



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

**TÍTULO:
Efectos del quitosano en cultivos celulares para
odontología regenerativa**

**FORMA DE TITULACIÓN:
Tesis de investigación**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA**

P R E S E N T A:

Narvaez Flores Jessica Joseline



TUTOR: Dr. Rene García Contreras

ASESOR: Mtra. Gabriela Vilar Pineda

León, Guanajuato; 2017.



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.

Agradecimientos

Expreso mi total agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formarme como profesionista en su máxima casa de estudios; de la misma manera doy mi entero reconocimiento a la Licenciatura en Odontología de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León de la UNAM, por otorgarme el apoyo incondicional desde el inicio hasta el final de mi formación académica, con los recursos y espacios necesarios para poder desarrollarme y realizar mi trabajo de investigación terminal.

Agradezco el apoyo del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT-IN225516, PAPIIT-IA204516, y PAPIIME-PE210616; en la adquisición de materiales e insumos para llevar a cabo mi investigaciones.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis profesores y asesores del Laboratorio de Biomateriales Dentales de la ENES León, en el área de investigación a la Dra. Laura Acosta-Torres y a la Dra. Concepción Arenas- Arrocena, por su apoyo constante e incondicional en esta etapa; en el área de Cirugía Oral y Maxilofacial a la Mtra. Gabriela Vilar-Pineda quien fungió como si asesor y apoyo importante en esta investigación y desarrollo profesional, así como al Mtro. Javier de la Fuente-Hernández, quien como director de la ENES León y persona me inspiro confiando en mi para lograr terminar mi carrera profesional.

Un especial agradecimiento al Dr. Rene García-Contreras, quien me brindo a lo largo de este proyecto su apoyo, paciencia, y conocimiento en el área de investigación impulsando mis habilidades, así como su apoyo como tutor en la elaboración de esta tesis.

Dedicatorias

Dedico este trabajo terminal especialmente a Dios y a mi familia, mi madre Rosa Flores, mi padre Martin Narváez, mis hermanas Yessenia, Estrella y Yadira, quienes sin su apoyo, su amor y sus palabras hubiera sido imposible cumplir este sueño, por hacerme creer en mí y saber que podía lograrlo; sin dejar de mencionar al amor de mi vida, mi esposo Daniel de la Cruz; quien me brindo todo su apoyo, paciencia, amor y tiempo en esta etapa de retos, a pesar de las adversidades.

A todos ellos, muchas gracias!

ÍNDICE

<u>1. Resumen</u>	5
<u>2. Introducción</u>	6
<u>3. Marco Teórico</u>	8
3.1 Antecedentes	8
3.1.1 Ingeniería tisular y regenerativa.....	9
3.1.2 Fibroblastos gingivales humanos (HGF).....	10
3.1.3 Pulpa y células pulpares humanas (HPC)	11
3.1.4 Osteoblastos	15
3.1.5 Osteoblastos de ratón (MC3T3-E1).....	16
3.1.6 Quitosano	17
3.1.7 Cultivos celulares	19
3.1.8 Historia de los cultivos celulares.....	19
3.1.9 Interleucinas/IL-1 β	21
3.1.10 Inflamación y expresión de prostaglandina E2.....	22
<u>4. Planteamiento del problema</u>	26
4.1 Pregunta de investigación.....	26
<u>5. Justificación</u>	27
<u>6. Objetivos</u>	29
6.1 Objetivo general	29
6.2 Objetivos específicos.....	29
<u>7. Hipótesis</u>	30
7.3 Hipótesis de investigación	30
7.4 Hipótesis nula.....	30
<u>8. Metodología</u>	31
8.1. Muestra y universo de estudio.....	31
8.2 Criterios de selección	31
8.5 Implicaciones bioéticas	37
8.6 Materiales y métodos.....	39
8.6.1 Autorización y obtención de la muestra	39
8.6.2 Cultivo Celular.....	39
8.6.3 Subcultivo Celular.....	40
8.6.4 Preparación del Quitosano al 1%.....	40
8.6.5 Viabilidad celular (Curva dosis-respuesta)	41
8.6.6 Efectos de las Gelatinas Hemostáticas Spongostand® con Quitosano	42
Preparación del Quitosano al 0.19%.....	42

Pruebas de viabilidad celular con Spongostand®	42
8.6.7 Actividad pro-inflamatoria del quitosano en cultivo con HGF	43
8.7 Análisis estadístico y representación de los datos	45
<u>9. Resultados</u>	46
9.1 Viabilidad celular en HGF, HPC y MC3T3-E1 en contacto con quitosano a diferentes concentraciones.....	46
9.2 Viabilidad celular en HGF y HPC con quitosano 0.19% (CON andamios de gelatina Spongostand®)	47
9.3 Efectos pro inflamatorios del HGF con IL-1 β /PGE ₂	48
<u>10. Discusión</u>	50
<u>11. Conclusiones</u>	53
<u>12. Bibliografía</u>	54
<u>13. Anexos</u>	59

1. Resumen

El quitosano es un biopolímero con efecto bactericida/bacteriostático, biodegradable, bioactivo y biocompatible; utilizado en la ingeniería de tejidos. Su uso tiene potenciales aplicaciones en medicina y odontología regenerativa. **Objetivo:** Evaluar los efectos citotóxicos y proinflamatorios del quitosano solo y con gelatina-hemostática en cultivo de células pulpares humanas (HPC), fibroblastos gingivales humanos (HGF) y osteoblastos de ratón (MC3T3-E1). **Material y Métodos:** HPC, HGF y MC3T3-E1 fueron subcultivadas (1:3) en DMEM+10% de suero fetal bovino e incubadas durante 48 hrs a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. El quitosano a diferentes concentraciones (0-0.5%) y las gelatinas-hemostáticas impregnadas con quitosano (0.19%) fueron incubados durante 24 horas en contacto con las células. La viabilidad celular fue determinada con el método de MTT, el formazán fue disuelto con dimetil sulfóxido y analizada a 540 nm en un espectrofotómetro de microplaca. La concentración de citotoxicidad media fue calculada (CC₅₀). La expresión de prostaglandina E₂ (PGE₂) se identificó mediante pruebas de ELISA, se utilizó interleucina-1β (IL-1β) para inducir a un estado inflamatorio. Los datos fueron analizados con pruebas Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis y comparaciones de Mann-Whitney. La significancia estadística fue fijada a 0.05. Los experimentos se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes. **Resultados:** La viabilidad celular en contacto con el quitosano disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en HPC (CC₅₀=0.18%) < HGF (CC₅₀=0.18%) < MC3T3-E1 (CC₅₀=0.19%). La citotoxicidad de las gelatinas impregnadas con quitosano mostró una disminución de la viabilidad celular de HPC y HGF del 11% y 5%, respectivamente. La expresión de PGE₂ no fue detectada ($p > 0.05$) en presencia de las gelatinas impregnadas con quitosano, mientras que la expresión fue significativamente mayor en las células inflamadas con IL-1β y la presencia de quitosano en células inflamadas redujo significativamente la expresión de PGE₂. **Conclusiones:** El quitosano induce efectos citotóxico a concentraciones mayores al 19% sin inducir a un estado proinflamatorio en cultivos celulares, incluso reduce el efecto inflamatorio. El uso de quitosano como un biomaterial puede ser una excelente opción para usarse en odontología regenerativa.

2. Introducción

En el área de la salud, específicamente la investigación médica; la preocupación constante de mantener la vanguardia en los avances científicos de la nueva era, es impulsar la constante experimentación con distintos materiales biocompatibles con el cuerpo humano; puesto que la innovación en biomateriales dentales es indispensable para la mejora de la práctica de la medicina y odontología regenerativa.¹

Los biomateriales dentales, son aquellos materiales usados dentro del área de la odontología regenerativa, protésica y reconstructiva, cuya finalidad es sustituir algún tejido faltante siendo lo más parecido al original. Las propiedades para que se considere aceptable un biomaterial es que sea biocompatible, que posea buena adherencia, de aspecto natural al tejido faltante, que sea bioinerte, así como bacteriostático y bactericida, y algo muy importante, que no cause daños tóxicos a las células circundantes del tejido a tratar.^{1,2} Con base a esto y a diversos estudios, se sabe que el quitosano es un biopolímero con efectos bactericida/bacteriostático, biodegradable y biocompatible; el cual se ha ido utilizado en la ingeniería de tejidos, con el fin de reemplazarlos parcial o totalmente, liberando materiales bioactivos o influenciando el crecimiento celular.²

A pesar de diversas investigaciones que se han llevado a cabo, las cuales refieren la no toxicidad del quitosano, como lo menciona la Dra. Ruth E. Harris en su investigación doctoral; "Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos" donde menciona la dosis letal del quitosano en animales de prueba descrita con una dosis letal (LD50) de 16g/kg al 50% de la muestra en ratas,^{2,3} así como algunas otras investigaciones realizadas en Lima, Perú; en donde data sobre las propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado, en donde explican los potenciales usos de este biopolímero como agente cicatrizante en pacientes quemados graves y con úlceras, haciendo mención a su no toxicidad en piel;⁴ así como otra nueva investigación realizada en Mexico sobre la elaboración de un gel biodegradable a base de quitosano con efecto cicatrizante, del Instituto Tecnológico de Mazatlán, Sinaloa; que abordan a este como un biopolímero no tóxico, biocompatible y biodegradable para uso médico principalmente en pacientes diabéticos con problemas de cicatrización.⁵ Debido a esto y a la inquietud saber si es tóxico o no en células que componen la cavidad bucal, esta investigación aborda tres tipos diferentes de cultivos celulares *in vitro*.⁶ El objetivo de la presente investigación fue conocer los efectos citotóxicos y proinflamatorios del quitosano al estar en contacto directo y junto con un andamio de gelatina hemostática (Spongostand®) con fibroblastos gingivales humanos (HGF), células pulpares humanas (HPC) y osteoblastos de ratón (MC3T3-E1),

mediante una serie de experimentos de dosis curva-respuesta, citotoxicidad del quitosano junto con andamios de gelatina hemostática y expresión de prostaglandina E₂ (PGE₂) con el bioensayo de colorimetría rápida de MTT y ensayos de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del Inglés; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), todo esto realizado en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria; Área Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León de la UNAM.

3. Marco teórico

3.1 Antecedentes

En las últimas tres décadas el cultivo y proliferación de células humanas han emergido como una herramienta importante en la expansión celular y la formación de epitelio, contribuyendo al desarrollo de nuevas tecnologías como la ingeniería de tejidos y la terapia génica.⁷

La regeneración tisular, es la respuesta que lleva a cabo el organismo en la restitución integral del tejido tras una lesión, a diferencia de la reparación; donde el tejido se forma por un tejido cicatrizal con características diferentes al original.^{7,8}

Cada año, más de 500,000 procedimientos de injertos se llevan a cabo para tratar de restablecer la funcionalidad posterior a lesiones como fracturas óseas, lesiones relacionadas que resultan de una variedad de causas quirúrgicas, degenerativas, patologías y traumáticas que pueden resultar incapacitantes u ocasionar pérdida de estabilidad.⁸ Debido al número de personas afectadas y las consecuencias que están han traído a la disminución de la morbilidad, se han realizado estudios con alternativas que busquen los métodos más adecuados para restituir el tejido dañado y al mismo tiempo su desempeño sea óptimo para el tejido afectado, los cuales han sido influenciados por diferentes terapias como la colocación de injertos, materiales aloplásticos y la tecnología de la ingeniería tisular. Así como los injertos óseos, los tisulares han sido una herramienta fundamental para la rehabilitación en mucosa oral y otras partes del cuerpo; debido a su capacidad inductiva para regenerar tejidos dañados por trauma o tratamiento quirúrgico.⁹

Se consideran a los injertos autólogos como el “estándar de oro” por su buena aceptación dentro del organismo, teniendo la ventaja de compatibilidad y adecuada integración, aunque dentro de las desventajas se encuentra el tener poca disponibilidad en cantidad de zonas donadoras y complicaciones postoperatorias en la región donadora con una alta morbilidad.^{7,9}

Los injertos homólogos, que actualmente se pueden encontrar en bancos de tejidos, se consideran no muy estables debido a su rechazo por el organismo receptor, transmisión de patógenos al huésped, respuesta inmune y poca fiabilidad.¹⁰

Los xenoinjertos, los cuales son obtenidos de otras especies poseen un alto potencial de reacciones inmunes, por lo tanto es de suma importancia el desarrollo de terapias alternativas, accesibles que sean capaces del completo restablecimiento de la funcionalidad.^{9,10}

La ingeniería tisular se define como el grupo de herramientas utilizadas para la creación de implantes con características fisiológicas similares capaces de conducir e inducir la regeneración de un tejido en específico; esta nace en respuesta a los problemas y desventajas que presentan las terapias de reparación y regeneración de tejidos.¹¹

Por otro lado, la ingeniería tisular crea injertos artificiales que son capaces de inducir la neoformación y la regeneración de los tejidos blandos y duros a través de procesos naturales.^{10,11} Estas terapias regenerativas actuales son influenciadas por el desarrollo embrionario, la biología de las células troncales y la ingeniería tisular, las cuales han desarrollado terapias para la reconstrucción tisular a base de biomateriales de relleno y membranas de sostén que se pretende que sean biocompatibles, de bajo costo, de consistencia adecuada para mejorar la maniobrabilidad y absorbancia, de manera en que se sustituyen por tejido neoformado y regenerado, así como estables para que permanezcan en el sitio por un periodo no menor a 16 semanas; los materiales utilizados son variables dependiendo, en nuestro caso; al tipo de tejido a regenerar.¹¹

3.1.1 Ingeniería tisular y regenerativa

A lo largo del tiempo se ha buscado la mejora de la cicatrización y la disminución del trauma postquirúrgico en el área de cirugía oral, así como la fiabilidad de nuevos métodos de regeneración tisular para la mucosa oral, con el fin de mejorar la adaptación de los tejidos a los injertos o materiales colocados en el lugar de la lesión, sin que estos causen toxicidad o muerte celular al estar combinados con algunas otras sustancias que causen reacciones (como el quitosano).^{12,13} Muchos de los injertos que se ha utilizado para la cavidad oral provienen de la región orofaríngea, con fines correctivos para grandes defectos de tejidos, puesto que en la zona de la cavidad oral propiamente dicha no hay suficiente tejido para utilizarlo, por lo que ha sido un reto, pues el trauma y la recuperación postquirúrgica en algunas ocasiones es reservada.¹⁴ Debido a esto, es por lo que el uso de biomateriales que tienen la finalidad de ser proliferativos, injertantes, antimicrobianos, biocompatibles, y no tóxicos; ha llegado a ser la mejor opción; pues esto disminuye el trauma y la morbilidad tanto de zonas donantes como de zonas operadas.

Hace 3 décadas nació la ingeniería tisular como una alternativa de acercamiento hacia la reparación de órganos y tejidos previamente dañados.^{14,15} Este término es definido como:

“La aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de los tejidos normales y patológicos para el desarrollo de los sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la actividad de los tejidos u órganos perdidos o dañados”^{9,16,20}

3.1.2 Fibroblastos gingivales humanos (HGF)

Los fibroblastos son las células más comunes y menos especializadas del tejido conjuntivo, se encargan de la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular; presentan gran capacidad para diferenciarse dando lugar a otros tipos celulares más especializados de tejido conjuntivo.⁹ El fibroblasto forma parte del tejido conjuntivo, junto con los condrocitos, osteoblastos, osteocitos, células musculares lisas y adipocitos. El fibroblasto generalmente tiene forma alargada, fusiforme, citoplasma basófilo, un núcleo elíptico, abundante retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi desarrollado,¹⁷ y es imprescindible para la integridad del tejido conjuntivo; además, está involucrado en los procesos de cicatrización, ya que cuando ocurre daño tisular, se induce mitosis de fibroblastos y se estimula la producción de colágeno, que aísla el tejido y favorece su reparación.^{7,17}

También sintetiza los precursores de la matriz extracelular como son:

- Colágeno: Sintetiza especialmente colágeno tipo I, aunque puede sintetizar también otros tipos según el órgano donde se encuentre el tejido.
- Sustancia amorfa: Formada por proteoglicanos unidos a glucosaminoglucanos.
- Proteínas fibrosas: Embebidas en la sustancia amorfa, destacando la fibronectina y la laminina.
- Fibras elásticas: Formadas predominantemente por elastina y otras proteínas como fibrillina.

Los fibroblastos son estimulados por varias citoquinas, destacando el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta, del Inglés, Transforming Growth Factor beta) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; del Inglés, Fibroblast Growth Factor). El TGF-beta estimula la producción de colágeno y fibronectina, principalmente en procesos de

cicatrización. El FGF estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de la matriz extracelular.¹

3.1.3 Pulpa y células pulpares humanas (HPC)

La pulpa dental es un tejido conjuntivo único de origen mesodérmico, el cual se convierte en un tejido de soporte para el complejo dentino-pulpar; brindando vitalidad, sensibilidad y crecimiento a los dientes. Está compuesto por fibras y células fijas en sustancia fundamental; también contiene fibras reticulares que forman una red dentro del conducto radicular.¹⁸

La formación de la dentina es el primer trabajo que la pulpa dental lleva a cabo tanto en orden como en importancia. Se inicia con el agregado mesodérmico conocido como papila dental de donde surge la capa celular especializada de odontoblastos, adyacente a la porción interna de la cara interna del órgano del esmalte ectodérmico, el cual; interactúa con el mesodermo, y los odontoblastos inician el proceso de formación de la dentina.^{18,19} Después de ser activada, la producción de dentina continúa rápidamente hasta dar la forma principal a la corona del diente y a la raíz.

Otra característica de la pulpa dental es la nutrición de la dentina la cual, es una función de las células odontoblasticas y los vasos sanguíneos subyacentes, donde los nutrientes se intercambian desde los capilares pulpares hacia el líquido intersticial, que viaja hacia la dentina a través de la red de túbulos creados por los odontoblastos para dar cabida a sus prolongaciones, y de esta manera mantener en buen funcionamiento y vital a la dentina.¹⁹

En lo que compete a la inervación de la pulpa y la dentina, esta se realiza a través del líquido y sus movimientos entre los túbulos dentinarios y los receptores periféricos, y por tanto con los nervios sensoriales de la misma.^{18,20}

Otra característica importante que cabe mencionar es la defensa del diente y de la pulpa que se realiza mediante la creación de dentina nueva en presencia de irritantes o bien estímulos dañinos al complejo dentino-pulpar.¹⁸ La pulpa inicia la actividad odontoblastica para formar el tejido duro necesario y proteger de dicha irritación constante al diente.¹⁹

La defensa de la pulpa se compone de la formación de dentina primaria que es tubular y acomodada regularmente aquí los odontoblastos no están sobrepuestos, esta aparece cuando el diente está sujeto a mínimos estímulos irritativos. La dentina secundaria, se forma

a medida que las fuerzas y estímulos funcionales que se ejercen sobre el diente; la formación dentinaria aumenta tanto que provoca un encapsulamiento de la cavidad pulpar; mientras tanto los odontoblastos secretan la matriz dentinaria, y se retraen hacia el centro de la cavidad pulpar, se amontonan y su dirección se altera.^{19,20} La dentina producida se vuelve curvilínea y contiene menos túbulos por unidad de superficie. Posteriormente encontramos la dentina terciaria o dentina irritacional, la cual es menos sensitiva a los estímulos externos debido a la interrupción de la continuidad del proceso dentinoblástico, pero se forma a partir de procesos irritativos constantes por un periodo de tiempo largo.²⁰

Las células que podemos encontrar en el complejo dentino-pulpar son odontoblastos, fibroblastos, fibrocitos, células ectomesenquimáticas o células madre de la pulpa dental (mesenquimáticas indiferenciadas), macrófagos, células dendríticas y otras células como son los linfocitos T (más comunes en la pulpa dental), células plasmáticas, eosinófilos y mastocitos.^{19,20} Las células ectomesenquimáticas derivan del ectodermo de las crestas neurales, estas constituyen la población de reserva pulpar por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de matriz pulpar, dependiendo del estímulo que actúe sobre ellas.²⁰ El factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) es un gran estimulante de la proliferación y diferenciación de las células de la pulpa. Se ubican en la región subodontoblástica, generalmente se describen como células de menor tamaño y de aspecto estrellado.^{21,22} Las que están ubicadas en el área periapical son las que pueden dar lugar a distintas líneas celulares como fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos y odontoblastos, como respuesta biológica ante diversas situaciones.²²

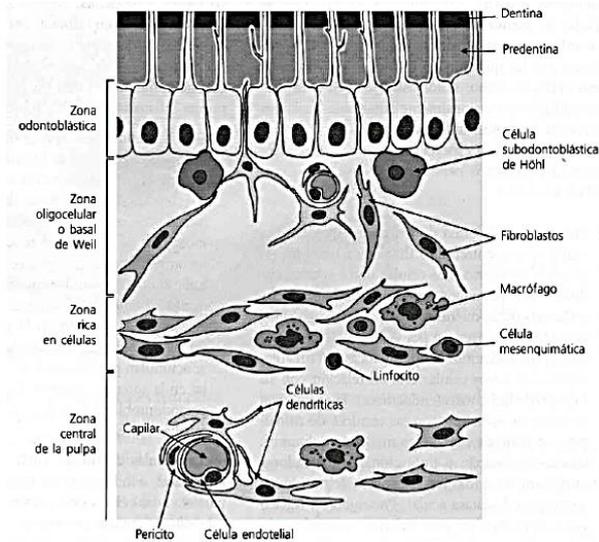


Figura 1. Zonas de la Pulpa y morfología celular
Fuente: M.E Gómez de Ferraris/Pedromo A.

Las zonas de la pulpa dental se dividen en:

- Capa o empalizada de odontoblastos

Es el estrato más exterior de células de la pulpa, está localizada inmediatamente por debajo de la predentina. Debido a que las proyecciones de los odontoblastos están ubicadas en el interior de los túbulos dentinarios, la capa de odontoblastos está compuesta predominantemente por los cuerpos o somas celulares de estos, donde también es posible encontrar algunos capilares sanguíneos y fibras nerviosas.¹⁸ La capa de odontoblastos en la pulpa coronaria contiene más células por unidad de superficie que la pulpa radicular. Morfológicamente en la porción coronaria de la pulpa joven los odontoblastos adoptan una configuración cilíndrica alta, en la porción media de la pulpa radicular son más cúbicos y cerca del foramen apical poseen aspecto de una capa celular aplanada.^{18,23}

- Zona basal de Weil

Se encuentra inmediatamente por debajo de la capa o empalizada de odontoblastos, observándose en la pulpa coronaria como una zona estrecha, que se encuentra relativamente libre de células. Esta zona es atravesada por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y los delgados procesos citoplasmáticos de los fibroblastos.^{19,23} La presencia o la ausencia de la zona pobre en células dependen del estado funcional de la pulpa, pues en base a ello puede no ser evidente en pulpas jóvenes que forman dentina

rápida o en pulpas de mayor edad en las cuales se produce dentina de reparación.^{18,20}

- Zona rica en células

Se encuentra en la región subodontoblástica. Aquí existe un estrato que contiene un porcentaje relativamente elevado de fibroblastos en comparación con la región más central de la pulpa. Este estrato es mucho más notable en la pulpa coronaria que en la pulpa radicular y además de fibroblastos, la zona rica en células puede incluir una cantidad variable de macrófagos, linfocitos o células plasmáticas.^{18,23}

- Pulpa propiamente dicha

Es la zona central de la pulpa. Esta zona o estroma pulpar contiene los vasos sanguíneos y fibras nerviosas de mayor diámetro, donde la mayoría de las células de tejido conectivo son fibroblastos.¹⁹ Estas células, juntamente con una red de fibras colágenas, se encuentran embebidas en la sustancia fundamental del tejido conectivo.^{18,20}

- Tejido apical pulpar

A diferencia del tejido pulpar coronario; el tejido pulpar apical es más fibroso y contiene menos células. Histoquímicamente, grandes concentraciones de glicógeno están presente en el tejido pulpar apical lo cual es compatible con un ambiente anaeróbico, además; contiene concentraciones mayores de mucopolisacáridos ácidos sulfatados.^{18,23}

El tejido fibroso del conducto radicular apical es idéntico al del ligamento periodontal. Esta estructura fibrosa aparentemente actúa como una barrera contra la progresión apical de la inflamación pulpar. La estructura fibrosa de la pulpa apical mantiene los vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas que entran a la pulpa.²³

3.1.4 Osteoblastos

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo, con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares²⁴ emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos.^{24,25}

Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la conexina 43.²⁵

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día.²⁶ En la actualidad se sabe que sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizan factores de crecimiento.^{25,26}

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15 %).²⁷

Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina así como el receptor de parathormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo.²⁸ Los osteoblastos están sobre la superficie ósea produciendo una sustancia blanda que se denomina osteoide; por lo cual pueden quedar incluidos en el hueso mineralizado.

Composición:

- Células (2% de la composición del hueso, su función es muy importante)
- Matriz extracelular (69% mineral y 30% orgánica).²⁸

Los osteoblastos jóvenes poseen un aspecto redondeado y están rodeados de un halo de menor densidad, a diferencia de los más viejos que son aquellos que profundizan más en el tejido óseo mineralizado, tienen aspecto alargado con una serie de prolongaciones en toda su periferia.^{27,28} Los osteocitos están depositados en cavidades osteocitarias u osteoplastos con prolongaciones en conductos calcóforos.

Solo una pequeña proporción de osteoblastos (30%) se convierten en osteocitos y el resto terminan muriendo por apoptosis.^{28,29}

3.1.5 Osteoblastos de ratón (MC3T3-E1)

ATCC MC3T3-E1 del cual son series de soluciones aisladas de la línea celular MC3T3-E1 clonado y fenotípicamente heterogéneo, mediante selección de soluciones para la diferenciación de osteoblastos alta o baja y su mineraliza con un crecimiento en ácido ascórbico contenido en el medio de cultivo. Los genes expresados en esta línea celular son colágeno.³⁰

Tejido proveniente: calota de ratón, ratas recién nacidas.
Tipo celular: preosteoblastos
Morfología: similar a la del fibroblasto
Propiedades de cultivo adherentes
Cepa: C57BL/6

Fuente: www.atcc.org⁴

3.1.6 Quitosano

El quitosano es un biopolímero que proviene de la quitina, que es una es una poli (β -Nacetilglucosamina), quien mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50% de sus grupos acetilo, se convierte en quitosano [poli (β -N-acetilglucosamina-co- β glucosamina)].³¹ Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100 % el polímero se conoce como quitano. (Figura 2).

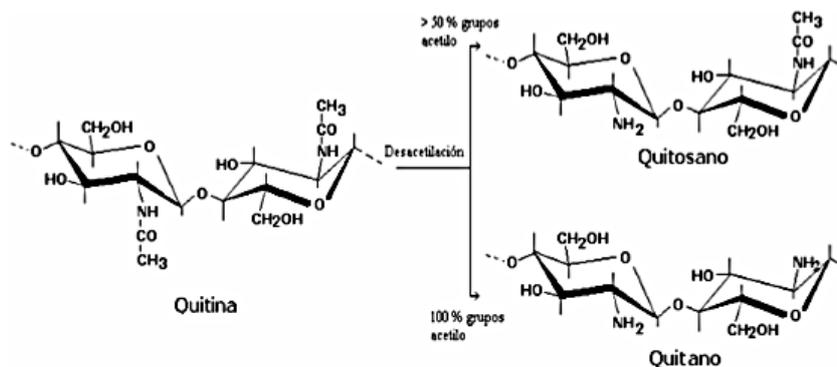


Figura 2. Relación estructural entre quitina, quitosano y quitano.

Fuente: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000270>

El quitosano no posee composición única ya que es un derivado de origen natural, por lo tanto las moléculas de este biopolímero presentan variabilidad entre ellas, abarcando su longitud, el porcentaje de grupos amino-acetilos y la posición de estos a lo largo de la cadena.^{6,31}

La diferentes fuentes de obtención de la quitina y el quitosano es el caparazón de muchos artrópodos en diversa cantidad como jaibas, camarones, langostas, arañas y cucarachas lo cual confiere su capacidad de defensa ante estímulos externos como escudo de alta eficiencia.³¹ La quitina se encuentra distribuida en la naturaleza. Es extraída principalmente del exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, algas, etc. Algunas de la propiedades del quitosano son biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante.⁶ El quitosano presenta propiedades necesarias para su uso en la industria farmacéutica y biomédica, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad.^{31,33} La toxicidad del quitosano por vía oral es baja; se ha descrito una LD50 (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16g/kg en ratas según algunos

estudios realizados por Hirano *et. al*³³ en 1990 y de las cuales se ha seguido investigando hasta la actualidad.

Las principales aplicaciones que posee actualmente el quitosano en México son:

1. Agricultura: se centra en mejorar los rendimientos agronómicos por medio de varios mecanismos como recubrimiento de semillas con películas de quitosano para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas (inicio de las plantaciones).^{31,33}
2. Medicina: la quitina y el quitosano se utiliza para acelerar la cicatrización de heridas, vacunas e incluso materiales, como suturas quirúrgicas a partir de quitina, producción de gasas y vendajes tratados con quitosano, cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras.³¹
3. Farmacéutica: el uso de quitosano en sistemas de liberación controlada de fármacos.^{1, 22} Puesto que según varios estudios realizados a lo largo del tiempo la biocompatibilidad y la biodegradabilidad del quitosano han sido claramente establecidas y son cualidades sumamente compatibles para esos productos.³¹
4. Tratamiento de aguas: el quitosano y la quitina son sustancias ambientalmente amigables. Entre los principales usos están el ser coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado, captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas. Algunos copolímeros de injerto del quitosano muestran alta efectividad para remover metales pesados, especialmente los derivados de ácidos alquenodiólicos.^{31,33}
5. Cosméticos: Fabricación de cápsulas para adelgazar, aditivo bactericida en jabones, shampoo, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, y como agente hidratante para la piel.
6. Alimentos: por su actividad antimicrobiana, es empleado para extender el tiempo de preservación de los alimentos, recuperar materiales sólidos en residuos, así como proteínas y grasa del suero de quesos, eliminación de colorantes y acidas de jugos frutales y purificación de agua de consumo.
7. Biosensores: sus aplicaciones van enfocadas al soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico, como sensor para glucosa en sangre humana (basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre quitosano, usando adicionalmente Azul de Prusia), sensor para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales (inmovilización de la enzima tirosinas) y sensores basados en la inmovilización de nano partículas.³¹

3.1.7 Cultivos celulares

Los cultivos celulares *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas; ya que de esta forma se aseguran su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía el huésped.³⁴

El cultivo celular tuvo origen en el siglo XIX, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo, esto bajo un experimento. En la actualidad pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos.^{35,36}

Cuando un cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído recibe el nombre de **cultivo primario**.³⁵ Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de **línea celular**.^{36,37}

En un cultivo celular, las células crecen en suspensión o adheridas a una superficie. Generalmente contienen un único tipo de célula y estas suelen ser homogéneas genéticamente, su velocidad de propagación o crecimiento mantenido lo hace ser el tipo de cultivo más utilizado.³⁷

Incluyendo esto mismo, da cabida a la reparación tisular (hablando propiamente de fibroblastos).

3.1.8 Historia de los cultivos celulares

Los cultivos de tejidos o cultivos células, son el conjunto de técnicas que nos permiten mantener células *in vitro* con una aproximación a sus propiedades y funciones *in vivo*.^{35,37}

Los cultivo primarios o explantes primarios se denominan así cuando las células o tejidos procedentes de un ser vivo crecen sin haber pasado previamente por una fase de crecimiento ***in vitro***. Los cultivos celulares están formados por células dispersas disgregadas de un tejido vivo, de un cultivo primario; mediante diferentes sistemas mecánicos, químicos o enzimáticos; en donde estas células crecen en suspensión o adheridas a una superficie.^{37,38}

Los principales pioneros en el método de cultivos celulares son:

Año	Pionero	Descubrimiento
1885	Roux	Consiguió mantener durante días células de embrión de pollo en una solución salina
1907	Harrison	Utilizó técnicas de estudio <i>in vitro</i> para el estudio de fenómenos <i>in vivo</i> , y demostró el crecimiento de fibras nerviosas en cultivo
1910	Burrows	Empleó plasma de pollo para nutrir los cultivos embrionarios de pollo.
1913	Carrel	Demostó la posibilidad de mantener en cultivo células de embrión de pollo, en condiciones de asepsia, durante un tiempo superior a la vida del animal.
1916	Rous y Jones	Utilizaron por primera vez extractos enriquecidos en tripsina para disociar células de los tejidos
1948	Sanford y cols.	Demuestran la formación de clones celulares
1952	Gey y cols	Establecen la primera línea celular humana continua, las células HeLa Levi-Montalcini y cols: Determinan que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula el crecimiento de axones en cultivo
1954	Abercrombie y cols	Observan la inhibición de crecimiento por contacto en fibroblastos.
1955	Eagle	Desarrolla medios definidos y describe factores de adhesión
1958	Temin y Rubin	Desarrollan un ensayo cuantitativo para la infección de células de pollo en cultivo por el virus del sarcoma de Rous.

1961	Hayflick y Moorehead	Describen la vida finita de las células humanas diploides.
1962	Buonassisi	Publica los métodos para mantener células diferenciadas
1964	Littlefield	Introduce el medio Hipoxentina-Animopterina-Timina (HAT), para el crecimiento selectivo de células híbridas, y desarrolla las técnicas de fusión celular Ham Utiliza el primer medio definido libre de suero
1965	Harris y Watkins	Producen el primer heterocarión de células de mamífero por la fusión inducida por virus de células humanas y de ratón 1968 Yaffe Estudia la diferenciación de mioblastos normales <i>in vitro</i>
1969	Augusti-Tocco y Sato	Establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma, línea de células diferenciada
1975	Köhler y Milstein	Establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales.
1976	Sato y cols	Publican una serie de trabajos que demuestran las distintas necesidades de hormonas y factores de crecimiento que precisan diferentes líneas celulares
1977	Wigler y Axel	Publican una serie de trabajos que demuestran las distintas necesidades de hormonas y factores de crecimiento que precisan diferentes líneas celulares
1986	Martín y Evans Aíslan	Cultivan células madre embrionarias pluripotenciales del ratón.
1998	Thomson y Gearhart Aíslan	Células madre embrionarias humanas

Figura 3. Historia y pioneros de los cultivos celulares por cronología de tiempo

Fuente: <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>³⁹

3.1.9 Interleucinas/IL-1 β

Las interleucinas como se sabe, son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre más funciones esenciales que cumplen en el organismo. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida (son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana). Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, así como para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.⁴⁰

La IL-1 es primariamente producida por macrófagos y monocitos, como también por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante la lesión

celular, la infección, la invasión y la inflamación. Existen dos tipos conocidos: IL-1 α y IL-1 β .^{40,41}

- La IL-1 α está estrechamente vinculada con las membranas celulares y actúa por medio de contactos celulares.
- La IL-1 β produce una inflamación sistémica por medio de la activación de la ciclooxigenasa-2, con la formación de PGE₂ en el hipotálamo anterior causando fiebre. Está sintetizada como una proteína precursora (Pro-IL-1 β), que no es segregada en la forma activa hasta ser metabolizada por la enzima caspasa-1. Recientemente se descubrió que, el IL-1 β se expresa en neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal.^{40,42} También produce la sustancia-P (SP), óxido nítrico (activando la enzima óxido nítrico sintetasa) y moléculas de adherencia endotelial, y de la misma manera posee una importante función en el desarrollo y en el mantenimiento del dolor postoperatorio.^{41,43}

3.1.10 Inflamación y expresión de prostaglandina E2

La inflamación se define como una serie de eventos complejos que surgen como respuesta del tejido a una agresión local o sistémica. La **respuesta local** resulta en el reclutamiento de células fagocíticas que se encargan de eliminar el material endógeno o exógeno causante del daño.⁴⁴ La **respuesta sistémica** puede alterar el micromedio ambiente para facilitar que este proceso se lleve a cabo. Debido a la gran cantidad de mediadores bioquímicos que participan y la cantidad de células sobre las cuales influyen, se requiere de una estricta regulación para su control efectivo. Los cambios en el flujo sanguíneo, debidos a la vasodilatación del músculo liso, y las alteraciones en la permeabilidad vascular, promovidas por la contracción del citoesqueleto de las células endoteliales, favorecen la migración de leucocitos fagocíticos al sitio de la lesión, a esto se le llama quimiotaxis.^{44,45}

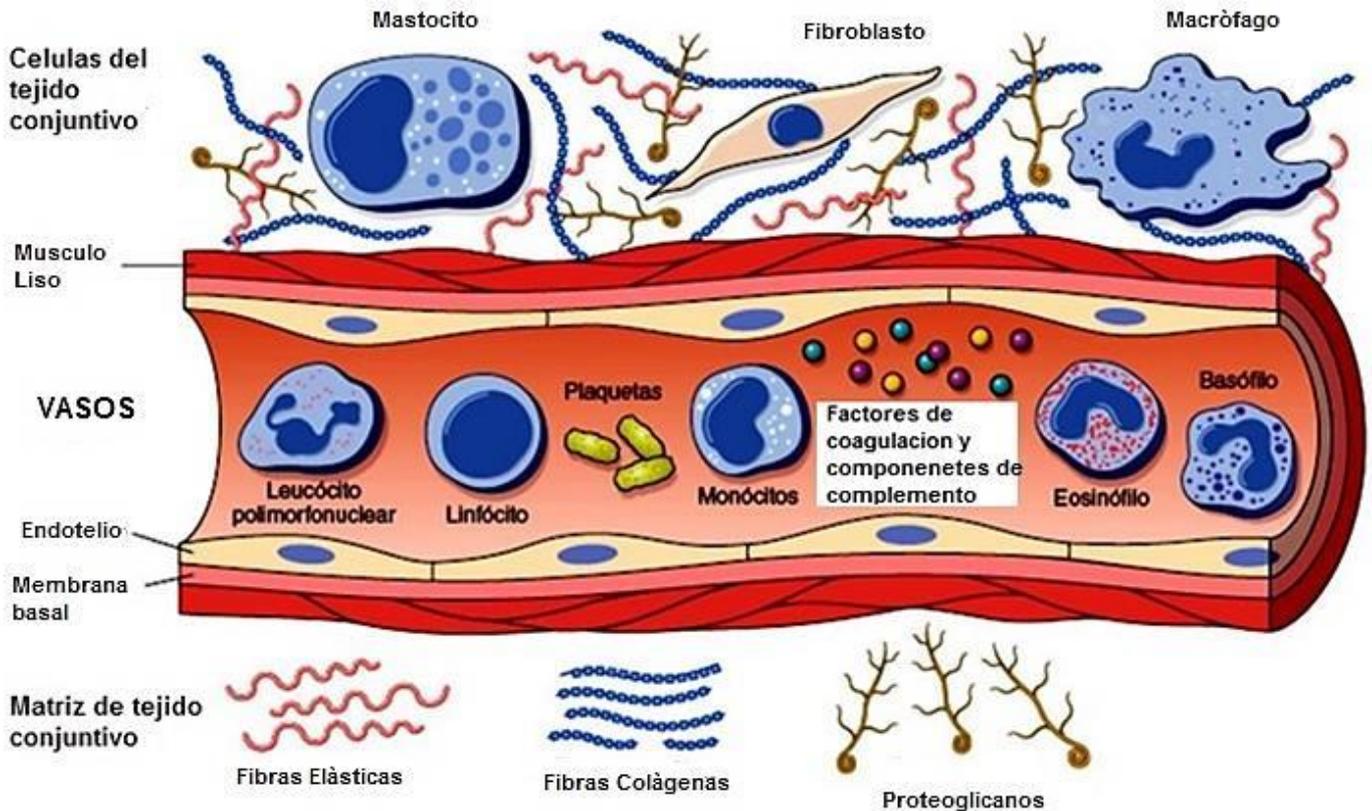


Figura 4. Esquema de los principales eventos y elementos involucrados durante la inflamación y el proceso de cicatrización.

Fuente: www.medwave.cl⁴⁶

La fagocitosis promueve la eliminación de microorganismos y la digestión de detritus celulares causantes de la inflamación, esto permite la proliferación de las células del tejido conectivo y la reparación de la matriz extracelular.⁴⁷ La inflamación puede iniciarse a partir de vías como traumas epiteliales, la presencia de complejos inmunes, productos de bacterias, virus o parásitos, así como por la actividad de células tumorales o fagocíticas. La progresión de la inflamación de su fase aguda a crónica es de importancia, ya que ésta puede dañar el tejido del huésped a través de la producción, por los fagocitos de proteasas y radicales del oxígeno.

Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos pertenecen a la clase de derivados ácidos de los prostanoides grasos del ácido araquidónico.⁴⁶ El ácido araquidónico libera los fosfolípidos de la membrana por la acción de fosfolipasas, es metabolizado en PGG2 y

PGH₂ por las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, y convertido en PGE₂ por medio de la prostaglandina E₂ sintetasa (PGES).^{48,49}

PGE₂ es encontrada en algunos fluidos corporales y es inactivada en los pulmones, liberada por la prostaglandina deshidrogenasa y el citocromo p-450 monooxigenasa. Las ciclooxigenasas (COX) y la prostaglandina E₂ sintetasa (PGES) existen en diferentes isoformas las cuales son constitutivamente activas o inductoras de estímulos inflamatorios.⁴⁸

La síntesis de PGE₂ puede ser bloqueada por corticoesteroides que inhiben las fosfolipasas o por antibióticos-antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que inhiben las ciclooxigenasas. PGE₂ es producida por una amplia variedad de tejidos, incluyendo el tejido bronquial, gástrico, vascular, uterino y músculo liso de la vejiga, el conducto arterial fetal, la placenta, el cerebro, la macula densa de células renales, las células testiculares Leydig, las células mesenquimales, los monocitos y los macrófagos.^{47,49}

El aumento de PGE₂ produce varias condiciones patológicas, incluyendo la inflamación y la artritis, fiebre, lesión de los tejidos, endometriosis, y una amplia variedad de cánceres.⁴⁹

La prostaglandina E₂ o dinoprostona en su forma natural, tiene la función de enlazarse al receptor de PGE₂ activándolo. Esta se sintetiza a partir de la PGH₂ mediante la enzima prostaglandina E₂ sintetasa.⁴⁸

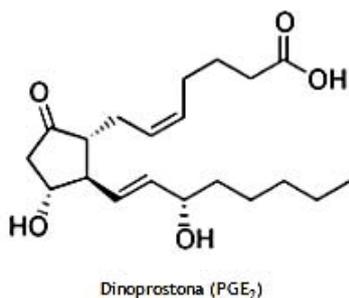


Figura 5. Estructura de la Diprostona (PGE₂)

Fuente: www.prostaglandina.com/dinoprostona_pge2⁵⁰

Los efectos de la PGE₂ son de particular importancia, debido a su acción sobre las células de la respuesta inmune, en particular sobre linfocitos y macrófagos.^{48,51}

Figura 6. Efectos de PGE₂ sobre linfocitos y macrófagos

Tipo celular	Función Biológica
LB	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la proliferación y de la producción de anticuerpos. • Sinergiza con la IL-4 para inducir el cambio de IgG1 a IgE.
LTh1	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la proliferación, mediada por una disminución en la producción de IL-2 e IFN-γ. • Regulación de la actividad de la IL-2 a través de la regulación de la expresión del Mrna para la IL-2 y del IL-2Rα.
LTh2	Contribuye a la proliferación de este tipo celular, a través de la producción de IL-4 e incrementando la secreción de IL-5.
Mos	<ul style="list-style-type: none"> • Bloquea los mecanismos de activación mediante la disminución en la producción de IFN-γ por los LTh1. • Inhibición de la producción de IL-2 y por ende de la actividad citolítica del macrófago y de las células NK. • Inhibición de la motilidad y fagocitosis <i>in vitro</i>; disminución de la actividad tumoricida mediada por IFN-γ; e inhibición de la respuesta contra antígenos timo-dependientes <i>in vitro</i>. • Inhibición de la producción dosis-dependiente de IL-1 en macrófagos estimulados <i>in vitro</i> con LPS
CE	Inhibición de la migración transendotelial de células T y de células endoteliales dependientes del incremento en los niveles de AMPc.

Abreviaturas: LB linfocito B, LTh1 linfocito T cooperador de subgrupo 1, LTh2 linfocito T cooperador de subgrupo 2, Mos macrófagos, CE células endoteliales, NK células asesinas naturales.^{44,48} Fuente: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000270>

Existe una estrecha relación entre las actividades de la PGE₂ y otros factores de la respuesta inmune, como son el óxido nítrico (NO) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Según estudios se ha reportado que la PGE₂ tiene la capacidad de regular la forma dosis dependiente, ya que en líneas celulares de macrófagos J774 los LPS, en bajas dosis, inducen concentraciones insignificantes de PGE₂ endógena, con secreción de NO⁵¹; por lo tanto, a dosis altas; los LPS generan niveles elevados de PGE₂ que inhiben la liberación de NO.⁵² Asimismo, altos niveles de PGE₂ bloquean la producción de TNF- α y generan la acumulación del mRNA del TNF- α , lo cual a su vez podría ejercer efectos negativos sobre la síntesis de NO.^{48,52}

4. Planteamiento del problema

En el área de la odontología, podemos encontrar problemáticas importantes como es la cicatrización de tejidos y en muchos casos, la limitada disponibilidad de tejido para poder realizar algún tipo de injerto cuando el tratamiento lo demande, así como la contaminación del lecho quirúrgico después de realizar un procedimiento quirúrgico debido a la situación en que este pueda encontrarse. Invariablemente, los costos de las casas comerciales de injertos, llámense tisulares u óseos, oscilan en precios elevados y la fiabilidad en bancos de tejidos puede ser limitada; pensando en el tipo de pacientes, su economía y salud. En la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León de la UNAM, conjunto con el Laboratorio de Nanoestructuras y Biomateriales Dentales de la ENES, realizó una serie de pruebas de citotoxicidad del quitosano en cultivo de células de HGF, HPC y MC3T3-E1, mediante comparaciones con y sin andamio de gelatina hemostática Spongostand®, y de esta manera poder realizar las pruebas de viabilidad celular para su posible aplicación en formulaciones que requieran de sus beneficios, con la finalidad de disminuir la morbilidad de la zona tratada quirúrgicamente y acelerar el proceso de regeneración tisular; ya que, como se sabe; el quitosano puede ser empleado como un excelente cicatrizante natural, el cual a concentraciones específicas puede usarse como gel o película en combinación con células humanas o animales y algunos otros elementos para ayudar a regenerar ciertos defectos no solo en piel, sino también en cavidad bucal como recesiones gingivales, lechos quirúrgicos con osteotomías, en pacientes con problemas de gingivitis ulcerativa, y en zonas donde la disponibilidad de tejido no es suficiente para colocar posteriormente algún implante o prótesis.

4.1 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los efectos citotóxicos y proinflamatorios que presenta el quitosano solo y con un andamio de gelatina hemostática (Spongostand®) en cultivos celulares de HGF, HPC y MC3T3-E1 incubados en el Laboratorio de Nanopartículas y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León de la UNAM?

5. Justificación

Los procedimientos de colocación de injertos, colocación de biomateriales e ingeniería tisular han aumentado exponencialmente cada año; con la finalidad de restablecer la funcionalidad en sitios donde existen lesiones tisulares u óseas resultado de diversas causas llámese quirúrgicas, degenerativas, patológicas o traumáticas que pueden resultar incapacitantes, como la enfermedad periodontal en estadios avanzados, la pérdida de soporte óseo en brechas desdentadas, las osteotomías usadas en cirugías de terceros molares y regularizaciones de proceso alveolar en pacientes parcial o totalmente desdentados con indicación para prótesis totales o implantes.⁵³ Cabe mencionar que una de las afecciones dentales más comunes posterior a la extracción de órganos dentales es la alveolitis. Algunos estudios realizados en Venezuela por especialistas de la Universidad de Camaguey, Cuba, basados en de la incidencia de alveolitis en pacientes tratados para extracción dental, reporta que la frecuencia de esta oscila entre 1 y 4% de todos los casos, con mayor incidencia tras la extracción de terceros molares retenidos de un 20 a 30%,^{54,55} bajo causas multifactoriales como el aporte vascular disminuido del hueso, pacientes con hueso esclerótico, traumas excesivos de los bordes del alvéolo, de la encía y óseo, elevación de la temperatura del hueso por no irrigar con el uso de las fresas, extracción de dientes con procesos periodontales o periapicales agudos, mala higiene bucal, permanencia de cuerpos extraños en el alvéolo, restos radiculares, quistes, granulomas, localización de la extracción y la saliva. Los resultados arrojaron que en el sexo femenino se vio más afectado con un 60.5% a comparación del masculino con un 39.5% con mayor incidencia en zona mandibular.⁵⁶

La necesidad de promover la regeneración tisular es ampliamente reconocida. El problema a resolver radica en proponer una formulación capaz de promover y/o estimular la formación de mucosa, de tal manera que estimule la proliferación en la regeneración, y con esto se pueda tener la certeza de que posean un efecto no tóxico en las células circundantes y de ser así que porcentaje es el adecuado para su uso en diferentes circunstancias.^{56,57} Por lo antes mencionado, el realizar pruebas de citotoxicidad del quitosano en contacto con cultivos celulares previos de HPC, HGF y Osteoblastos, nos ayudará a medir el porcentaje de toxicidad en cada una de las líneas celulares solas y en contacto con un andamio de gelatina hemostática revisando las reacciones que sufren las células al contacto con este y cuantificando la expresión de citoquinas proinflamatorias, con la finalidad de crear formulaciones que promuevan a la cicatrización de los diferentes tratamientos quirúrgicos en la cavidad oral bajo agentes bactericidas/bacteriostáticos y biocompatibles como lo es el

quitosano en una matriz hemostática, reduciendo el nivel de contaminación postquirúrgica.^{57,58,59}

Los estudios de vanguardia en relación a la ingeniería de tejidos tienen la finalidad de lograr la regeneración tisular mediante mecanismos que nos brindan la posibilidad de preservar la función y estructura anatómica, minimizando el riesgo de morbilidad teniendo compatibilidad celular y biológica.^{6,31,70}

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Conocer los efectos citotóxicos y proinflamatorios del quitosano con respecto a cultivos celulares de HGF, HPC y MC3T3-E1 para su probable aplicación en formulaciones e injertos que promuevan la regeneración tisular.

6.2 Objetivos específicos

1. Identificar la citotoxicidad mediante dosis-respuesta del contacto de quitosano de 0-1% en cultivo con HGF, HPC y MC3T3-E1.
2. Estimar la viabilidad celular de HGF y HPC posterior a la inoculación de andamios de gelatina hemostática impregnado con y sin quitosano a 0.19% y 1%.
3. Conocer los efectos proinflamatorios mediante expresión de PGE₂ del contacto de andamios de gelatina hemostática impregnados con y sin quitosano al 0.19% y 1% en HGF.
4. Proponer una nueva aplicación del quitosano en conjunto con la gelatina hemostática Spongostand® para futuras formulaciones en el área de cirugía bucal.

7. Hipótesis

7.3 Hipótesis de investigación

El quitosano a concentraciones $>$ al 1% dentro de cultivos celulares de HGF, HPC y MC3T3-E1 con y sin andamio de gelatina hemostática, no inducen citotoxicidad y respuesta inflamatoria, respectivamente.

7.4 Hipótesis nula

El quitosano a concentraciones \leq al 1% dentro de cultivos celulares de HGF, HPC y MC3T3-E1 con y sin andamio de gelatina hemostática, inducen citotoxicidad y respuesta inflamatoria, respectivamente.

8 . Metodología

8.1. Muestra y universo de estudio

Tipo de estudio: Experimental *in vitro*

Diseño de estudio: Puro, descriptivo, prospectivo y comparativo

Universo de estudio: Biopsias de tejido pulpar, cepas certificadas de HGF y MC3T3-E1 (ATCC)

Método de muestreo: Muestreo no probabilístico por cuotas

Tamaño de muestra: Los experimentos se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes (n=9/gpo)

Densidad celular: De 2 a 9×10^5 células/ml

8.2 Criterios de selección

C. inclusión

- Células previamente cultivadas en el Laboratorio de Nanopartículas y biomateriales dentales de la ENES León UNAM.
- Cultivos celulares con PDL (del inglés, Population Doubling Level) no mayor a 15 pases celulares.

C. no inclusión

- Cultivos que no cumplan los criterios de inclusión.

C. de eliminación

- Cultivos celulares contaminados

8.3. Variables

- Variables independientes**

VARIABLE	DEFINICION	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO	ESCALA Y UNIDAD DE MEDICION
Muestras con y sin IL-1 β	La IL-1 β produce una inflamación sistémica por medio de la activación de la ciclooxigenasa-2, con la formación de PGE ₂ en el hipotálamo anterior causando fiebre. ⁶¹	Se colocaron 3 ng/ml IL-1 β en las muestras destinadas a ser colocado para inducir una respuesta inflamatoria	Cualitativa dicotómica	Nominal 1-Células con IL-1 β 2- Células sin IL-1 β
Concentración del quitosano	El quitosano es un biopolímero caracterizado por ser biodegradable, biocompatible, mucoadherible, con capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, posee actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante, no toxico. ^{2,3,6}	Se realizaron dos soluciones de quitosano, una al 1% y al 0.19% para determinar a qué concentración es más citotóxico al contacto celular mediante pruebas de citotoxicidad con el método de MTT.	Cuantitativa continua	De razones 0---0.5%
Esponjas	Esponja	Se impregnaron	Cualitativa	Nominal

Efecto citotóxico y proinflamatorio del quitosano en cultivos celulares

hemostáticas Spongostand®	hemostática insoluble en agua, compuesta en un 100% de gelatina porcina. ⁶⁰	esponjas de gelatina hemostática con solución fisiológica y Quitosano al 1% y 0.19%, en contacto con cultivos celulares <i>in vitro</i>	dicotómica	1-Esponja con quitosano 2-Esponja sin quitosano
------------------------------	--	---	------------	---

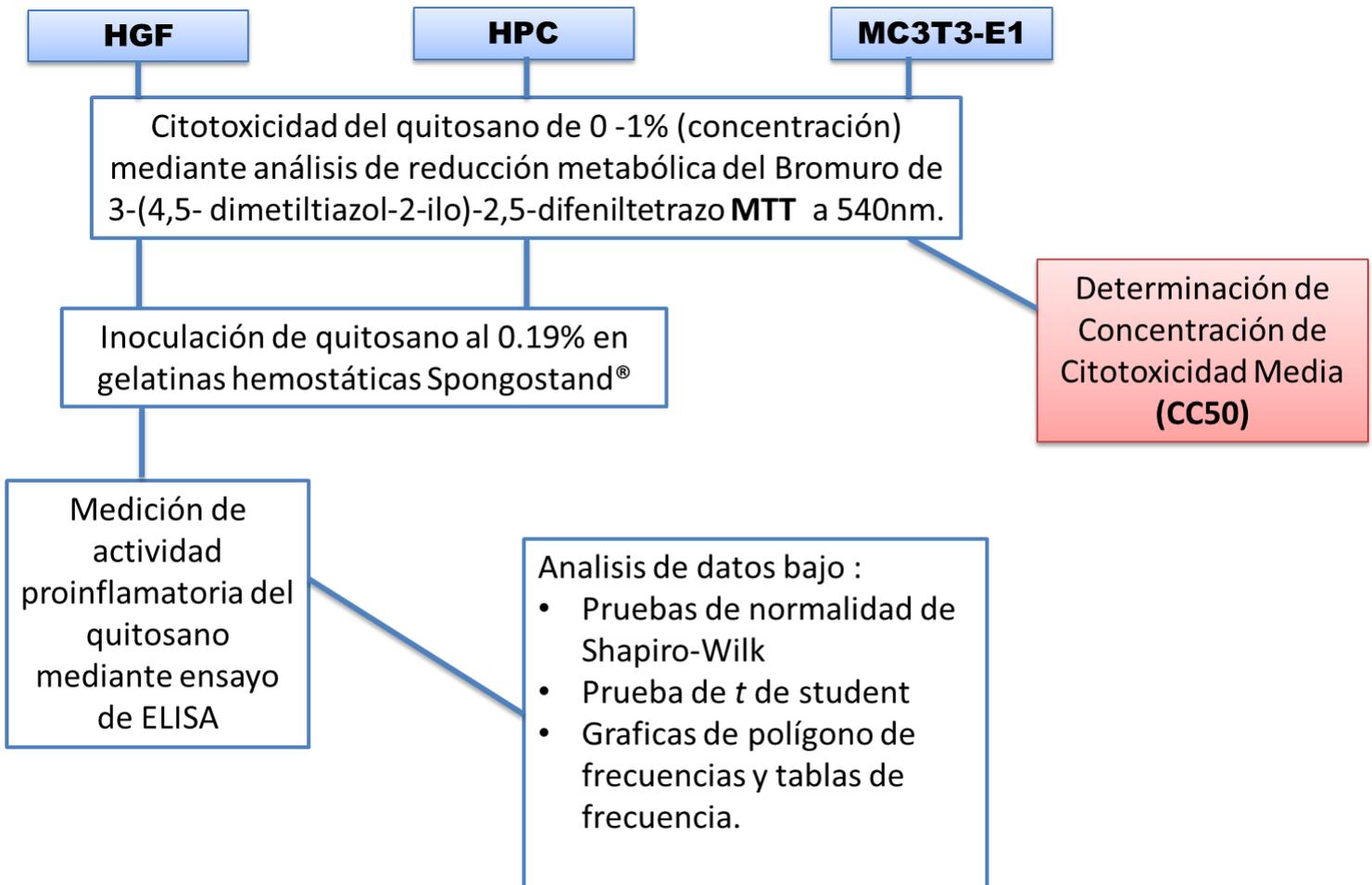
- Variables dependientes**

VARIABLE	DEFINICION	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO	ESCALA Y UNIDAD DE MEDICION
Citotoxicidad	Cualidad de una sustancia o microorganismo a ser toxico a determinado tipo de células. ^{54,55} MTT es un sal basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato- deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. ^{62,63}	Pruebas se citotoxicidad y viabilidad celular con MTT, en HPC, HGF, MC3T3-E1 y Quitosano al 1 y 0.19%.	Cuantitativa continua	De razones 0---- n Abs 0—100 %
Expresión de PGE ₂	PGE ₂ produce varias condiciones patológicas,	Inducción de efectos proinflamatorios	Cuantitativa Continua	De razones 0---- n Abs

Efecto citotóxico y proinflamatorio del quitosano en cultivos celulares

	incluyendo la inflamación y la artritis, fiebre, etc. Encargada junto con COX-1 y COX-2 del proceso de inflamación. ^{48,49,61}	mediante IL- β de las distintas líneas celulares con prueba de ELISA.		0--- n ng/ml
--	---	---	--	--------------

8.4 Diseño del estudio



8.5 Implicaciones bioéticas

Con lo que respecta a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos y de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y vertidos en el reglamento de la ley general de salud de México en materia de investigación, se contará con el consentimiento informado de los pacientes que deseen donar sus dientes y tejidos orales.

De acuerdo al reglamento de la ley general de salud y al Título Segundo: Delos aspectos éticos de la Investigación en Seres Humanos, **Artículo 13**, en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar; para esta investigación prevalecerá lo antes mencionado de los pacientes que aceptaron donar sus dientes y tejidos orales. **ARTICULO 15**, cuando el diseño experimental de una investigación que se realice en seres humanos incluya varios grupos, se usarán métodos aleatorios de selección para obtener una asignación imparcial de los participantes en cada grupo y deberán tomarse las medidas pertinentes para evitar cualquier riesgo o daño a los sujetos de investigación. **El Artículo 16**, en las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice. **Artículo 17**, se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio; **Categoría II: Investigación con riesgo mínimo:** Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva; electrocardiograma, termografía, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduos y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, **ARTICULO 68.-** Los estudios de toxicología preclínica requeridos para cada fármaco estarán en función de éste

particular, de la toxicología potencial conocida de otros con estructura química similar y de la vía y tiempo de administración que se pretenda utilizar en el ser humano, entre otros.

Para esta investigación se basara en los aspectos Bioéticos antes mencionados ya que la investigación se clasifica dentro de un riesgo mínimo para el paciente.

Todo procedimiento quirúrgico previo se realizara bajo consentimiento informado, posterior a ser evaluado y aceptado por el Comité de Bioética y Seguridad de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León de la UNAM.

8.6 Materiales y métodos

8.6.1 Autorización y obtención de la muestra

Para obtener las células pulpares humanas (HPC), se recolectaron terceros molares superiores e inferiores erupcionados no dañados patológicamente de pacientes sanos, a quienes se les practicaron odontectomías quirúrgicas de terceros molares en la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León de la UNAM.

Para ello se sometió este protocolo al comité de Bioética y Bioseguridad de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León de la UNAM, en donde los pacientes dieron su autorización para que sus dientes extraídos pudieran ser usados en esta investigación.

Las muestras fueron almacenadas , inmediatamente después de la extracción, en tubos Falcon® con 10 ml de solución salina buffer de fosfato (PBS, pH 7.4) y 1% de antibiótico (Gibco®), Grand Island, NY, EU).

8.6.2 Cultivo Celular

Una vez en laboratorio, el órgano dentario fue lavado dos veces con PBS. La obtención del tejido pulpar se realizó dentro de la campana de flujo laminar (Lumistell®, Celaya Gto, Mexico). La corona fue separada de la raíz con discos de diamante fino a baja velocidad, sin tocar la pulpa dental; una vez realizado un surco, la corona fue fracturada de la raíz con una espátula 7A con la finalidad de extraer la pulpa del conducto radicular sin ser contaminada. Se retiró la pulpa dental con pinzas de curación estériles y se realizan explantes de 1x1 mm, aproximadamente, con una hoja de bisturí nº 20 sobre un portaobjetos de vidrio estériles o platos de cultivo de 60x15mm (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY; EUA). Los explantes fueron inoculados en platos de cultivo estéril de 100x15mm (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY; EUA) posteriormente se colocaron 10ml de medio de cultivo DMEM adicionado con el 20% de Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco®) estéril , 1% de antibiótico (10,000 UI/ml penicilina G y 10,000 µM/ml estreptomycin, Gibco®), y 1% de Glutamax (Gibco®) posteriormente se dejaron incubar a 37° C con 5% de CO₂ y 95% de humedad, durante 3 semanas hasta obtener una monocapa celular del 80% de su proliferación celular en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania). El medio de cultivo se cambió cada tercer día después de la semana 1.

Las células de fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) y osteoblastos de ratón (MC3T3-E1, Mouse C57BL/6 calvaria), fueron obtenidos de una cepa certificada (ATCC®) y subcultivadas en medio DMEM adicionado con 10% de FBS, 1% de antibiótico y 1% de glutamax.

8.6.3 Subcultivo Celular

Las células fueron lavadas tres veces con solución buffer de fosfato (PBS, 5 ml) y se agregó 1 ml de tripsina al 0.05% (Gibco®) EDTA-2Na, se incubó durante 5 min a 37°, se comprobó el desprendimiento celular bajo microscopio; observando a las células circulando libremente en la caja de cultivo. Se retiró la caja de la incubadora y se colocó 1ml de medio de cultivo DMEM adicionado con 10% FBS, 1% de antibiótico y 1% de glutamax para desactivar el efecto de la tripsina. El conteo celular se llevó a cabo con el método de recuento celular donde se utilizó una cámara de Neubauer (BOECO 1/10mm, Germany), contador celular automatizado (Bio-Rad 2000 TC10, Hercules, California; EU) por exclusión de azul de tripano (Trypan Blue Dye 0.40%, Bio-Rad, Hercules California: EU) con el objetivo de 10 aumentos, que efectuó el recuento de la células en un área de 1mm² definida por las triples líneas paralelas de la cámara de Neubauer. El número de células por mililitro de suspensión permitirá calcular el número total de células. Las células fueron subcultivadas en un rango de 2-9x10⁵ células/ml para cada experimento.

8.6.4 Preparación del Quitosano al 1%

Se realizó la preparación del quitosano de Cascaras de Camarón (<75% de desacetilacion, Sigma Aldrich, Toluca, Edo. De México), 0.1gr previamente pesado en la balanza analítica de precisión SGC-LII (Denver Instrument), y fue colocado en vaso de precipitados de 50ml. Posteriormente se añadieron 10ml de ácido acético al 1%, dejando la mezcla en agitación en parrilla de calentamiento y agitación (CIMAREC, Barnstead/Thermolyne) a temperatura ambiente por 24 hrs hasta que homogenice y tome un aspecto viscoso. Pasadas la 24 hrs se determinó el Potencial de Hidrogeno de la disolución estableciéndolo en un pH 3.98.

8.6.5 Viabilidad celular (Curva dosis-respuesta)

Se realizó en primer experimento con quitosano al 1% en donde se colocaron en platos de 96 pocillos las tres diferentes líneas celulares repartidas en HPC HGF y MC3T3-E1 por triplicado de tres experimentos independientes, donde se colocaron 100µL de medio de cultivo DMEM y se dejaron incubando 48h a 37° C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente con ayuda de Micropipeta Multicanal se colocaron 100µL de quitosano al 1% en la primera columna del plato donde fue el 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001 y 0% de concentración, siendo este último el grupo control, (Figura 7). Se dejó incubar durante 24h a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

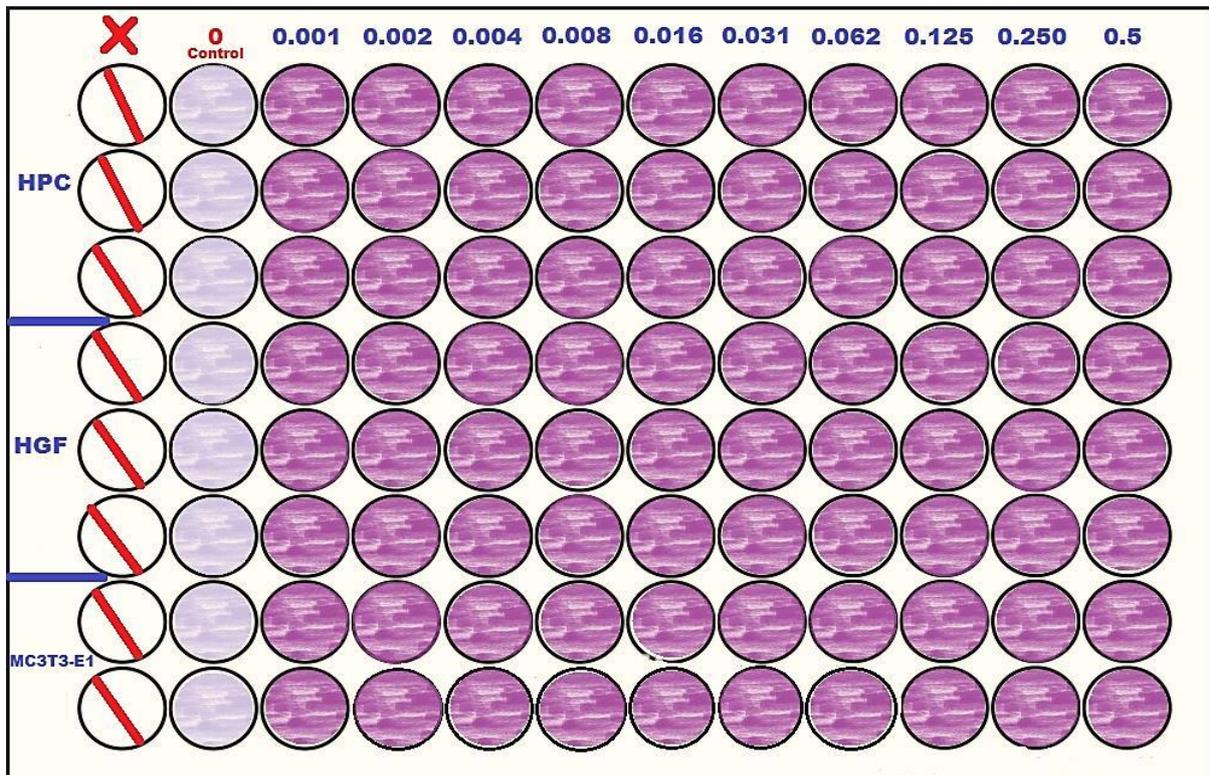


Figura 7. Plato de 96 pozos. Diagrama representativo de las diluciones en el experimento de la curva dosis respuesta

La viabilidad celular se determinó después de 24h de incubación. En resumen, se retiró medio de cultivo (DMEM), y fue sustituido por el reactivo de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 98% Sigma Aldrich) a una concentración de 0.2mg/ml en DMEM. Se

colocaron 100 µl de MTT en cada pocillo y se incubaron durante 4 hrs. Los cristales de formazán fueron disueltos con 100µL de dimetilsulfoxido [(CH₃)₂SO, DMSO, J.T Baker]. La placa fue analizada en espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific Multiskan GO, Rochester, NY; EUA) a 540nm y agitación a 10seg.

8.6.6 Efectos de las Gelatinas Hemostáticas Spongostand® con Quitosano

Preparación del Quitosano al 0.19%

Se realizó la preparación del quitosano al 0.19% como se mencionó anteriormente. Pasadas la 24 hrs de toma el pH de la disolución estableciéndolo en un 3.4.

Pruebas de viabilidad celular con Spongostand®

Posteriormente, se realizaron pruebas de viabilidad celular siguiendo el protocolo antes mencionado en placas de 24 pocillos con las células que mostraron más sensibles al quitosano que fueron HGF y HPC. Los andamios de gelatina hemostática Spongostand® fueron impregnados con solución fisiológica y quitosano al 0.19%. Los andamios fueron inoculados en el fondo del plato de cultivo y se agregó 300µl medio de cultivo, se utilizaron dos pozos como grupo control (Fig. 8). Las células fueron incubadas por 24hrs a 37° C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

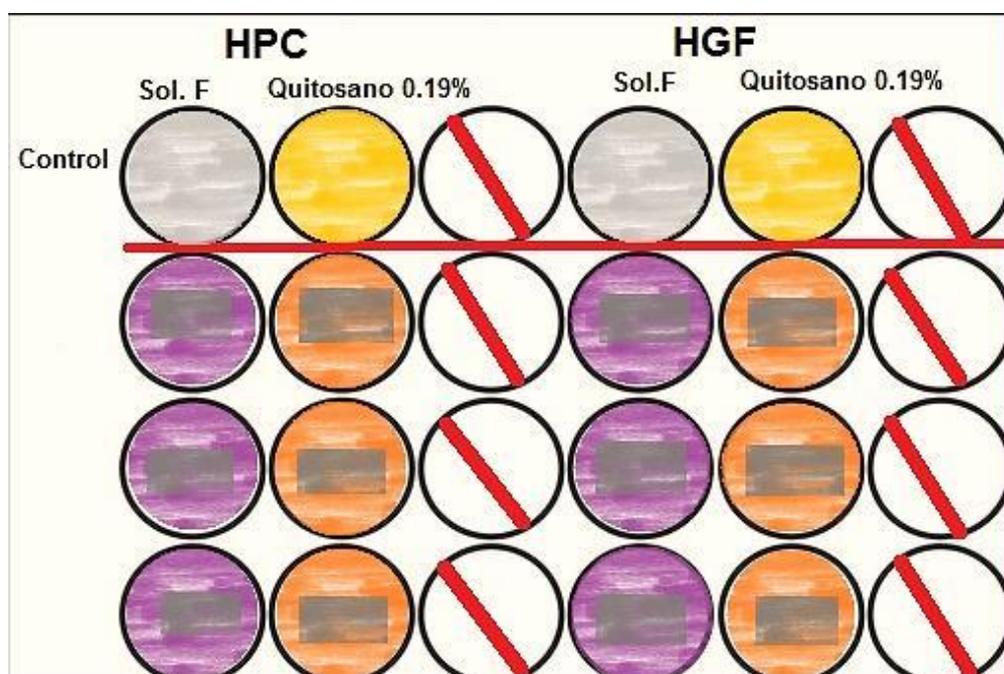


Figura 8. HPC y HGF con Spongostand® a 24 pozos

La viabilidad celular se realizó con el método de MTT antes mencionado. En breve, las células fueron transportadas de los platos de 24 pocillos a placas de 96 pocillos para analizar la actividad mitocondrial (Fig. 9). Esta prueba se realizó por triplicado.

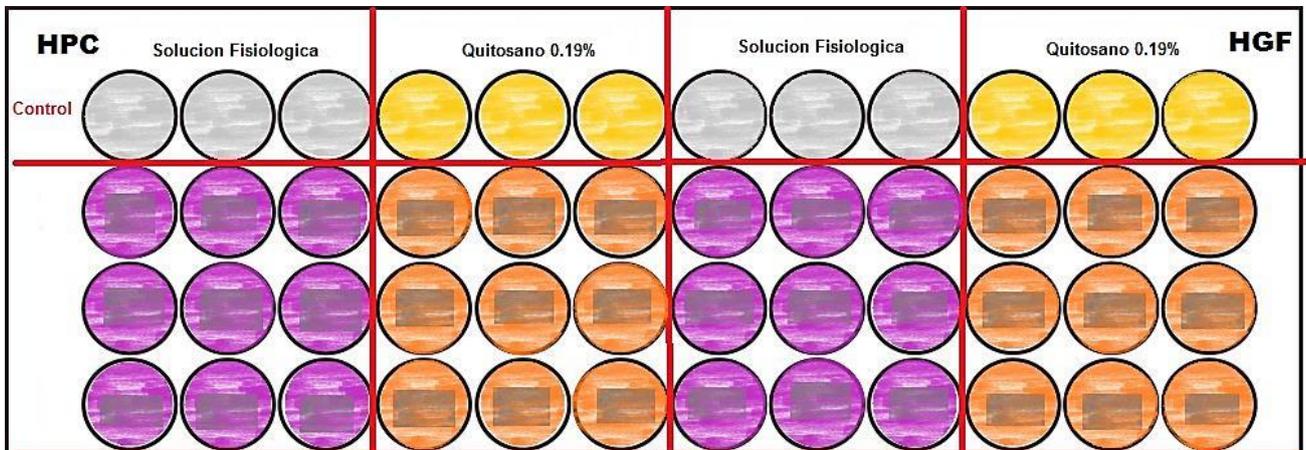


Figura 9. HPC y HGF con Spongostand® plato de 96 pozos

8.6.7 Actividad pro-inflamatoria del quitosano en cultivo con HGF

Células HGF fueron subcultivadas a la densidad antes mencionada en platos de 24 pocillos. Se utilizó IL-1 β (recombinant human, >97% Purity, Minneapolis, MN, EUA) que fue adicionada con 200 μ l de Suero Fetal Bovino (Gibco®) y 2 μ l de Albumina Bovina (Bovine Allbumin Solution, 22%, IMMUCOR GAMMA, Norcross, GA. USA), para inducir a las células a un estado proinflamatorio y sirviera como control positivo. Las gelatinas hemostáticas impregnadas con quitosano al .19% y 1% o solución fisiológica fueron inoculados e incubado como se mencionó previamente en platos de 24 pozos (Fig. 9).



Figura 10. Plato de 24 pozos con y sin IL-1 β , en presencia de esponjas hemostáticas Spongostand® impregnadas de Solución Fisiológica, Qitosano al 0.19% y Qitosano al 1% respectivamente.

El sobrenadante del medio de cultivo fue almacenado en tubos Eppendorf y se realizó la expresión de prostaglandina E₂ con un kit de expresión (R&D Systems, Minneapolis, USA) con pruebas de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.7 Análisis estadístico y representación de los datos

Se calculó la media, desviación estándar y porcentajes. Los datos obtenidos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shaphiro-Wilk, prueba de t de student pareada para comparar los tiempos de incubación de la proliferación celular y pruebas t utilizando las medias de las diferentes dosis. La significancia estadística fue fijada con un valor de 0.05 y un coeficiente confiabilidad del 95%. Los datos fueron representados con graficas de polígono de frecuencias y tablas de frecuencia.

9. Resultados

Los resultados obtenidos dentro de todos los experimentos se realizaron por triplicado de tres experimentos independiente.

9.1 Viabilidad celular en HGF, HPC y MC3T3-E1 en contacto con quitosano a diferentes concentraciones.

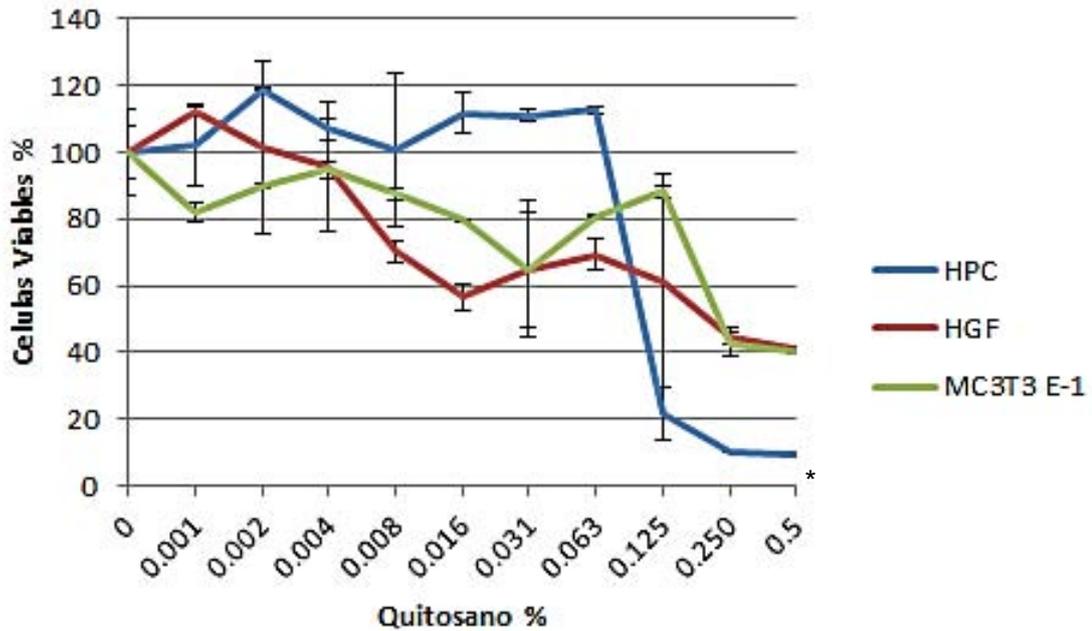


Figura 11. Grafico de resultados de líneas celulares **HGF**, **HPC**, **MC3T3-E1** con quitosano 1%.
* $p < 0.05$ t-student, $n = 9$.

Las líneas celulares más sensibles al contacto con quitosano fueron HPC ($CC_{50} = 0.11$) < HGF ($CC_{50} = 0.19\%$) < MC3T3-E1 ($CC_{50} = 0.19\%$).

9.2 Viabilidad celular en HGF y HPC con quitosano 0.19% (CON andamios de gelatina Spongostand®)

Como resultados en estas pruebas obtuvimos en las células pulpares humanas (HPC) en contacto con las gelatinas hemostáticas impregnadas con quitosano al 0.19% mostraron una viabilidad celular de 89.14%; a diferencia de las gelatinas hemostáticas impregnadas con Solución Fisiológica y en contacto con HPC, que poseen una viabilidad celular de un 94.98% (Fig. 12 A). En los fibroblastos gingivales humanos (HGF), con la gelatinas hemostáticas impregnadas con solución fisiológica, la viabilidad celular decreció a un 61.43% (Fig. 12 B), mientras que las impregnadas con quitosano al 0.19% obtuvieron una viabilidad celular de 11.90%.

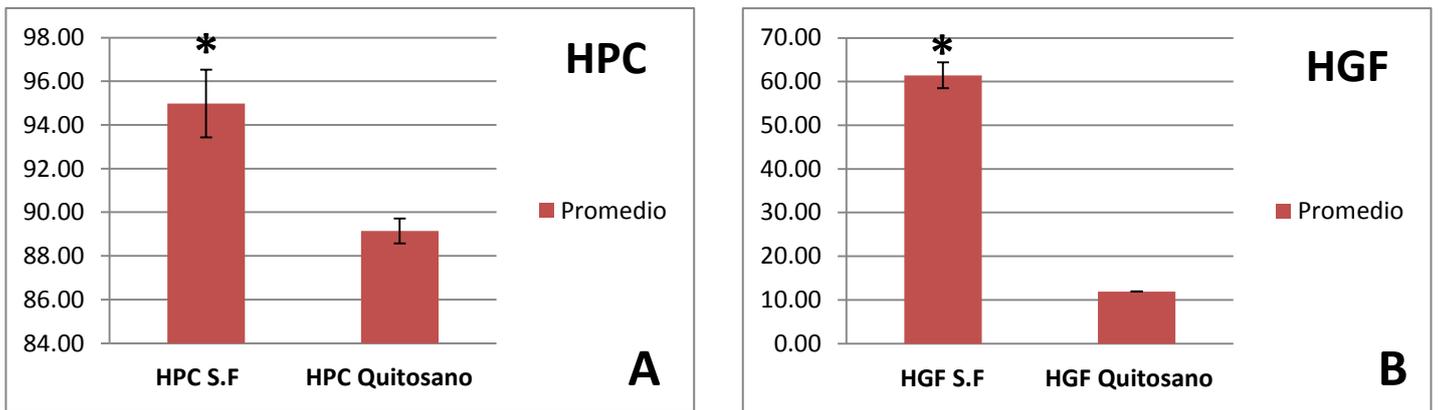


Figura 12. Efecto citotóxico del Quitosano 0.19% en HPC (A) y HGF (B) con esponjas hemostáticas Spongostand®. * $p < 0.05$ t-student, n=9.

9.3 Efectos pro inflamatorios del HGF con IL-1 β /PGE₂

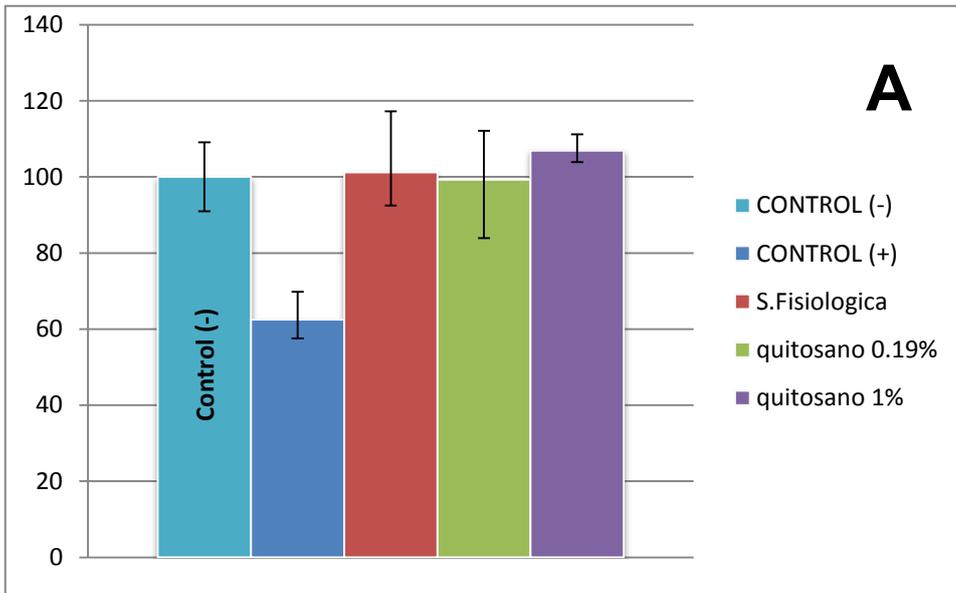
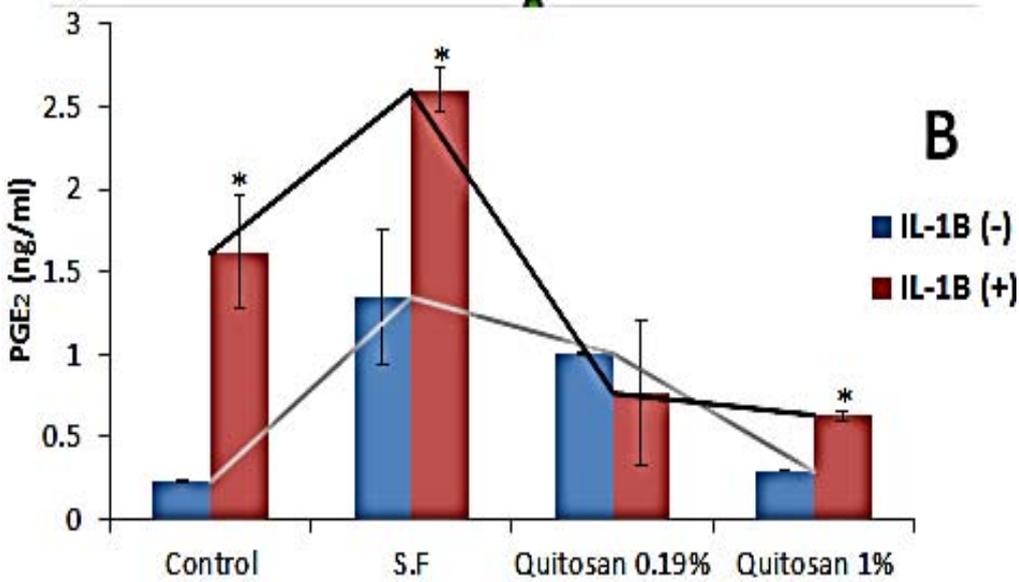


Figura 13 (A). Viabilidad celular de HGF con IL-1 β , en contacto con esponjas hemostáticas Spongostand® impregnadas de Solución Fisiológica, Quitosano.(B). Expresión de PGE2 en HGF * $p < 0.05$ t-student, n=4.



Las pruebas de viabilidad celular con MTT por individual de HGF con esponjas de gelatina hemostática Spongostand® (Figura A), embebidas en quitosano y solución fisiológica bajo grupo control con y sin IL-1 β , se observó el aumento de la viabilidad celular de 106.91% en quitosano con IL-1 β , en donde posteriormente se realizaron pruebas con Prostaglandina E₂ con análisis de ELISA (Fig. A)

Al realizar las pruebas para la medición de los efectos proinflamatorios mediante Prostaglandina E₂ (PGE₂) con el Kit Parameter™ (R&D Systems™ a biotechne brand), los resultados obtenidos fueron; las células que fueron inflamadas con IL-1 β expresaron mayor cantidad de PGE₂ solas y en presencia de solución fisiológica, mientras que el contacto de quitosano al 0.19% y 1% redujeron significativamente ($p < 0.05$) la expresión de PGE₂.

10. Discusión

Las infecciones postquirúrgicas dadas en cirugía oral como es la alveolitis en odontectomías quirúrgicas de terceros molares debido a contaminación del lecho quirúrgico o poco tejido epitelial que lo recubra suelen ser bastante comunes en la práctica odontológica⁵⁴. En contraste a ello las formulaciones que a lo largo de la historia se han descrito con propiedades bactericidas y bacteriostáticas han llevado a la mejora de la cicatrización y la contaminación bacteriana; sin embargo existen sustancias que su potencial bactericida y de biocompatibilidad pueden ser de utilidad en este campo, como es el caso del quitosano, el cual se ha sometido a bastas investigaciones para probar su efecto cicatrizante como lo menciona Martínez Sánchez⁵⁵, sobre el quitosano utilizado, principalmente, para tratar quemaduras y heridas en la piel en pacientes diabéticos. En otra investigación de León K y Santiago J en Perú, 2007⁵⁶ se mencionan las propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico en sangre de grado, en donde se volvieron a probar las propiedades cicatrizantes y antibacterianas de este por efecto de radiación gamma específicamente en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, con resultados aceptables dentro de su absorbanza. Posteriormente en Madrid 2010, R. Harris, mediante su investigación con el quitosano como biopolímero para liberación de fármacos, como un agente biocompatible y biodegradable, en la cual estableció por primera vez la dosis letal (DL50) del quitosano en un conjunto de animales de prueba y está fue determinada a 16g/kg; sin embargo solo fue calculada en caso de vía sistémica, y no se obtuvo por líneas celulares o tejidos, llámese piel o mucosa. A pesar de estas grandes investigaciones, no se obtuvo ninguna concentración óptima establecida específicamente para no producir toxicidad.³ Más recientemente, en México 2013, Amada Escobedo-Lozano, *et. al*; crearon un gel biodegradable a base de quitosano con efecto cicatrizante, el cual se elaboró pensando en los pacientes quemados con altos grados de afección dérmica y en paciente diabéticos en quienes la cicatrización llega a verse afectada al grados agravantes, y en quienes constantemente se debe recurrir a injertos de piel,⁵ ya que como se sabe según estadísticas mencionadas en estas y otras investigaciones, México es caracterizado por ser uno de los países con más costas y producción de crustáceos, de donde se puede obtener este biopolímero natural. Sin embargo, esta investigación solo fue diseñada en piel, y tampoco referenciaba niveles citotóxicos al contacto con ella.^{3,5} En base a ello y con la necesidad de promover nuevas técnicas en regeneración para la mucosa oral, que sean diferentes a los injertos llámese autólogos o heterólogos; mediante un biopolímero como el quitosano, con características aptas para ser usadas en el ser humano, es de alta importancia, sobre todo para la odontología regenerativa y la cirugía bucal, pues esto abre un grande panorama en la regeneración tisular y en el área de la odontología. Debido a

esto, en la ENES Unidad León de la UNAM, nos dimos a la tarea de probar, investigar y estandarizar, los efectos de citotoxicidad del quitosano en contacto con fibroblastos gingivales humanos, células pulpares humanas y osteoblastos de ratón, las dos primeras, más comunes en cavidad oral, que como resultados se logró, establecer una concentración de citotoxicidad media del quitosano (CC_{50}) del 0.19%, al contacto con estas líneas celulares *in vitro*, en donde no solo se probaron solas en disolución, sino también en gelatinas hemostáticas⁶⁰ con la finalidad de probarlas en futuras formulaciones, como geles biodegradables o incluso andamios de colágena para probables usos en cirugía oral y maxilofacial, lo cual, puede ayudar clínicamente su uso, no solo como cicatrizante, sino como un potente agente antimicrobiano, bactericida/bacteriostático y hemostático. En esta investigación, como un agente natural con propiedades antiinflamatorias probadas, que pueden ayudar a disminuir el periodo de inflamación postquirúrgico sin que sea afectada su cicatrización, sin dejar de recordar que estamos aprovechando nuestros recursos naturales producidos en México, y el costo-beneficio del paciente y del sector salud, podría aumentar exponencialmente al disminuir el costo de los tratamientos con la ventaja de la materia prima producida en nuestro país. Como se mencionó en nuestras hipótesis, a concentraciones mayores de 0.19% de quitosano en contacto con células pulpares humanas (HPC), fibroblastos gingivales humanos (HGF) y osteoblastos de ratón (MC3T3-E1), produce efectos citotóxicos, sin embargo a concentraciones $\leq 0.19\%$ la viabilidad celular es mayor en estas líneas celulares, en donde al mismo tiempo sus características de biopolímero natural se siguen manteniendo, así como su recién conocido efecto antiinflamatorio. El crear futuras formulaciones en base a todas estas investigación realizadas en torno al uso del quitosano en la industria médica y ahora dental, puede favorecer bastante a la mejora y renovación de la industria de tejidos y regeneración tisular; así como brindarle al paciente que lo requiera una alternativa segura y costeable para cualquier tipo de afección que conlleve a su cicatrización, llámese cirugía bucal, periodontal, implantología o alguna otra que involucre la necesidad de un injerto con características optimas y seguras para llevar a cabo dicho tratamiento. Algunas limitantes que se presentaron en torno a esta investigación fueron la obtención de las biopsias para realizar los cultivos celulares, en donde el tiempo de obtención junto con el de incubación fue extenso, así como algunas cajas de cultivos contaminadas que se tuvieron que desechar y volver a repetir el experimento, por lo que la el cronograma de actividades se tuvo que alargar hasta que estas tuvieran su crecimiento optimo, otra limitante fueron los recursos materiales usados y su adquisición, a lo que posteriormente el proyecto PAPIIT-PAPIT IA204516 nos otorgó apoyo para continuar con nuestra investigación. Para las pruebas para actividad pro inflamatoria, se utilizó solo un kit Parameter™ (R&D Systems™ a biotechne brand) donde solo se pudieron incluir muestras de las células que presentaron

mayor sensibilidad al quitosano, puesto que no había suficiente para incluir las otras dos líneas celulares.

11. Conclusiones

Esta serie de experimentos dentro de nuestra investigación, arrojaron los resultados de las pruebas hechas en cada uno de ellos donde pudimos dar veracidad a nuestro objetivo general, en donde planteamos la posibilidad de los efectos citotóxicos y pro inflamatorios del quitosano en cultivos celulares de las líneas celulares de Células Pulpares Humanas (HPC), Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) y Osteoblastos de Ratón (MC3T3-E1), para uso en odontología a base de un andamio de gelatina hemostática. Invariablemente mediante pruebas de citotoxicidad en las tres líneas celulares pudimos observar la viabilidad celular y la concentración de citotoxicidad máxima en cada una, encontrando una media establecida de esta (CC50) de 0.19% , lo cual nos indica que el quitosano a concentraciones arriba de este porcentaje puede inducir a muerte celular o disminución de la viabilidad celular en contacto directo con cualquiera de estas líneas celulares, sin embargo; a concentraciones menores o iguales a esta induce a la viabilidad celular y no causa citotoxicidad. Posteriormente, al realizar estas mismas pruebas con el andamio de gelatina hemostática Spongostand®, pudimos observar las líneas celulares con mayor y menor resistencia al contacto con el quitosano al 0.19%, lo cual nos llevó al último experimento mediante análisis de ELISA, donde comprobamos que el quitosano a esta concentración aparte de ser bactericida, bacteriostático, no toxico, cicatrizante y hemostático; también posee **efecto antiinflamatorio** al contacto con estas líneas celulares, específicamente Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF), dentro de lo cual nos abre un panorama a continuar investigando este biopolímero para poderlo usar en formulaciones futuras que puedan fortalecer el área odontológica desde una perspectiva nueva en la regeneración de tejidos e injertos, no solamente como biopolímero natural, sino también en conjunto con algunos otros biomateriales que puedan interactuar con este y con las mismas células, ofreciendo una mejora en la regeneración de algún tejido faltante o dañado a mejor costo, de buena calidad y natural; ya que como se pudo observar indagando en bastan investigaciones antes mencionadas, no se había establecido un porcentaje de citotoxicidad anteriormente y de la misma manera, no se había probado su efecto antiinflamario, puesto que no existían reportes de ello. Esto es un avance importante en la utilización de los biomateriales usados en odontología, pues mediante ello podemos encontrar bastantes aplicaciones que podemos utilizar y no sabíamos.

Invariablemente, la ingeniería tisular a lo largo del tiempo ha evolucionado a grados magníficos, sin embargo; el constante estudio de biomateriales ya usados en otras áreas para uso en alguna otra, como la odontología; es de basta importancia, ya que de esta manera, se pueden crear nuevas formulaciones y realizar nuevas investigaciones que ayuden a mejorar las diferentes áreas que esta engloba, ofreciendo a todo paciente un material de buena calidad, y de bajo costo para poder rehabilitarse, cumpliendo con los criterios de la odontología regenerativa y protésica.

12. Bibliografía

1. H. Hirano, Y. Seino, Akiyama, Y. Nonaka, Quitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in: C.G. Gebelein and R.L. Dunn (Eds.), Progress in Biomedical Polymers,
2. E. Agulló, R. Mato, C. Peniche, C. Tapia, A. Heras, J. San Román, W. Arquëlles, F. Goycoolea, A. Mayorga, J. Nakamatsu, A.P. de Abram, Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, 2004. Plenum Press, New York, 1990.
3. Harris R, Quitosano, Un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España 2009.
4. ATCC, American Type Culture Collection. www.atcc.org/Products/All/CRL-2593
5. Martinez-Sanchez.H, Escobedo A, Vazquez A, et. Elaboracion de un gel biodegradable a base de quitosano con efecto cicatrizante. Instituto Tecnológico de Mazatlan. Mazatlan, Mexico 2013.
6. Cerón D Salvador, Echeverría A. Jorge, Torres G. Karen. Propuesta De Automatización Y Control Para Un Proceso De Obtención De Un Polímero Biodegradable Llamado "Quitosano". Mexico D.F 2010, Instituto Politecnico Nacional.
7. Bello S.A., Peña J, Estrada L, E., Fontanilla M.R. Sustitutos de la mucosa oral, creados mediante ingeniería tisular: una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral. Revista CES Odontología. Volumen 14, 2001. Pág. 55-64.
8. Ophof R, Van Reheden REM, Von den Hoff JW, Schalkwijk J, Kuiipers-Jagtman AM. Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. Biomaterials 2002; 23:3741-48.
9. Garner, Warren L. Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. Plastic and Reconstructive Surgery. 1998, 102,(1): 135-139.
10. Squier C.A., Finkelstein M.W., ORAL MUCOSA In: Oral Histology, Development, Structure and Function. 6th edition. 2003. Edited by: Strassburg, M Quintessence Books, Pág. 20-27.
11. Pastor, A. Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Peru 2004.
12. I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, Current Chemical Biology 3 (2) (2009) 203-230.
13. Wang T., Turhan M., Gunasekaran S., Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly (vinyl alcohol) hydrogel, Polym Int., 2004; 53: 911–918.

14. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000; 28 (Supl):N312.
15. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press;1996. p. 51-67
16. Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* Año 1993; 8, Pág: 129-137.
17. Bello S.A. 2002.Desarrollo y caracterización de tejido conectivo artificial de mucosa oral . Bogota D.C., 76 p. Trabajo de grado (Magister en Ciencias-Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
18. Cohen, Stephen, Burns, Richard C. *PATHWAYS OF THE PULP*. 8th. ed. Mosby. St Louis. 2002. 1031 pp
19. Abramovich, Abraham. *HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA DENTARIA*. Mundi, Buenos Aires, 1984. Pág. 70-89
20. Ferraris ME, Campos A. *Histología y Embriología Bucodental*. Ed. Panamericana. Madrid. 2002. Pág: 47-59; 86-108.
21. Pedromo-Díaz A. Metodología sobre obtención de muestra, cultivo y caracterización in vitro de células madre mesenquimales humanas, obtenidas de la pulpa de dientes permanentes. Revisión narrativa de la literatura. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia. 2014.
22. Agnieszka A, Songtao S, Gronthos S. *Dental pulp stem cells*. Bone and cáncer laboratorios. Australia, 2015.
23. Weine, Franklin. *ENDODONTIC THERAPY*. The C.V. Mosby Co. 6th. ed. Saint Louis. 2004. 630 pp
24. Genser Finn. Tejido Óseo. En *Histología*. Panamericana. Argentina 2008. Pág. 268-276
25. Gorlin Robert J., Goldman Henry M. THOMA, *Patología Oral*, SALVAT Editores, 1a edición 1975, Barcelona, Pág. 438-452, 849-60.
26. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993;91:1888-96
27. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19
28. Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 143-51.

29. Ueda M, Ebata K, Kaneda T. In vitro Fabrication of Bioartificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: Basic research and clinical application. *Ann Plast Surg.* 1991; Pág.: 540-549.
30. ATCC, American Type Culture Collection. Cell Lines. www.atcc.org/Products/All/CRL-2593.aspx
31. Pastor, A. Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Peru 2004.
32. I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology* 3 (2) (2009) 203-230.
33. Unidad de Cultivos celulares, Universidad de Malaga. www.scai.uma.es/servicios/ciencias_vida/cce/cce
34. Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* Año 1993; 8, Pág: 129-137.
35. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology.* San Diego, California: Academic Press;1996. p. 51-67.
36. Gómez de Ferraris. *Histología y Embriología Bucodental.* Edit. Medico Panamericana, España, 1999, pág. 174-193
37. Ueda M, Ebata K, Kaneda T. In vitro Fabrication of Bioartificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: Basic research and clinical application. *Ann Plast Surg.* 1991; Pág.: 540-549.
38. <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>
39. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
40. Lin E, Calvano SE, Lowry SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 2000;127:117-126.
41. Zhang JM, An J – Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007;45:27-37.
42. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA et al. – Cytokines for surgeons. *Am J Surg*, 2002;183:268-273.
43. Wolf G, Livshits D, Beilin B et al. – Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain Behav Immun*, 2008;22:1072-1077.

44. Wang D, et al. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.* 14: 893-903, 1999.
45. Revista MedWave. www.medwave.cl
46. Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E₂. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;137:404-410.
47. Evans SW, Whicher JT. An overview of the inflammatory process. En: Whicher JT, Evans SW, ed. *Biochemistry of inflammation*. Londres: Kluwer Academic Publishers, 1992:1-17
48. Prostaglandin E₂ (R&D Systems™ a biotechne brand)
49. Medigraphic Dinoprostona. www.prostaglandina.com/dinoprostona_pge2
50. Berkovitz B.K.B., Holand G.R., Moxham B.J. Atlas en color y texto de Anatomía Oral, Histología y Embriología, Movi/Doyma Libros, Madrid,1992, Pág. 199-210.
51. Shabana AH, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Cytokeratine patterns of human oral mucosae in histiotypic culture. *Arch Oral Biol* 1991;36: Pág:747-758.
52. Dolci E, Gay Escoda C, Arnabat Domínguez J. La prevención de la Alveolitis seca. *Rev Eur Odontol Estomatol* 1992; 5:261-70.
53. Iruretayuyena M. Alveolitis en la consulta dental. Salud dental para todos [en Internet]. 2003 [citado 21 feb 2004]
54. Amado Montoya PA, Muñoz Suárez DI. Incidencia de la alveolitis después de la extracción de terceros molares mandibulares. *CES Odontol* 1993; 6(2):127-31.
55. Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater.* 2002; 18: 1-8.
56. Sanz M, Herrera D, Martínez A, López JL, Aguirre JM, García MJ, et al. Estudio clínico comparativo de la eficacia de azitromicina frente a amoxicilina/ac clavulánico en el tratamiento de infecciones orales agudas. *RCOE* 2001; 6: 387-94
57. Pastor, A. Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Peru 2004
58. Tsukinoki K, Miyoshi Y, Aoki T, Karakida K, Ohta Y, Kaneko A, Ueyama Y, Watanabe Y. In vivo experimental model of human gingival mucosa using immunodeficient mice. *J Periodontal Res.* 2007; 42(4):294-9.
59. Leon K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de Quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sabgre de grado. *Rev.Soc.Quim, Peru* 2007.
60. Manual de uso Spongostand/pdf.
61. Protocolo and Applications Guide. Cell Viability. Promega Corporation 2008.

62. S.Y.Wong, G.Weiner. Complement and celular cytotoxicity in antibiotic therapy of cáncer. Expert Opinion on Biological Therapy. Volumen 8, 2008.

63. Castro de Pardo C. Pruebas de tamizaje para detectar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando las prueba de MTT. Facultad de Medicina; Universidad San Martin, Bogota, Colombia. Diciembre 2006.

13. Anexos

Anexo 1

Reconocimiento por parte de la Academia Nacional de Medicina de México, A.C por participación en el **XLIV Congreso Nacional “Temas de Controversia en Salud”**, como expositor en concurso de carteles a nivel Investigación.

León, Gto 7 de octubre 2016.



La Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a Joseline Narvaez Flores, Gabriela Vilar Pineda,
Laura Acosta-Torres y René García-Contreras.

Por haber participado en la exposición de Carteles con el trabajo titulado:
“Efectos del Quitosano en cultivo celular para odontología regenerativa.”

Concurso de Carteles 2016

XLIV Congreso Nacional

“Temas de Controversia en Salud”

León, Guanajuato, del 05 al 07 de octubre de 2016

Dr. Fabio Salamanca Gómez

Dr. Enrique Graue Wiechers

Dra. Teresita Corona Vázquez

Anexo 2

Reconocimiento por parte del comité del “**Congreso Internacional de la Expo Dental ARIC 2016**”, por participación y exposición oral como ponente en el área de Investigación, celebrado el 12 de octubre del 2016 en Guadalajara, Jalisco.

The certificate is issued by the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León. It recognizes the academic participation of Joseline Narvaez-Flores in an oral presentation titled "Efectos del quitosano en cultivos celulares para odontología regenerativa" at the PRE-CONGRESO ENES UNAM Unidad León, held on October 12, 2016, in Guadalajara, Jalisco. The certificate is signed by Mtro. Javier de la Fuente Hernández, Director, and Mtra. Gabriela Vilar Pineda, Jefe de División de Educación Continua e Intercambio Académico. The background features the UNAM logo and the motto "Por mi raza hablará el espíritu".

Universidad Nacional Autónoma de México
Escuela Nacional de Estudios Superiores
Unidad León

Otorga la presente

Constancia

A: **Joseline Narvaez-Flores**

Coautores: Gabriela Vilar-Pineda
Laura Acosta-Torres
René García-Contreras

Por su participación académica con la presentación oral titulada:

Efectos del quitosano en cultivos celulares para odontología regenerativa

en el:

PRE-CONGRESO ENES UNAM Unidad León,
en el marco de Expo Aric Dental 2016

12 de octubre de 2016
Guadalajara, Jalisco.

"Por mi raza hablará el espíritu"

Mtro. Javier de la Fuente Hernández
Director

Mtra. Gabriela Vilar Pineda
Jefe de División de Educación Continua e
Intercambio Académico

