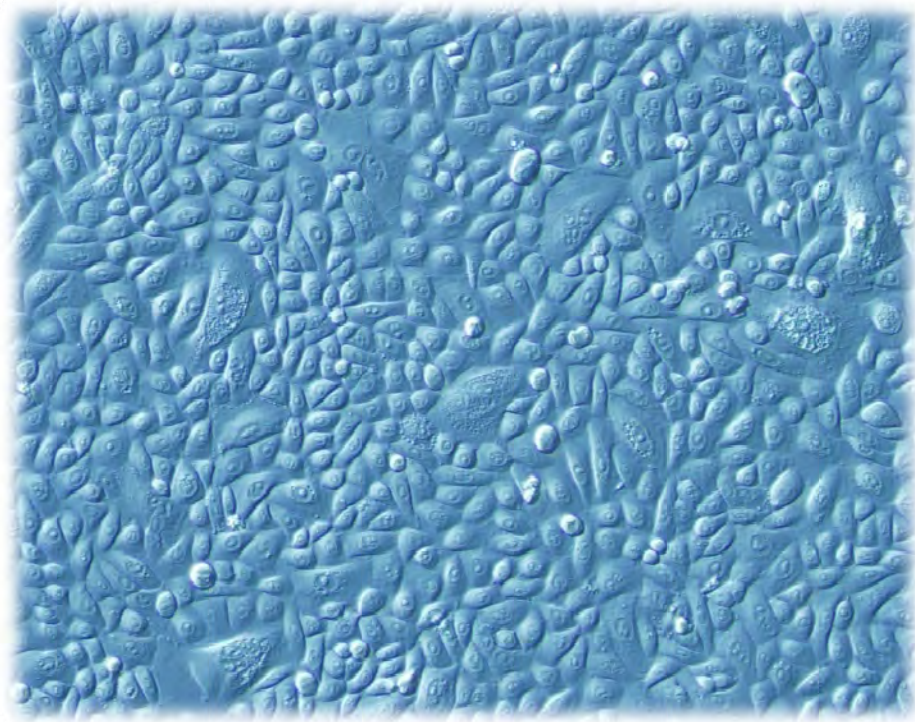


Fotografía 20. Microfotografía a 100x. Queratinocitos gingivales humanos. A 11 días de cultivo. (Fuente directa)

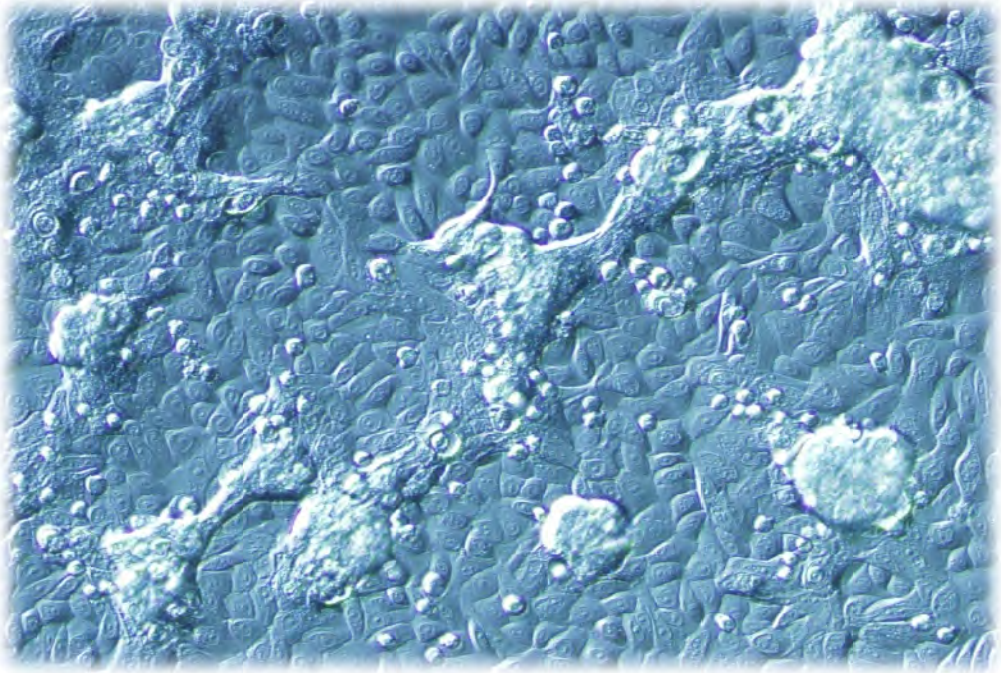




Fotografía 22. Microfotografía a 100x. Subcultivo de queratinocitos gingivales humanos, día 1. (Fuente directa)



Fotografía 23. Microfotografía a 100x. Subcultivo de queratinocitos gingivales humanos, día 16. (Fuente directa)



Fotografía 24. Microfotografía a 100x. Subcultivo de queratinocitos gingivales humanos, día 19. (Fuente directa)



Fotografía 25. Microfotografía a 100x. Subcultivo de queratinocitos gingivales humanos, día 19. (Fuente directa)

Otro de los datos relevantes respecto al subcultivo de queratinocitos, se relaciona con su dificultad para ser contados individualmente, esto debido a sus fuertes interacciones y uniones intercelulares, lo que dificulta su disgregación en células individuales, por lo cual se utilizó una relación volumen-área para así sembrarlos en cada uno de los pozos de acuerdo con las condiciones antes descritas.

Determinación de viabilidad celular en las distintas condiciones de cultivo (Ensayo de MTT).

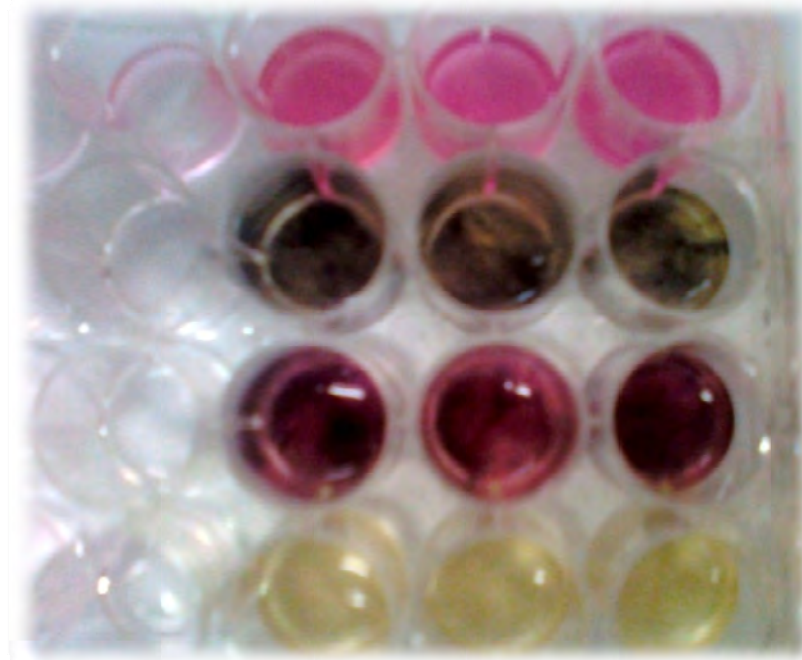
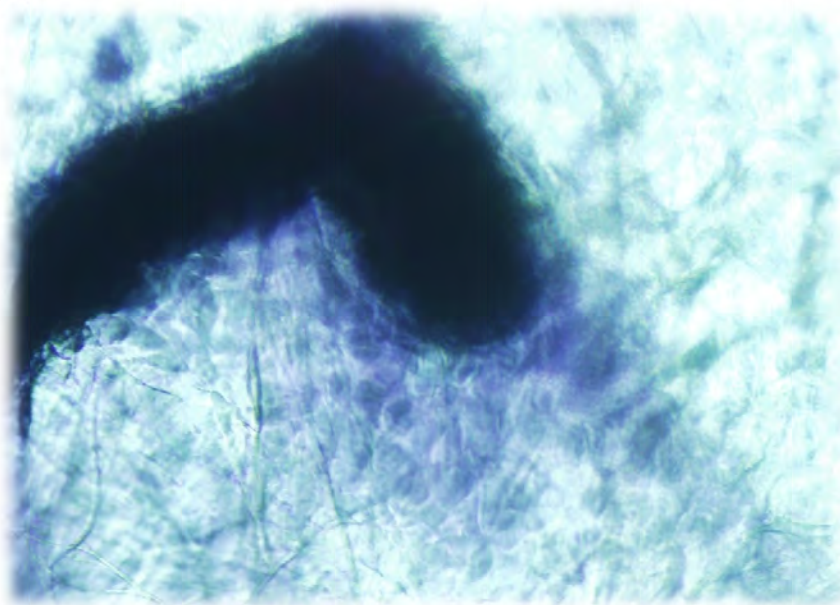


Figura 24. Coloración adquirida, después de las 2 horas de incubación con MTT. (Fuente directa).



Luego de que se agregó la solución de MTT a los pozos y se incubó durante dos horas, se observó la coloración que adquirieron según la actividad metabólica de cada condición (Figura 24). Se advirtió que en el caso de los queratinocitos en monocultivo (D4, D5 y D6) no se produjo metabolismo del MTT a azul de formazán, lo cual nos indicó nula viabilidad celular, mientras que en el caso de pozos con fibroblastos en monocultivo y en cocultivo con queratinocitos sí se pudo ver la formación de azul de formazán compatible con viabilidad celular. De igual forma, las imágenes al microscopio son evidentes en cuanto a la presencia de actividad celular en el caso de membranas con fibroblastos en monocultivo y cocultivo con queratinocitos, mientras que en el caso de las membranas con monocultivo de queratinocitos la certeza de nula viabilidad celular es absoluta. (Fotografías 26-30)



Fotografía 26. Microfotografía a 100x. Cultivo de fibroblastos sobre la membrana fenestrada a las 72 horas. (Fuente directa)

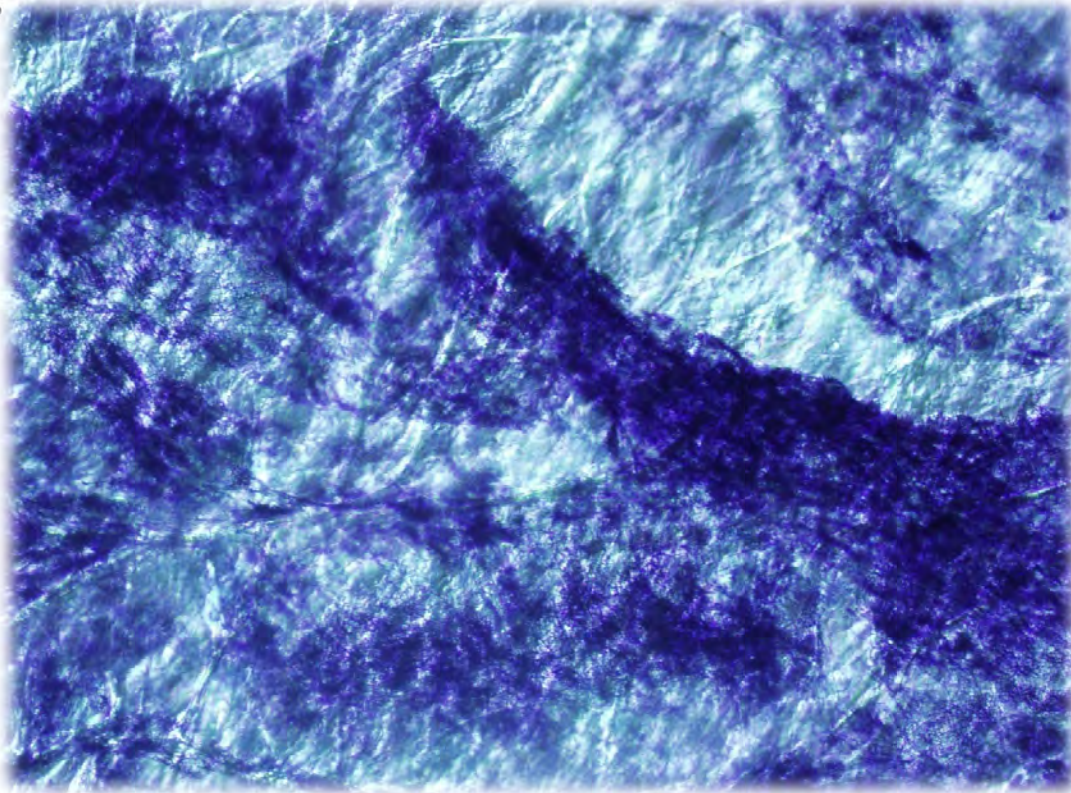


Respecto a la proliferación y supervivencia celular, según los resultados cuantificados a partir de los valores de la absorbencia en densidades ópticas (DO) en un espectrofotómetro y basados en la premisa de que la cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán generado. Se observa una clara proliferación y supervivencia celular en condiciones de monocultivo de fibroblastos y su cocultivo con queratinocitos, incluso más perceptible en el caso de cocultivo, asimismo resulta notorio que en el caso de monocultivo de queratinocitos no se exhiben resultados cuantificables. (Tabla 1)

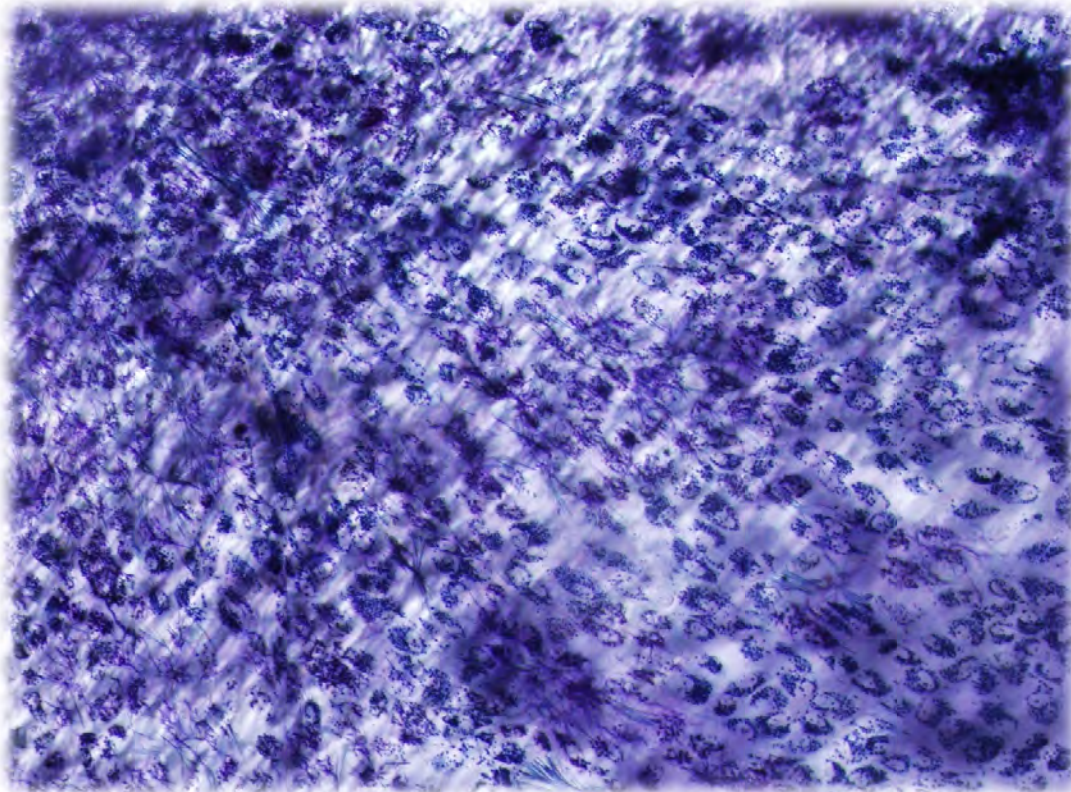
TABLA 1. Valores espectrofotométricos del ensayo de MTT en las condiciones estudiadas.

Línea celular	Absorbencia	Promedio absorbencia
Cocultivo	3.075	2.494* ± 0.55
	2.137	
	2.431	
Fibroblastos	2.557	2.02* ± 0.60
	1.366	
	1.976	
Queratinocitos	ND	ND

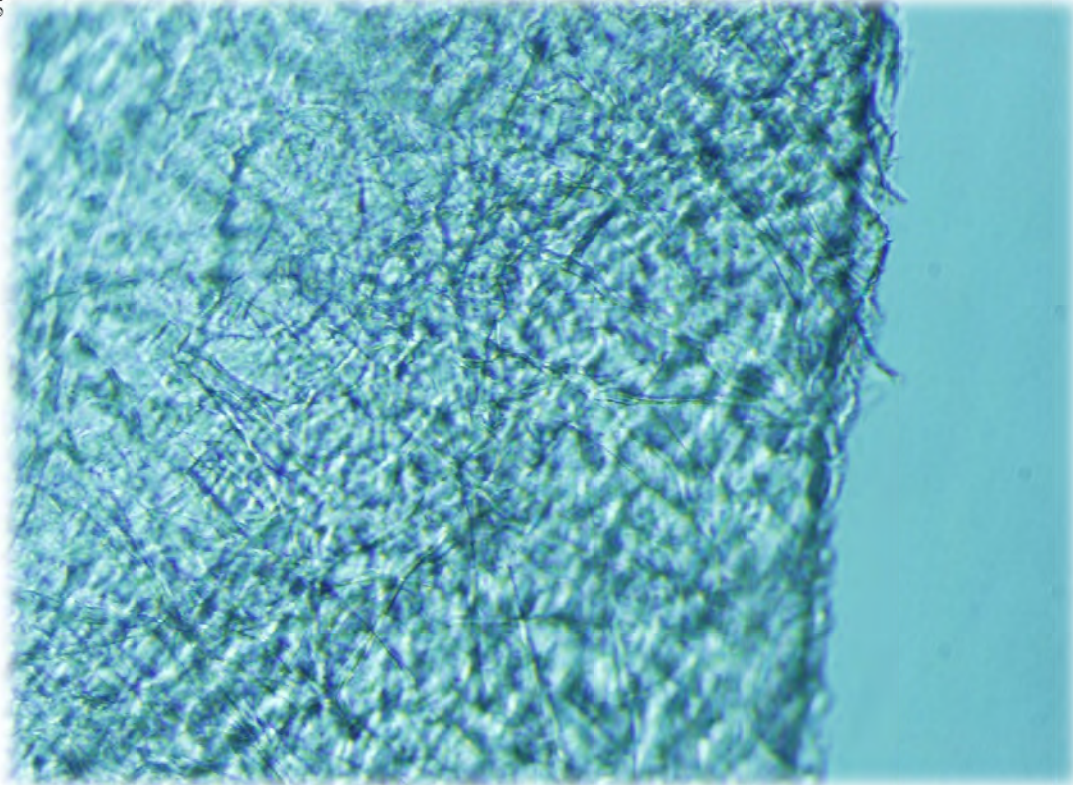
* Al aplicarse la prueba de t de student a los datos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa.



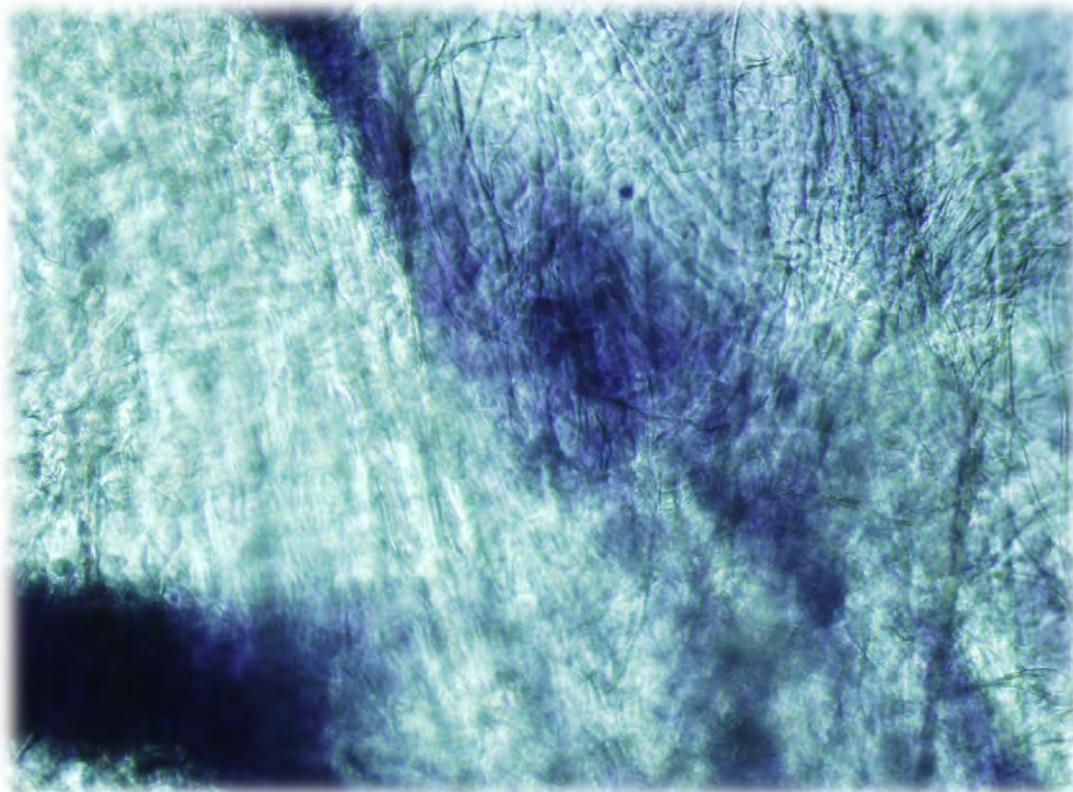
Fotografía 27. Microfotografía a 100x. Cultivo de fibroblastos sobre la membrana fenestrada a las 72 horas. Ensayo MTT. (Fuente directa)



Fotografía 28. Microfotografía a 100x .Cultivo de fibroblastos sobre la membrana fenestrada a las 72 horas. Ensayo MTT. (Fuente directa)



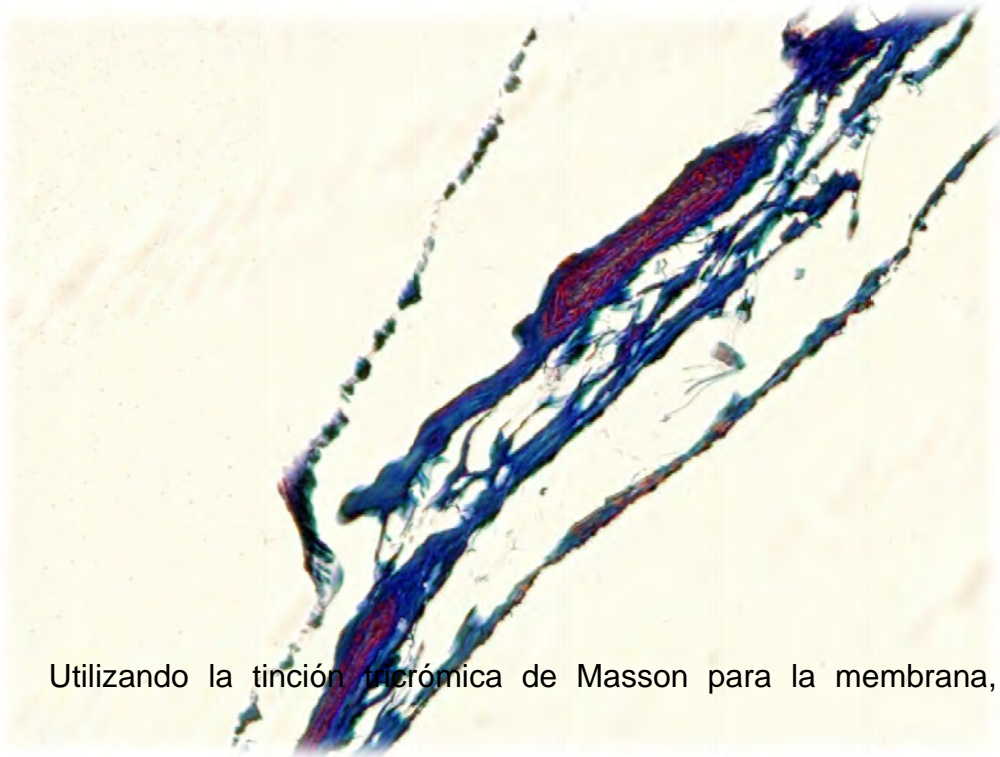
Fotografía 29. Microfotografía a 100x .Cultivo de queratinocitos sobre la membrana fenestrada a las 72 horas. Ensayo MTT. (Fuente directa)



Fotografía 30. Microfotografía a 100x.Cocultivo de fibroblastos y queratinocitos sobre la membrana fenestrada a las 72 horas.Ensayo MTT. (Fuente directa)

Caracterización histológica.

La caracterización histológica se realizó mediante una técnica tintorial estándar que fue la de hematoxilina y eosina (H-E) y una técnica de inmunohistoquímica utilizando un revelado mediante la reacción de peroxidasa; empleando vimentina como marcador para fibroblastos y citoqueratinas para queratinocitos con contraste de hematoxilina, bajo tales condiciones las células se tiñen de un color marrón de acuerdo con el marcador específico utilizado. También se ocupó la tinción tricrómica de Masson, para evaluar las características de la membrana la cual permite visualizar claramente las fibras de colágena, que se tiñen de color azul, de color rojo se tiñe queratina.

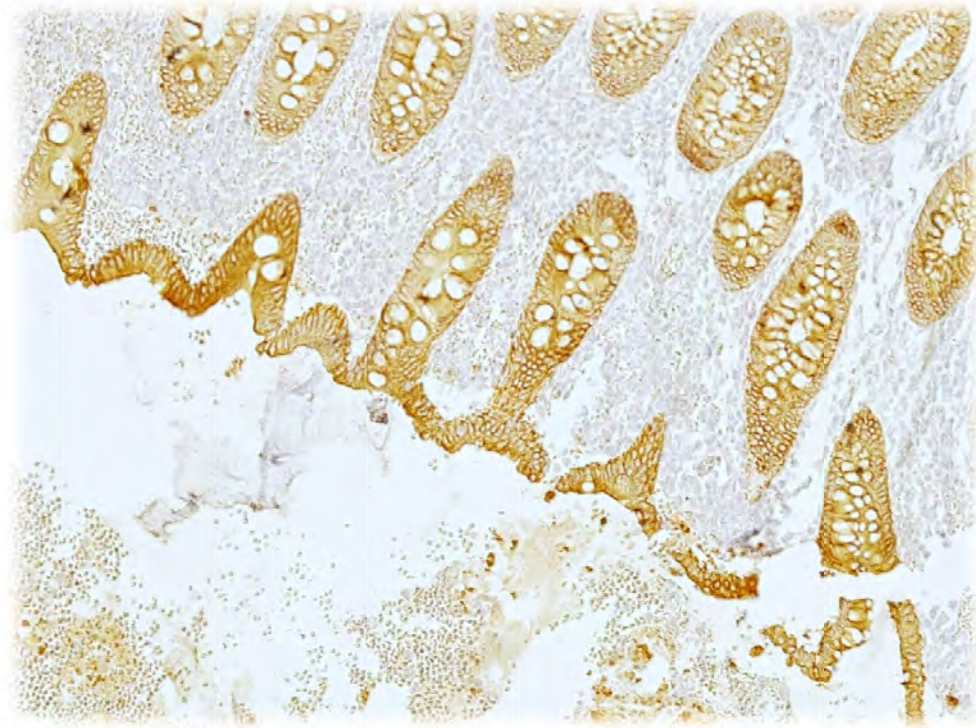


Utilizando la tinción tricrómica de Masson para la membrana, sin

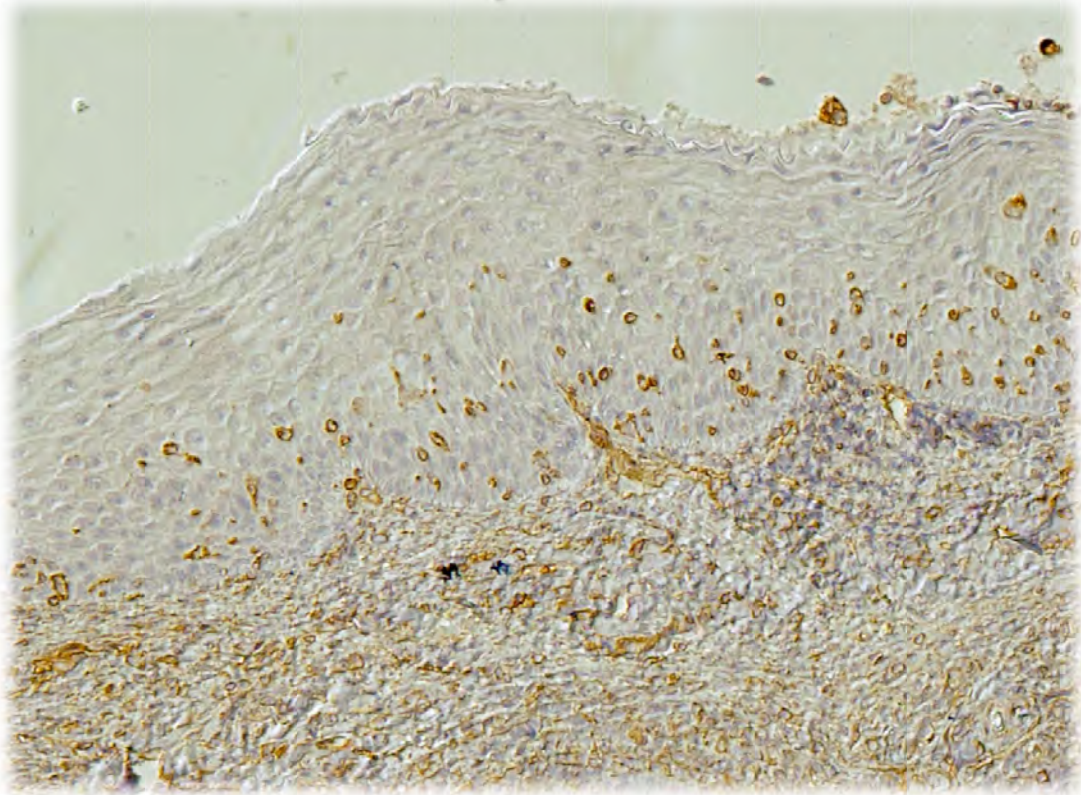
Fotografía 31. Microfotografía a 160x. Membrana. Tinción tricrómica de Masson. (Fuente directa)

células cultivadas, se observó claramente la disposición de colágena y estructuras de matriz extracelular presentes en la misma, igualmente fue evidente la existencia de estructuras compatibles con queratina a lo largo de la membrana de submucosa intestinal de cerdo. (Fotografía 31 y 32).

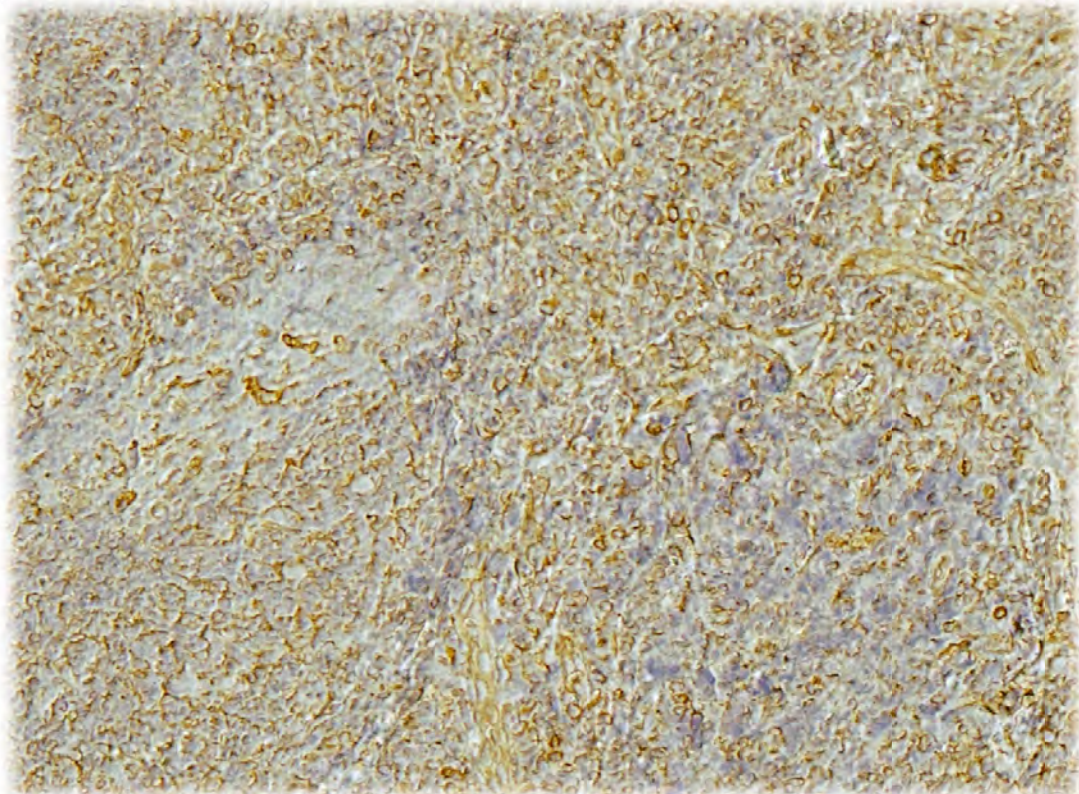
Al teñir fibroblastos cultivados en la membrana, se advierte claramente su disposición en una zona subyacente a una región semejante a la disposición que ocuparía un epitelio. Además se observa su amplia distribución a lo largo de la membrana y su evidente integración en la misma. (Fotografías 33-38)



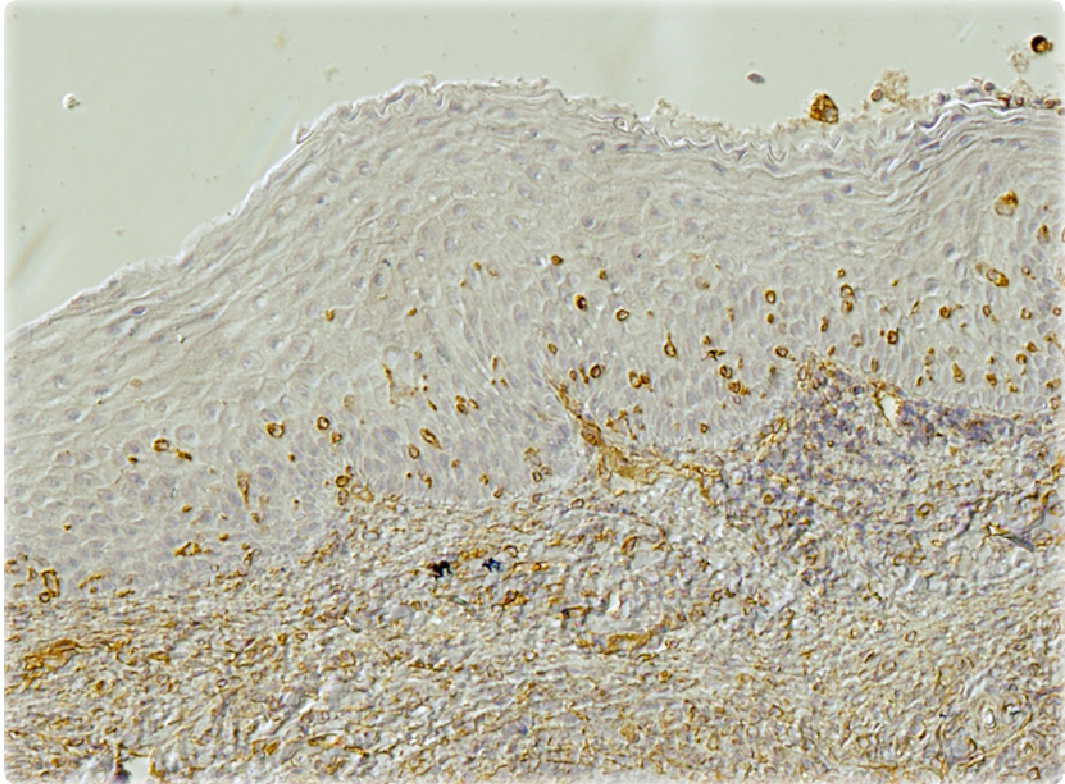
Fotografía 32. Microfotografía a 100x. Membrana. Inmunohistoquímica. Marcador citoqueratinas (Fuente directa)



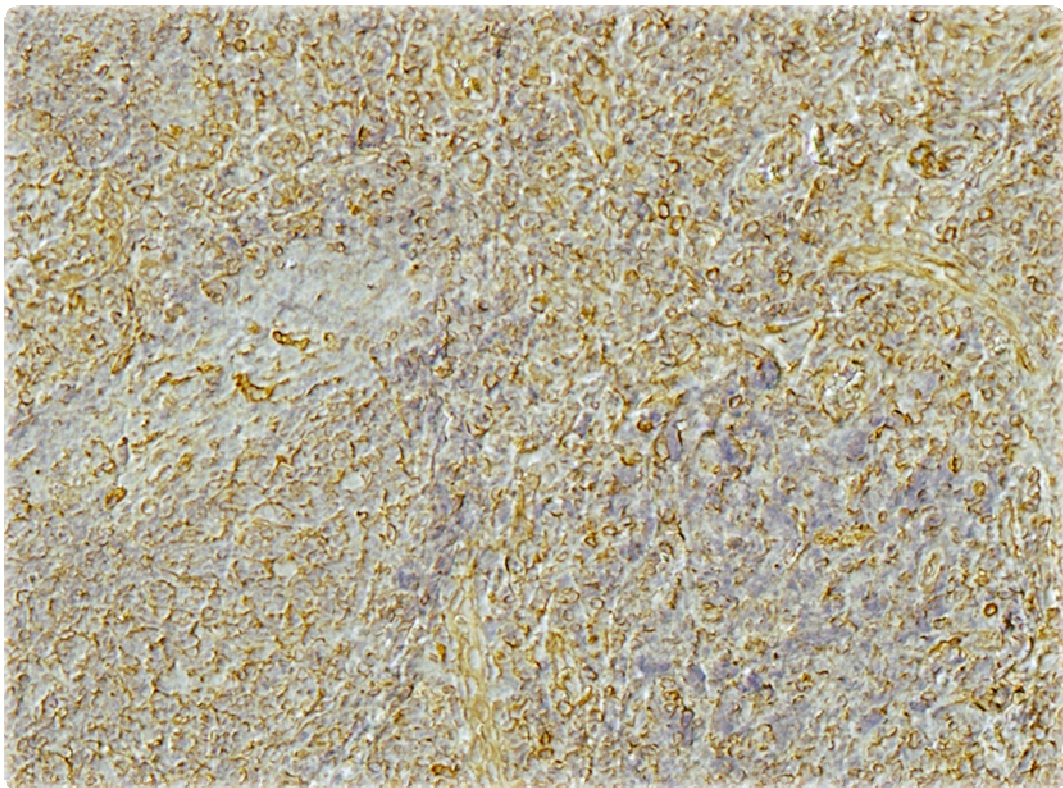
Fotografía 33. Microfotografía a 160x. Inmunohistoquímica. Fibroblastos en membrana (Fuente directa)



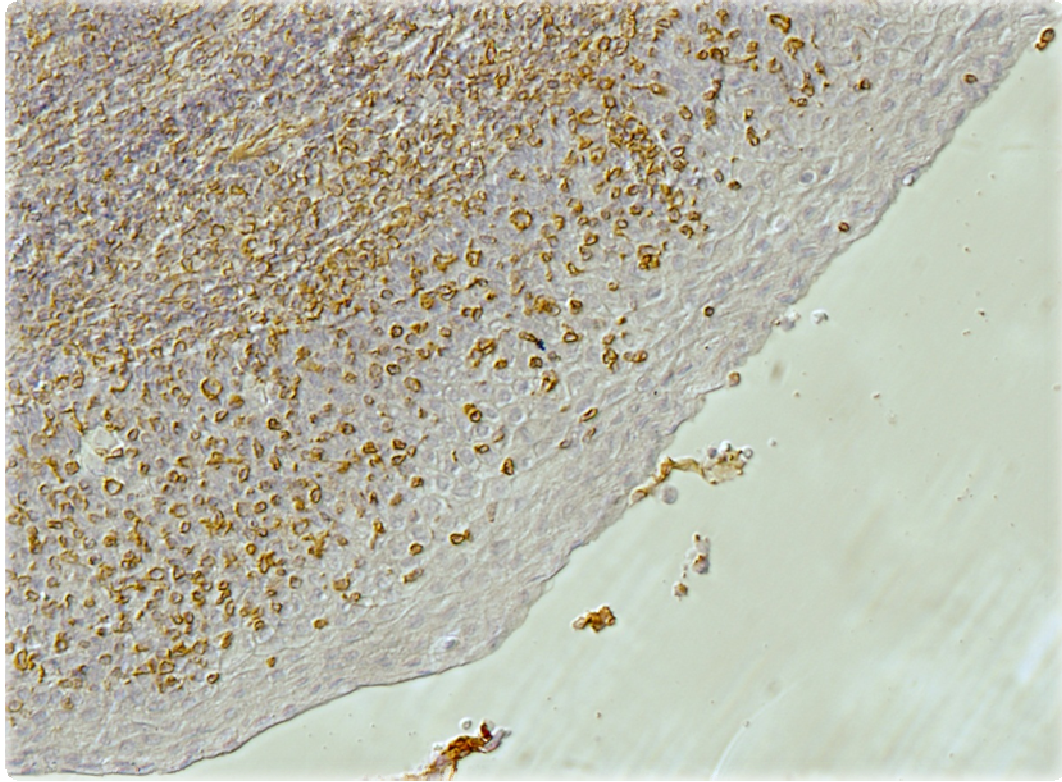
Fotografía 34. Microfotografía a 160x. Inmunohistoquímica. Fibroblastos en membrana. (Fuente directa)



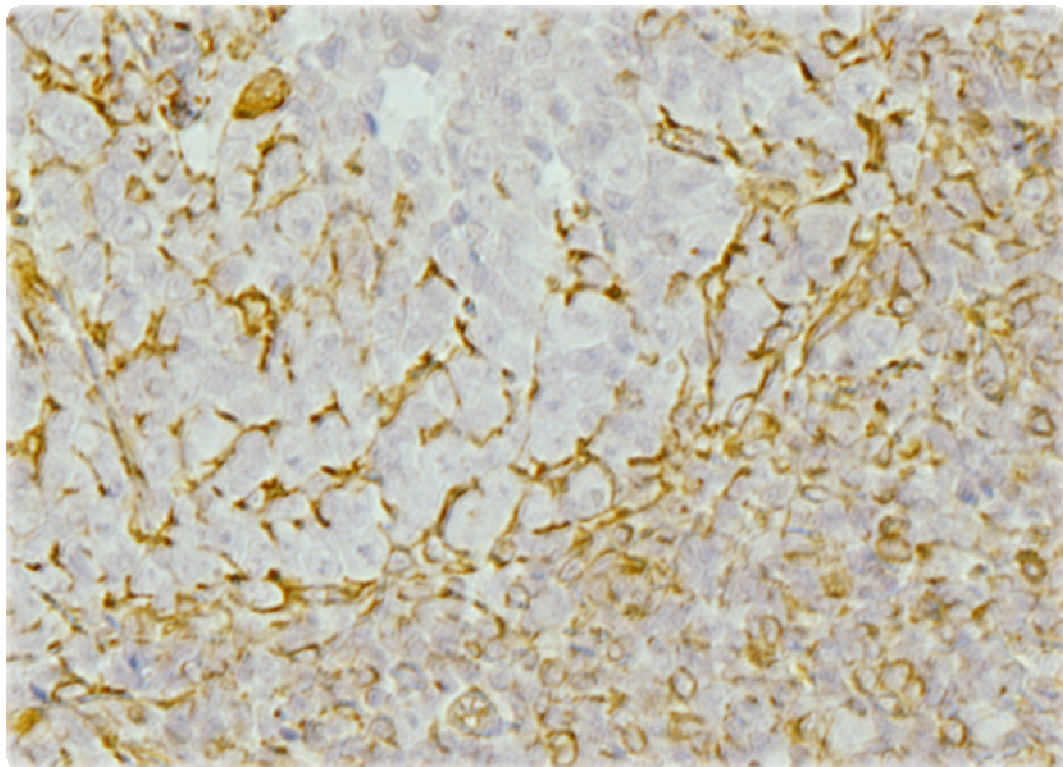
Fotografía 33. Microfotografía a 160x. Inmunohistoquímica. Fibroblastos en membrana (Fuente directa)



Fotografía 34. Microfotografía a 160x. Inmunohistoquímica. Fibroblastos en membrana. (Fuente directa)



Fotografía 35. Microfotografía a 160x. Inmunohistoquímica. Fibroblastos en membrana. (Fuente directa)



Fotografía 36. Microfotografía a 320x. Inmunohistoquímica. Fibroblastos en membrana. (Fuente directa)

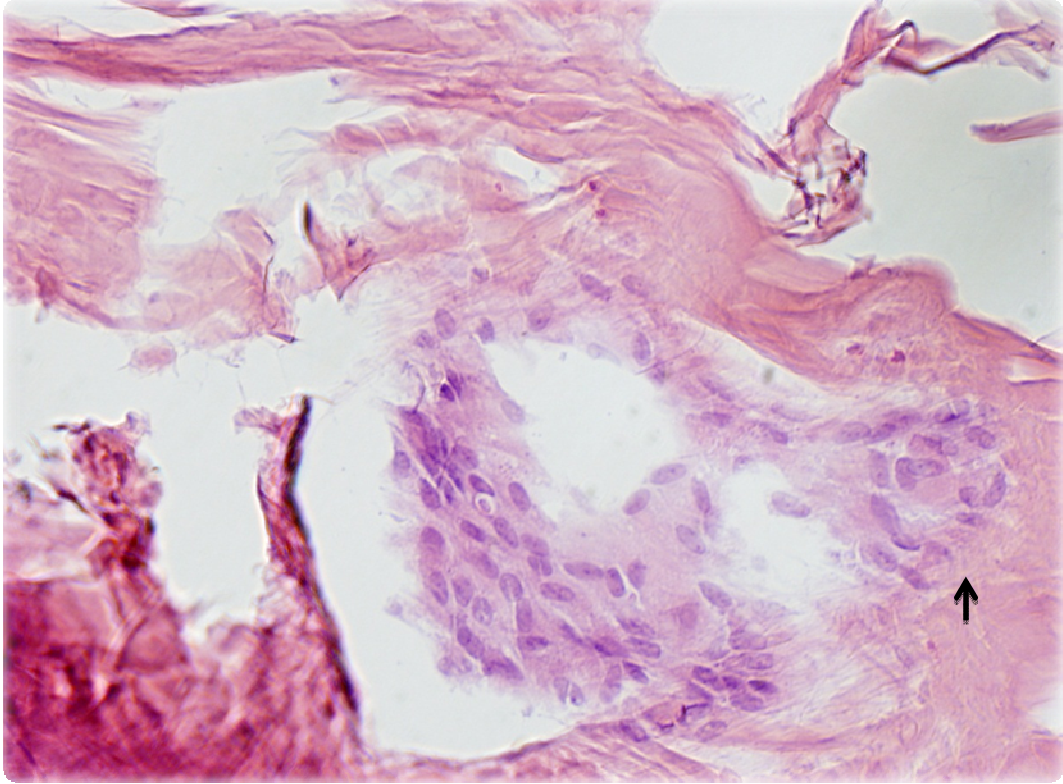
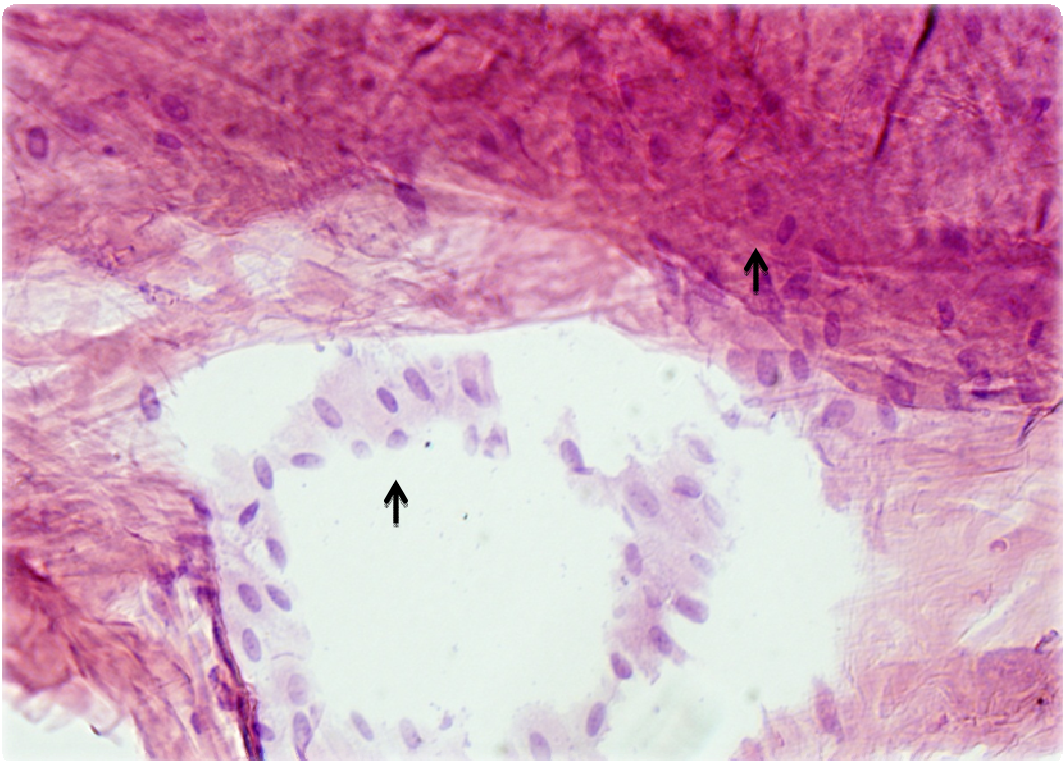


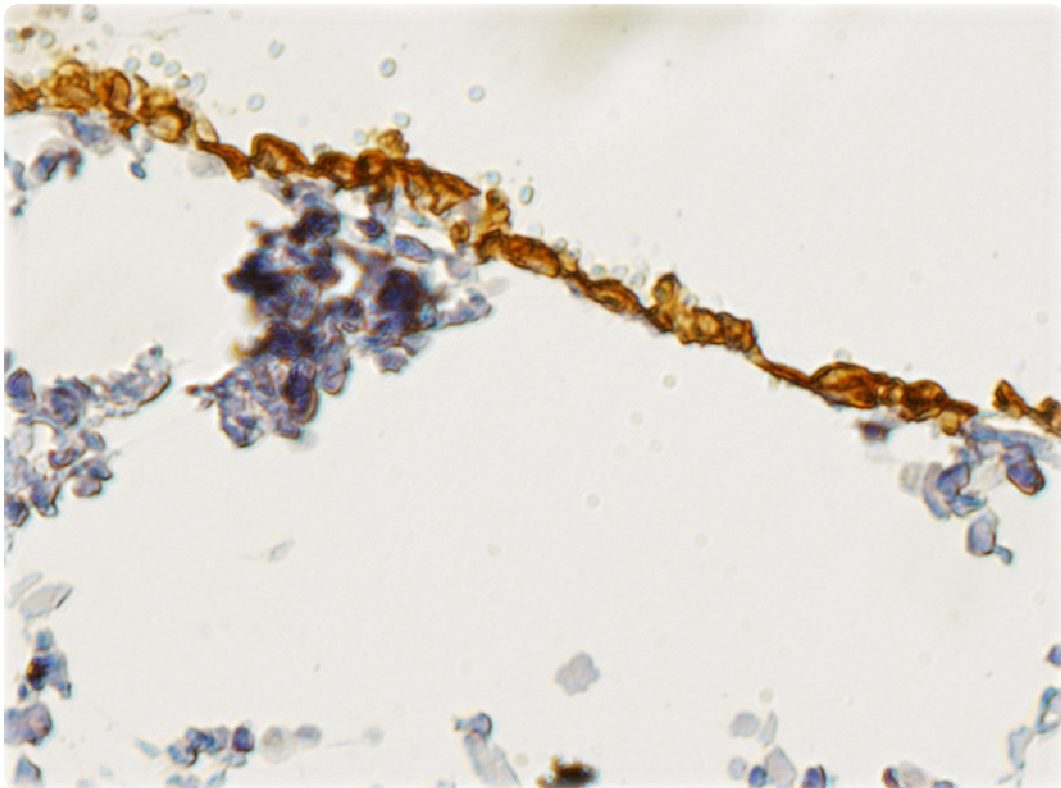
Figura 37. Microfotografía a 200x. H-E. Fibroblastos en membrana. (Fuente directa) La flecha muestra los núcleos teñidos de las células.



Fotografía 38. Microfotografía 200x. H-E. Fibroblastos en membrana. (Fuente directa) La flecha muestra los núcleos teñidos de las células.

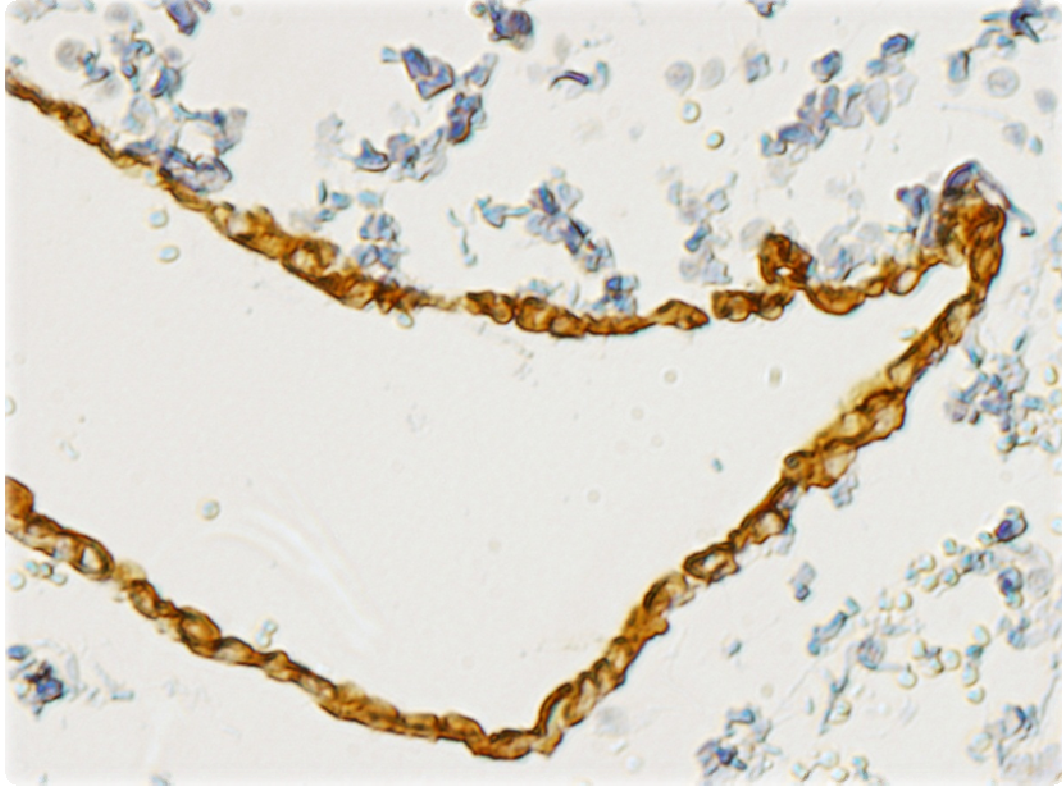


Respecto a los queratinocitos en monocultivo, adoptan una disposición en la parte periférica y superficial de la membrana, característica de esta estirpe celular, además tienden a formar una monocapa y se encuentran generalmente en línea manteniendo una estrecha interacción intercelular. (Figuras 39-41)

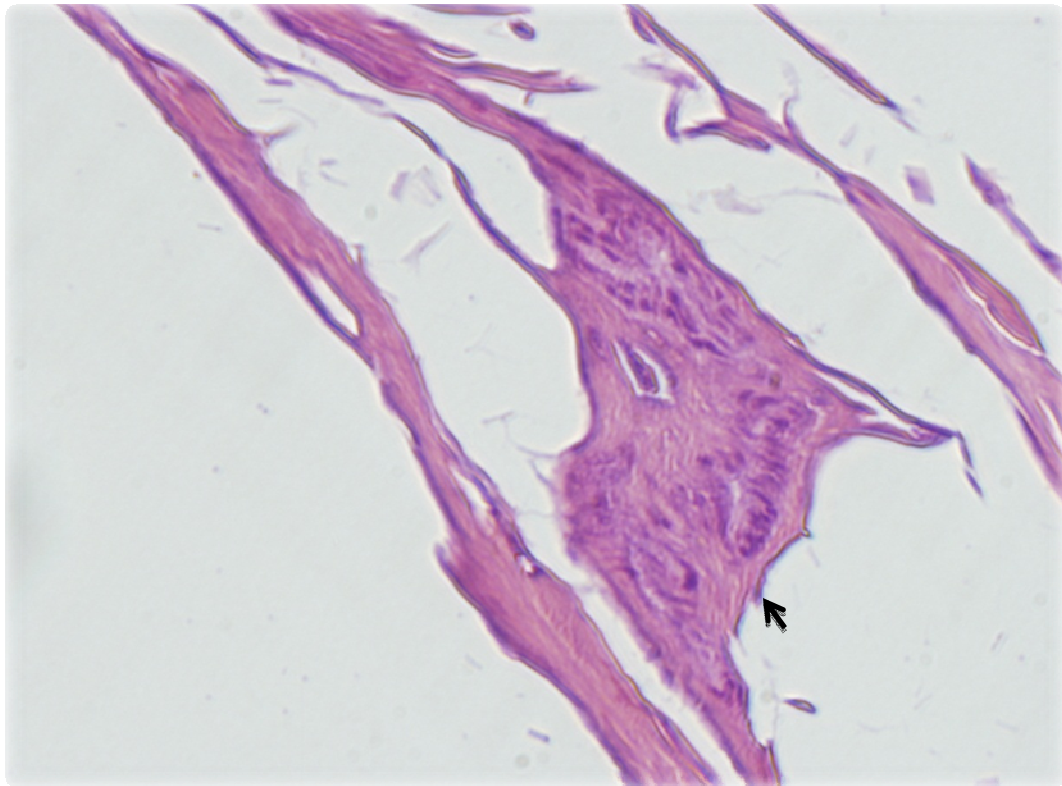


Fotografía 39. Microfotografía 220x. Inmunohistoquímica. Queratinocitos en membrana. (Fuente directa)





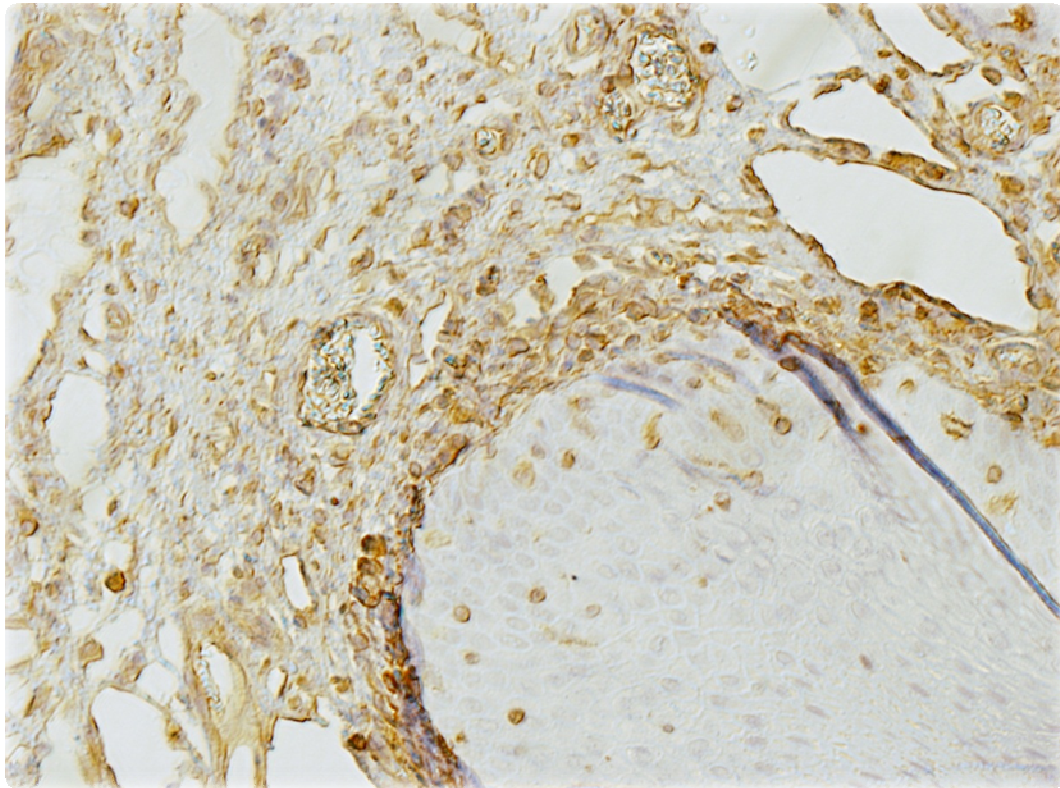
Fotografía 40. Microfotografía 160x. Inmunohistoquímica. Queratinocitos en membrana. (Fuente directa)



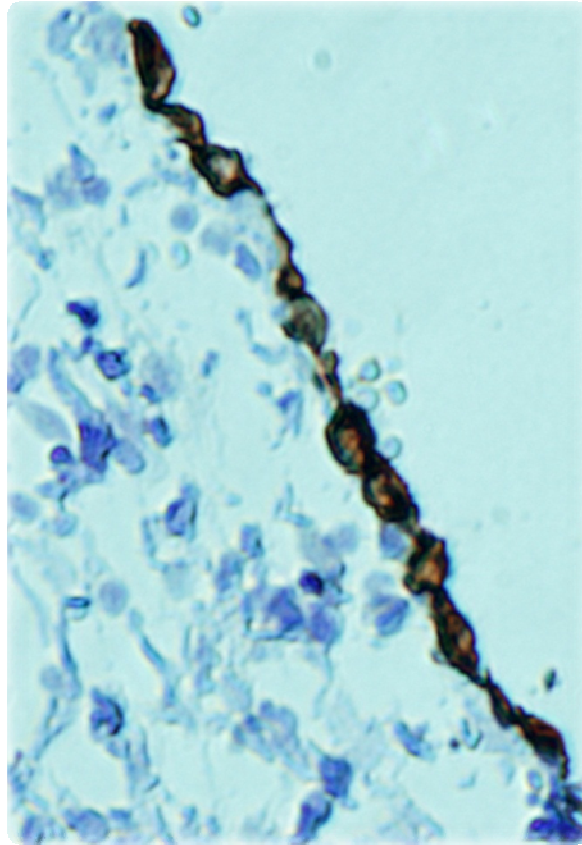
Fotografía 41. Microfotografía 320x. H-E. Queratinocitos en membrana. (Fuente directa) La flecha muestra los núcleos teñidos de las células.



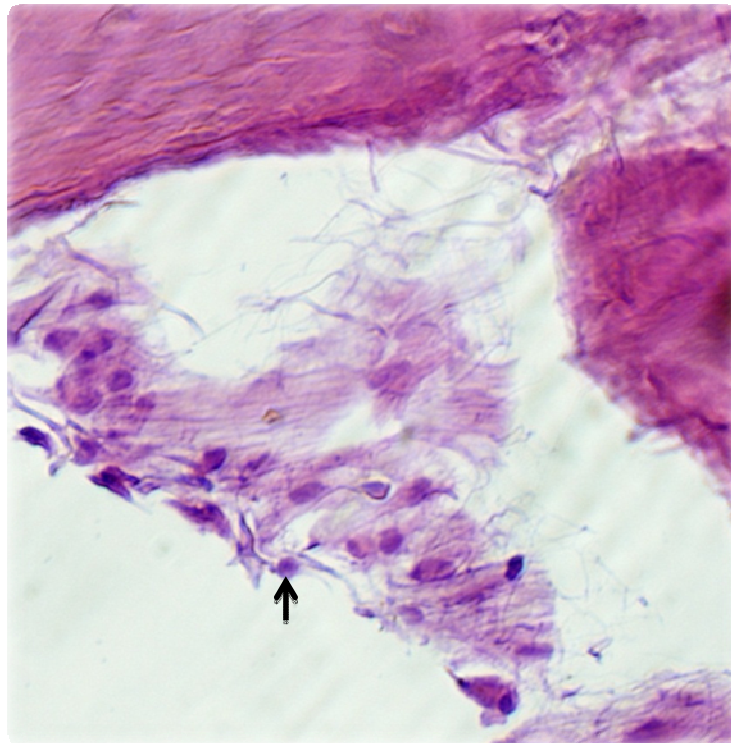
En el caso de presentarse fibroblastos y queratinocitos en cocultivo sobre la membrana de submucosa intestinal de cerdo, se demuestra mayor población celular de ambas estirpes que en monocultivo de cada uno de ellas. Los queratinocitos se ubican en la porción superficial de la membrana mientras que los fibroblastos se integran en la parte central de la misma, como se puede observar en las Figuras 42-45.



Fotografía 42. Microfotografía 100x. Inmunohistoquímica. Cocultivo de fibroblastos y queratinocitos en membrana. Marcador Vimentina. (Fuente directa)



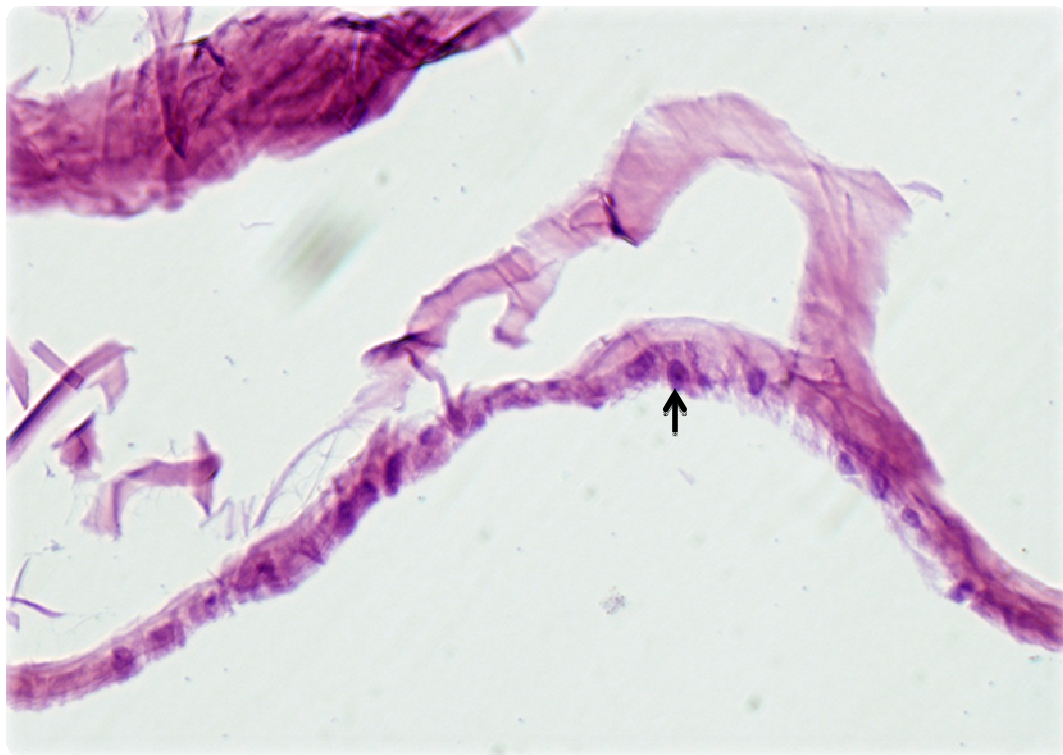
Fotografía 43. Microfotografía 320x. Inmunohistoquímica. Cocultivo de fibroblastos y queratinocitos en membrana. Marcador Citoqueratinas. (Fuente directa)



En

Fotografía 44. Microfotografía 200x. H-E. Cocultivo de fibroblastos y queratinocitos en membrana. (Fuente directa) La flecha muestra los núcleos teñidos de las células.

general bajo la evaluación histológica se muestran imágenes compatibles con queratinocitos y fibroblastos tanto en mono como en cocultivo, además de evidenciar la presencia de queratinas en la membrana de submucosa intestinal de cerdo.



Fotografía 45. Microfotografía 200x. H-E. Cocultivo de fibroblastos y queratinocitos en membrana. (Fuente directa)

La flecha muestra los núcleos teñidos de las células.



9. DISCUSIÓN

Los primeros cultivos *in vitro* de queratinocitos presentaron como inconvenientes, la importante retracción observada al separar el tejido de la botella de cultivo y la extrema delgadez del implante, fruto de su exclusiva constitución epitelial, acentuando así la ausencia de un soporte adecuado para la constitución y diferenciación del tejido epitelial. En este tenor, Ophof y cols.³⁷ reportan que los implantes de mucosa oral generados a partir de ingeniería de tejidos integrados únicamente por queratinocitos son frágiles y difíciles de manipular. Por lo que, distintos autores (PiniPrato y cols.³⁸, Yamada y cols.³⁹, Sun y cols⁴⁰.) proponen el uso de sustratos para el cultivo de queratinocitos, como: ácido hialurónico, colágena tipo III, glicosaminoglicanos y fibrina, entre otros. Basados en esta premisa, se generó el cultivo de queratinocitos sobre colágena porcina tipo I (10mg/ml), obteniéndose resultados favorables en cuanto a la adherencia y proliferación celular.

Considerando que además de cultivar queratinocitos sobre un sustrato bidimensional es necesario realizar el cultivo en andamios tridimensionales, que imiten las interacciones entre células y matriz extracelular, se introduce la aplicación de diversos materiales que semejen la estructura y función de una matriz extracelular, con el fin de producir bioimplantes más parecidos a la mucosa oral y promover la regeneración de la misma. Se han empleado



materiales como; matriz dérmica acelular (Lin Chai⁴¹ y Jhaveri³⁸), poligalactinabioabsorbible (Mc-Guire, Nunn y Wilson)³⁸ y esponjas de colágena recombinante tipo I y III (Yamada³⁹), entre otros. En este estudio, se empleó la membrana de submucosa intestinal de cerdo como matriz para el cultivo de fibroblastos y queratinocitos, probando que dicho material permite la integración, crecimiento y proliferación de ambas estirpes celulares.

Los investigadores que generan cocultivos de queratinocitos con fibroblastos (Mass Szabowski⁴², El-Ghalbzouri⁴³, Costea⁴⁴, Yin-Chau⁴⁵ y McGuire⁴⁶) mencionan que estos últimos producen un amplio espectro de factores de crecimiento, como; KGF (Factor de crecimiento de queratinocitos, por sus siglas en inglés), FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés), TGF- α (Factor de crecimiento transformante α , por sus siglas en inglés), TGF- β (Factor de crecimiento transformante β , por sus siglas en inglés) y GM-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos) todos ellos necesarios y esenciales para aumentar la proliferación de queratinocitos, evitar el cese en su crecimiento y eventual apoptosis, asimismo promueven la generación de componentes de matriz extracelular.

Los resultados obtenidos, manifiestan una modulación dinámica y recíproca entre queratinocitos y fibroblastos. Mostrando que los queratinocitos regulan tanto su propio crecimiento como el de los fibroblastos,



mediante la expresión de sus factores de crecimiento en los fibroblastos adyacentes, permitiendo de esta forma una rápida inducción en la proliferación celular. Coincidiendo así con lo expresado por Wong y cols.⁴⁷, quienes indican que los queratinocitos en monocultivo solo generan una delgada capa epitelial y sin soporte celular subyacente sufren apoptosis, destacando que los fibroblastos incrementan la producción de citocinas y factores de crecimiento que tienen efectos autócrinos y paracrinos. La actividad paracrina de los fibroblastos afecta a los queratinocitos en su crecimiento y diferenciación, generando un circuito recíproco. De esta forma los fibroblastos no sólo producen matriz extracelular y factores de crecimiento, sino que también promueven el óptimo ambiente para la formación de epitelio.

Por su parte PiniPrato y cols.⁴⁸, plantean que no es necesario el cocultivo de fibroblastos con queratinocitos para generar un bioimplante de mucosa oral que forme tejido queratinizado, ya que el proceso de queratinización del epitelio gingival se controla mediante estimulación del tejido conectivo subyacente, sin embargo planteamos que en presencia de ambas estirpes celulares se genera una interacción recíproca que aumenta la proliferación y viabilidad celular, según los datos cuantitativos arrojados por la prueba de MTT.

Monteagudo y cols., proponen el desarrollo de injertos autólogos a partir del cultivo de fibroblastos gingivales en una matriz biológica (membrana



de submucosa intestinal de cerdo) para la cobertura radicular como opción en el tratamiento de recesiones gingivales³¹. En este trabajo también se utilizó la membrana de submucosa intestinal de cerdo como matriz no sólo para el cultivo de fibroblastos sino también de queratinocitos gingivales, con la finalidad de obtener un bioimplante con mejores características biológicas y que imite de forma fiel y puntual la mucosa oral, optimizando así resultados en cuanto a la regeneración de tejido queratinizado.

El estudio desarrollado *in vitro* permitió conocer el comportamiento, viabilidad y disposición de ambos tipos celulares sobre la membrana, por lo que se esperan futuros ensayos siguiendo la presente línea de investigación que eventualmente arrojen resultados que permitan la aplicación del bioimplante en el tratamiento de defectos mucogingivales.

10. CONCLUSIONES



En conclusión se demuestra que para lograr un estado de balance en el crecimiento celular, la matriz utilizada (membrana de submucosa intestinal de credo) debe ser poblada por un número óptimo de fibroblastos previo cultivo de queratinocitos. Asimismo, se indica que la manipulación enzimática y mecánica de queratinocitos debe efectuarse cuidadosamente bajo un control estricto del tiempo de exposición a la digestión enzimática. También, se destaca la importancia de un sustrato como la colágena porcina tipo I para el cultivo y adherencia de queratinocitos, se recomienda para futuros ensayos ocupar como sustrato colágena tipo IV, la cual al ser específica de lámina basal puede generar mejores resultados.

Subrayando que los fibroblastos juegan un papel crucial en la proliferación y crecimiento de queratinocitos *in vitro*; nuestros datos sugieren que los fibroblastos poseen un mecanismo que modula la proliferación de queratinocitos.

Se demuestra que los fibroblastos tienden a distribuirse a lo largo de la membrana mientras que los queratinocitos permanecen en la porción superior de la misma formando monocapa.



Como hallazgo destacamos el hecho de que es evidente la presencia de citoqueratinas en la membrana de submucosa intestinal de cerdo, que se evidencia en la caracterización histológica, lo cual resulta importante pues en los componentes referidos por el fabricante no se menciona la existencia de dichas proteínas, que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto de células epiteliales.

Sugerimos, la realización de nuevos ensayos en los cuales se perfeccione la técnica de subcultivo de queratinocitos gingivales y se experimente con diferentes sustratos para su cultivo.

Además se busca aplicar clínicamente el bioimplante integrado por queratinocitos y fibroblastos gingivales sobre una membrana biológica segura y capaz de imitar la mucosa oral, el cual no sea considerado sólo como un injerto de reemplazo tisular sino como una terapia de trasplante celular autólogo que fomente la regeneración del defecto a partir de la interacción entre células implantadas y las del sitio receptor. En caso de que los pacientes necesiten múltiples injertos de mucosa oral y la cantidad de tejido donador disponible sea insuficiente para cubrir tales necesidades.



11. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Taba Jr M, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:292-302



2. Baum B, Mooney D. The impact of tissue engineering on dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:309-318
3. <http://www.cookbiotech.com/technology.php>
4. Slavkin C. Harold, Mark Bartold P. Challenges and potencial in tissue engineering. *Periodontology* 2000.2006;41: 9-15.
5. Samir Alejandro Bello, Julieta Peña, Luz Eliyer Estrada, Marta Raquel Fontanilla. Sustitutos de mucosa oral creados mediante ingeniería tisular: una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral. *Revista CES Odontología.* 2001; 14 (1):55-64.
6. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermalkeratinocytes: theformationof keratinizingcoloniesfrom single cells. *Cells.* 1975; 6:331-344.
7. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.* 4° ed. US. Wiley-Liss.2000.
8. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Multimedia Guide.*4° ed. US. Wiley-Liss. 2000.
9. Taichman L, Sciubba J, ChoMI. Maturation of human gingival keratinocytes cultured with fibroblasts from keratinizing and non-keratinizing epithelia. *Archs. Oral Biol.* 1982; 27:355-359.



-
10. Izumi K., Takacs G, Terashi H, Feinberg SE. Ex vivo development of a composite human oral mucosa equivalent. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 57:571-577.
 11. Rhee PH, Friedman CD, Ridge JA, Kusiak J. The use of processed allograft dermal matrix for intraoral resurfacing. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124: 1201-1204.
 12. Tomakidi P, Fusening NE, Kohl A, Komposch G. Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells. *J Periodont Res.* 1997; 32: 388-400.
 13. Odioso LL, Doyle MJ, Quinn KW, Zimmer MP, Stevens-Burns D. Development and characterization of an in vitro gingival epithelial model. *J Periodont Res.* 1995; 30:210-219.
 14. Jayme DW. Alternatives to fetal bovine serum for mammalian cell culture. *Focus.* 1990; 12:3-8
 15. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res.* 2000; 79(3):798-805
 16. Feinberg SE, Krishnan V, Gordillo G, Shuler Ch. Intraoral grafting of canine full-thickness oral mucosa equivalent produced in vitro. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47:712-718



17. Sugimura Y, Hata K, Torii S, Ueda M. Transplantation of cultured mucosal epithelium: an experimental study. *J Cranio Maxillofac Surg.* 1997; 24: 352-359
18. Ophof R, Van Rheden, Von den Hoff JW, Schalkwijk J, Kuijpers-Jagtman AM. Oral keratinocytes culture on dermal matrices form a mucosa-like tissue. *Biomaterials.* 2002; 23:3741-3748
19. Langdom JD, Leigh IM, Navsaria AH, Williams DM. Autologous oral keratinocyte grafts in the mouth. *The Lancet.* 1990; 35:1472-1476
20. De Luca M, Albanese E, Megna M. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted to patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplantation.* 1990; 50:454-459
21. Lauer G. Auto grafting of feeder-cell free cultured gingival epithelium: method and clinical application. *J Cranio Maxillofac Surg.* 1994; 22:18-22.
22. Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blaauw EH, Wutjes MJ, Vissink A. Use of cultured mucosal graft cover defects caused by vestibuloplasty: An in vivo study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53:872-878
23. Omura S, Mizuki N, Horimoto S, Kawabe K, Fujita K. A newly developed collagen/silicone bilayer membrane as a mucosal substitute: a preliminary report. *Oral Maxillofac Surg.* 1997; 35:85-91



-
24. Tsai CH, Ueda M, Hata KI, et al. Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the Oral and Maxillofacial region. *J Cranio Maxillofac Surg.* 1997; 25:4-8
 25. Ueda M, Hata Ki, Sumi Y, Mizuno H, Niimi A. Peri-implant soft tissue management through use of cultured mucosal epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod.* 1998;86:393-400
 26. Sumi Y, Hata KI, Sawaki Y, Mizuno H, Ueda M. Clinical application of cultured oral epithelium for palatal wounds after palatoplasty: a preliminar report. *Oral Dis.* 1999; 5(4): 307-312
 27. Bodner Lipa, Grossman Nili. Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: a clinical study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61:169-173
 28. Izumi K, Feinberg SE, A, Yoshizawa M. Intraoralgrafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminaryreport. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 32:188-197
 29. Hotta T, Yokko S, Terashi H, Komori T. Clinical and histopathological analysis of healing process of intraoral reconstruction with ex vivo produced oral mucosa equivalent. *J Med Sci.* 2007;53(1): 1-14
 30. González S, Junquera LM, Peña I, García V, Gallego L, García E, Meana A. Cultivo in vitro con colágeno y fibroblastos humanos de un



equivalente de mucosa oral de espesor total. Rev Esp Cir Oral y Maxillofac. 2009;31(2):98-106

31. Monteagudo C, Marín M, Enríquez F, Penilla I, Krötzsh 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
32. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Finlandia; 1964
33. Soto Sánchez Víctor Manuel. 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 [tesina]. México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2009
34. <http://www.lonzabio.com>
35. Kim E, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung H-S, Lee SJ, An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. Oral Dis. 2007;13(5):495-499
36. Abbas Abul K, Lichtman H. Andrew, PillaiShiu. Inmunología celular y molecular. 6° ed. España: Elsevier Saunders;2008



-
37. Ophof Ricardo, Martha C Jaap, Kuijpers-Jagtman Anne Marie, Von den Hoff W Johannes. Implantation of tissue-engineer mucosal substitutes in the dog palate. *Eur J Orthodont*. 2008; 30: 1-9
38. Jhaveri M Hiral, Chavan S Mahesh, Tomar B Geetanjali, Deshmukh L Vijay, Wani R Mohan, Miller D Preston Jr. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: a proof-of-concept study. *J Periodontol*. 2010; 81: 616-625
39. Yamada Kazuto, Yamaura Junji, Katoh Masakazu, Hata Ken-ichiro, Okuda Kazuhiro, Yoshie Hiromasa. Fabrication of cultured oral gingival by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol*. 2006; 77: 672-677
40. Sun Tao, Haycock John, MacNeil Sheila. In situ image analysis of interactions between normal human keratinocytes and fibroblasts cultured in three-dimensional fibrin gels. *Biomaterials*. 2006; 27: 3459-3465
41. Lin Chai Wen, Moharamzadeh Keyvan, Brool Michael Ian, Emanuelsson Lena, Palmquist Anders, Noort van Richard. Development of a Novel Model for the investigation of implant-soft tissue interface. *J Periodontol*. 2010; 81: 1187-1195
42. Maas-Szabowski, Shimotoyodome Akira, Fusenig Norbert E. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci*. 1999; 112: 1843-1853



-
43. El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Brit J Dermatol.* 2002; 147:230-243
44. Costea Daniela Elena, Loro Lado Lako, Dimba Okumo Anne Elisabeth, Vintermyr Karsten Olav, Johannessen Christine Anne. Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium. *J Invest Dermatol.* 2003; 121: 1479-1486
45. Huang Yi-Chau, Wang Tzu-Wei, Sun Jui-Sheng, Lin Feng-Huei. Investigation of mitomycin-C-treated fibroblasts in 3-D collagen gel and conditioned medium for keratinocyte proliferation. *Artif Organs.* 2006; 30(3): 150-159
46. McGuire Michael K, Scheyer E. Todd, Nunn E. Martha, Lavin T. Philip. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol.* 2008; 79: 1847-1856
47. Wong T, Mc Grath J.A, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Brit J Dermatol.* 2007; 156:1149-1155
48. Pini Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20: 553-559)



-
49. Pini Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F.
An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival
augmentation: A case series. *J Periodontol.* 2003; 74: 262-267