



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

TÍTULO:

**“Estandarización de un método de cultivo primario de
fibroblastos gingivales humanos, estudio *in vitro*”**

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

Méndez Vázquez Alejandra Gisela



TUTOR: Mtra. Gabriela Vilar Pineda

ASESOR: Dr. René García Contreras

LEON, GTO. JUNIO 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Contenido

1.	Dedicatorias	4
2.	Agradecimientos	5
3.	Resumen	6
4.	Introducción	7
CAPÍTULO 1		8
5.	Marco teórico	9
5.1	Ingeniería de tejidos	9
5.2	Cultivos celulares	10
5.3	Técnicas de Cultivo Celular	11
5.4	Medios de cultivo celular	12
5.5	DMEM	12
5.6	α -MEM	12
5.7	Suero Fetal Bovino	13
5.8	Glutamina	13
5.9	PBS	13
5.10	Fibroblastos	14
5.11	Estructura del fibroblasto	15
5.12	Regeneración de tejidos.	16
5.13	Antecedentes:	17
6.	Planteamiento del Problema	21
7.	Pregunta de investigación	22
8.	Justificación	23
9.	Objetivos	24
9.1	Objetivo general	24
9.2	Objetivos específicos	24
10.	Hipótesis	25
10.1	Hipótesis de investigación	25
10.2	Hipótesis nula	25
11.	Marco metodológico	27
11.1	Universo de estudio/Muestra:	27
11.2	Criterios de Selección de la muestra:	27
11.3	Criterios de inclusión	27
11.4	Criterios de exclusión	27
11.5	Criterios de eliminación	27

11.6	Variables de estudios	28
11.6.1	Variables dependientes	28
11.6.2	Variantes independientes	29
11.7	Diseño experimental	30
12.	Materiales y métodos	32
12.1	Materiales	32
12.2	Muestra:	32
12.3	Instrumental	32
12.4	Insumos	32
12.5	Autorización	32
12.6	Implicaciones Bioéticas	33
13.	Desarrollo de la metodología	35
13.1	Obtención de muestras	35
13.2	Almacenamiento y tratamiento de las muestras	35
13.3	Cultivo celular primario	36
13.4	Subcultivo celular	38
13.5	Recuento celular y comparación de medio de cultivo	40
13.6	Criopreservación celular	41
14.	Análisis y representación de los datos	42
15.	Resultados	44
16.	Discusión	47
17.	Conclusiones	48
18.	Bibliografía	49

1. Dedicatorias

A mis profesores que compartieron sus enseñanzas y su tiempo para impulsar el desarrollo de mi futuro.

A Dios por darme la oportunidad de seguir viviendo, de llenarme de amor y felicidad, concederme la fuerza y compañía para lograr mis metas. A mi eterno maestro, mi señor todopoderoso, mi verdadero motivo a todo, gracias a él, por las incontables bendiciones que me ha dado en la vida.

A mis padres, por su gran amor, cariño y enseñanzas, motivarme a seguir estudiando, enderezar mi camino, educarme y hacer de mi una mejor persona. A su paciencia y comprensión, por sacrificar su tiempo y dinero para que yo pudiera desarrollarme profesionalmente.

A mis hermanos, por creer en mí, por estar siempre conmigo, apoyarme en todo momento, por estar conmigo en los momentos más difíciles, por hacerme sentir amada y por llenar de felicidad cada día de mi vida.

A mis amigos, Lalo, Isela, Victoria, Itzel, Manuel, Diana, Monse, Mariel, Gaby, Mayra, Karen, Bety, por darme su amistad, su confianza, su apoyo, por ser mis amigos, mis hermanos que nunca fallan. Gracias por compartir momentos de regaños, logros, tristezas y alegrías, agradezco infinitamente a Dios por ponernos en mi camino. Ángel, que durante mi etapa universitaria mostró ser un buen amigo, noble y agradezco cada momento que pasamos juntos, por compartir tus conocimientos y apoyarme.

2. Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, por darme un lugar y abrirme las puertas en la mejor Universidad de México.

A mi tutora Mtra. Gabriela Vilar por confiar en mí, por darme un gran apoyo y motivación para seguir estudiando, siempre estaré agradecida con usted, es una persona que aprecio y quiero mucho.

Al Dr. René García. Agradezco mucho por su confianza, paciencia y dedicación a lo largo de la realización de este proyecto. Siempre será una persona la cual tenga mi profunda estimación, admiración y respeto.

Al Dr. Alberto Flores Longoria, por compartir sus conocimientos con tanto amor y pasión, lo admiro mucho y es un gran ejemplo a seguir.

A todos mis profesores por compartir sus conocimientos, ánimos que me inspiran a seguir adelante.

A mis pacientes, que confiaron en mis conocimientos y habilidades.

Al personal del Área de Nanoestructuras y Biomateriales, por su disposición y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A los proyectos de investigación que permitieron el financiamiento: Proyectos DGAPA UNAM PAPIIT: IA204516 y PAPIME: PE201617.

3. Resumen

Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que es posible estudiar los procesos fisiológicos permitiendo crear un amplio campo de estudio para las posibles aplicaciones en la ingeniería tisular. Se ha logrado aislar y cultivar fibroblastos gingivales humanos obtenidos de la mucosa oral. **Objetivos:** Establecer un protocolo estandarizado en la ENES, UNAM Unidad León, para el cultivo de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* de tejido gingival. **Materiales y métodos:** 10 explantes de 1 x1 mm de biopsias de tejido gingival obtenidas de las cirugías de terceros molares, las cuales fueron lavadas tres veces con PBS; 5 de ellas fueron incubadas con Tripsina al 0.025% durante 60 minutos a 37 °C. Fueron cultivadas con medio DMEM adicionado con 20% de Suero Fetal Bovino, 1% de Glutamax y 1% de antibiótico e incubado por una semana a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Al tener una confluencia celular mayor a 80% las células fueron desprendidas enzimáticamente y subcultivadas en nuevos platos de cultivo. La capacidad de proliferación celular fue evaluada de 0 a 96 horas con dos medios de cultivo α-MEM y DMEM. La criopreservación celular fue a -80 °C y se realizó cuando la confluencia celular fue mayor del 80%. **Resultados:** Se observó una disgregación celular emigrando desde la superficie de los explantes con células dispuestas, dispersas y adheridas al fondo del plato, mostrando una morfología característica de fibroblasto, posterior a 5 días de su incubación y una confluencia celular mayor al 80% a los 21 días. El estudio de viabilidad y proliferación celular demostró que los medios DMEM y α-MEM tienen el mismo grado de éxito. **Conclusiones:** La técnica de cultivo celular por disgregación enzimática con Tripsina-EDTA resultó ser una excelente opción para los cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos.

4. Introducción

La ingeniería de tejidos es un campo relativamente nuevo que utiliza células vivas, materiales biocompatibles, factores bioquímicos y físicos, así como la combinación de las mismas, para crear estructuras similares a los tejidos.¹

Actualmente, los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener poblaciones celulares mantenidas y multiplicadas *in vitro*. Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos fisiológicos y comportamientos celulares para así crear materiales, los cuales ayuden a restaurar la funcionalidad total o parcial de tejidos dañados por traumatismos o patologías.²

El cultivo de células epiteliales o dérmicas para elaborar coberturas de heridas ha sido estudiado desde hace muchos años, logrando tener cultivos tridimensionales que imitan la piel o mucosa oral, empleando varios procedimientos desarrollados gracias a la habilidad de cultivar *in vitro* células de fibroblastos y queratinocitos.³

En la última década, ha surgido gran interés en producir pseudo dermis que contenga elementos estructurales y celulares como los fibroblastos, células fundamentales para el rápido crecimiento de los queratinocitos, que conforman la dermis y están involucrados en la formación de la matriz extracelular.⁴

El fibroblasto es la célula más común y menos especializada del tejido conjuntivo; se encarga de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular. Es imprescindible para mantener la integridad del tejido conjuntivo y 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. También se encarga de sintetizar los precursores de la matriz extracelular como son el colágeno, sustancia amorfa, proteínas fibrosas de la sustancia amorfa y fibras elásticas.⁵

El objetivo de la presente investigación es estandarizar un método de cultivo de tejido primario de fibroblastos gingivales humanos (del inglés, HGF) obtenidos por biopsia de pacientes que acuden a las clínicas de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León de la UNAM.

CAPÍTULO 1

5. Marco teórico

5.1 Ingeniería de tejidos

Se conoce como ingeniería tisular al área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, la manipulación del entorno extracelular, la creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo. La intención es reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido.³

La regeneración tisular es la respuesta que lleva a cabo el organismo a 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.⁶

En las últimas décadas, el cultivo y proliferación de fibroblastos humanos ha emergido como una herramienta para la expansión celular y la formación de epitelio, contribuyendo al desarrollo de nuevas tecnologías como la ingeniería de tejidos y la terapia génica.^{6,7}

Cada año, más de 500,000 procedimientos de injertos se llevan a cabo para tratar de restablecer la funcionalidad posterior a las lesiones como fracturas óseas, lesiones relacionadas que resultan de una variedad de causas quirúrgicas, degenerativas, patologías y traumáticas que pueden resultar incapacitantes o incluso en la pérdida de estabilidad.⁸

Respecto al número de personas afectadas y las consecuencias que han requerido el estudio de alternativas, que busquen los métodos más adecuados para restituir el óptimo desempeño de los tejidos afectados, los cuales han sido influenciados por diferentes terapias como la colocación de injertos, materiales aloplásticos y la tecnología de la ingeniería tisular.⁶

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.⁶

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.⁹

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.^{4,9}

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 de regeneración.⁹

Estas terapias regenerativas actuales son influenciadas por el desarrollo embrionario, la biología de las células troncales y la ingeniería tisular. Estas han desarrollado terapias para la reconstrucción tisular, a base de biomateriales de relleno y membranas de sostén, que se pretende sean biocompatibles, de bajo costo y completamente reabsorbibles, de manera en que se sustituyan por tejido neoformado y regenerado, así como también se pretende que sean estables, para que permanezcan en el sitio por un período no menor a 16 semanas. Los materiales utilizados son variables dependiendo, en nuestro caso; al tipo de tejido a regenerar.^{9,10}

5.2 Cultivos celulares

La importancia de los cultivos celulares radica en obtener modelos que puedan replicar la fisiología celular, permitiendo una detallada observación y comprensión de los distintos fenómenos biológicos, moleculares y estructurales; con base en dichos estudios desarrollar métodos innovadores acorde a las necesidades actuales en el ámbito de la medicina, ofreciendo con ello nuevas alternativas terapéuticas.¹¹

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.^{12, 13}

Se han formulado medios para cultivar estas células, sin embargo, por lo general los medios de cultivo y su eficacia son más caros en relación con los medios suplementarios que se han definido por investigadores. Los medios están suplementados por Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suero fetal bovino (FBS del inglés fetal bovine serum) y antibióticos¹⁴

Cuando un cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído recibe el nombre de Cultivo Primario; y, cuando este Cultivo Primario es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de Línea Celular.^{13, 15}

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.^{12, 15}

5.3 Técnicas de Cultivo Celular

Explantos Primarios: Están constituidos por fragmentos pequeños de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie en la que generalmente crecen las células de la periferia del explante. Es útil para pequeñas cantidades de tejidos, como biopsias de piel.¹¹

Cultivo de células disgregadas: Este tipo de cultivo está formado por células dispersas disgregadas de un tejido vivo, de un cultivo primario, o de una línea celular, mediante distintos sistemas mecánicos, químicos o enzimáticos (Figura1). Las células crecen en suspensión o adheridas a una superficie. Es el tipo de cultivo más utilizado en la actualidad debido a su capacidad de propagación, es decir de crecimiento mantenido.¹³

Mecanismo de disgregación enzimática con tripsina: Pequeñas porciones de tejido se incuban con tripsina a 37 °C y las células disociadas deben recolectarse por centrifugación cada media hora. La tripsina se neutraliza con suero en medio de cultivo.¹³

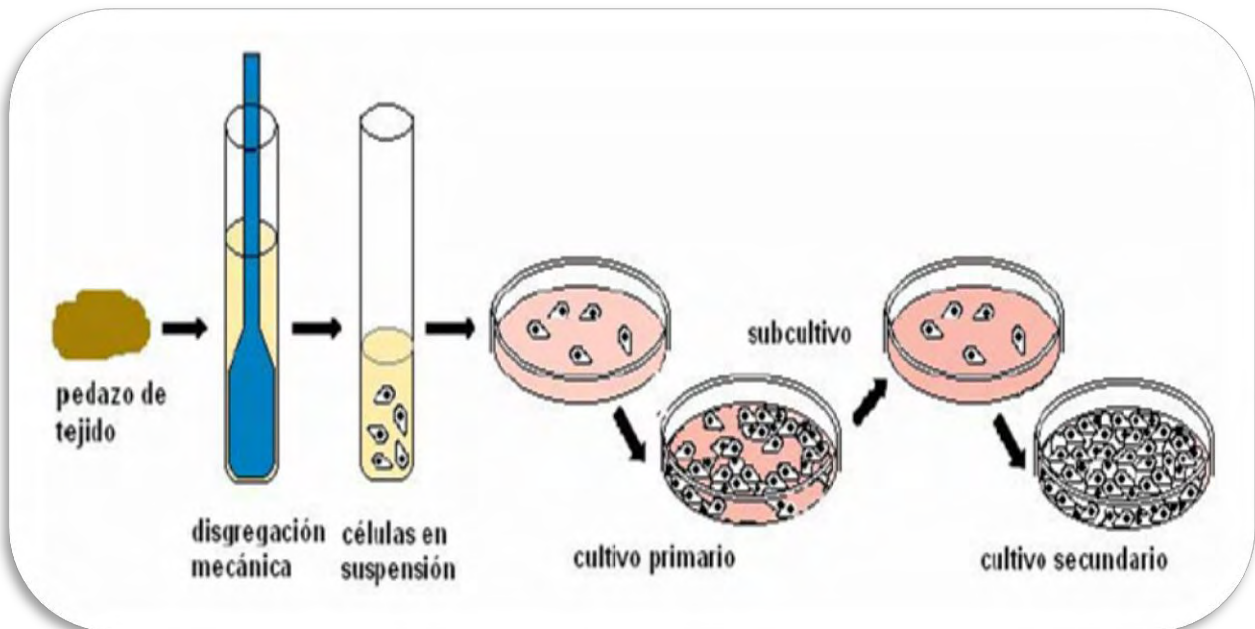


Figura.1 Esquema de cultivo de fibroblastos gingivales. Fuente: Volponi A. Adult Human Gingival Ehitelial cells. Source . 2013.

5.4 Medios de cultivo celular

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas, y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello consideraremos que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos: la naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio, la naturaleza y composición de la fase gaseosa y, las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.¹⁵

5.5 DMEM

DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Figura 2) es un medio ampliamente utilizado para soportar el crecimiento de muchas células diferentes de mamíferos. Las células cultivadas con éxito en DMEM incluyen fibroblastos primarios, neuronas, células gliales, células de músculo liso, así como líneas celulares tales como HeLa.

Contiene 4 veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el medio esencial mínimo de Eagle original. El DMEM se formuló originalmente con glucosa baja (1 g /L) y piruvato sódico, pero se usa a menudo con niveles de glucosa más altos, con o sin piruvato sódico. La fórmula original DMEM contiene 1,000 mg/L de glucosa y se informó primero para el cultivo de células de ratón embrionarias.¹⁷



Figura 2. Medio DMEM.

Fuente: directa

5.6 α -MEM

La modificación α -MEM (Figura 3) es uno de los medios sintéticos más utilizados para el cultivo celular, que contiene aminoácidos esenciales y no esenciales, piruvato de sodio y vitaminas adicionales. La formulación contiene la adición de desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos.¹⁷



Figura 3. Medio de cultivo α -MEM. Fuente: directa

5.7 Suero Fetal Bovino

El suero fetal bovino (Figura 4) se utiliza comúnmente como suplemento a los medios de cultivo celular, debido a que proporciona un amplio espectro de macromoléculas, portadoras de proteínas para sustancias lipídicas y oligoelementos, factores de propagación, nutrientes de bajo peso molecular, hormonas y factores de crecimiento.¹⁸

5.8 Glutamina

La Glutamina (Figura 5) es un aminoácido esencial y componente clave en cultivo celular, actuando como mayor fuente de energía para células propagantes. Para crecimiento celular óptimo requiere suplemento del medio antes de su uso.¹⁷

5.9 PBS

El PBS (Figura 6) se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. Esta solución es empleada comúnmente para lavar células. El PBS puede ser empleado como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida.¹⁹



Figura.4 SFB,
Fuente: directa

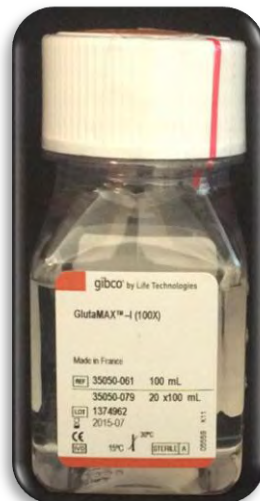


Figura.5 Glutamax,
Fuente: directa



Figura.6 PBS
Fuente: directa

5.10 Fibroblastos

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 y presentan gran capacidad para diferenciarse, dando lugar a otros tipos celulares más especializados de tejido conjuntivo.^{8, 20}

Su función es la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular, 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.^{20,21}

Es una célula de tejido conectivo que tiene un papel esencial en el desarrollo, estructura y sostén de los dientes. Una de sus funciones principales es la formación de fibras extracelulares colágenas, elásticas, reticulares y oxitalánicas, cuyas funciones de contractibilidad y motilidad contribuyen a la organización de estructuras de los tejidos durante el desarrollo y regeneración.²²

Los fibroblastos secretan los precursores de las fibras: Colágenas, reticulares y elásticas.²⁰

También sintetiza los precursores de la matriz extracelular:

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.²³

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.^{6,8}

Los subtipos existentes, los fibroblastos dermales (FD) y gingivales (FG), contienen características morfológicas y funcionales similares; sin embargo, se ha establecido que los FG median la reparación de los tejidos de manera más rápida y con bajo nivel de cicatrización. Esta característica particular de los FG, está asociada a su alta capacidad de replicación y actividad de la telomerasa, que está asociada con la longevidad celular.²⁴ esto ha despertado interés en investigadores por su gran potencial de regeneración tisular.

5.11 Estructura del fibroblasto

El fibroblasto en reposo posee un núcleo pequeño, achatado, teñido, con un citoplasma escaso; mientras el fibroblasto activo presenta un contorno fusiforme, posee un complemento usual de organelas citoplasmáticas en mayor cantidad, con varios complejos de Golgi y muchos perfiles de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y vesículas secretorias además contiene de 1-2 nucleolos.^{20, 22, 25}

Las células se presentan aplanadas, con finas prolongaciones (Figura 7). El citoesqueleto se halla normalmente organizado en haces largos y rectos de microfilamentos laxamente unidos y filamentos individuales que forman una red tridimensional entrecruzada.²⁵

En los procesos de reparación o de naturaleza inflamatoria del tejido conectivo suele variar su morfología, así como el número de sus células y el desarrollo de las organelas en el seno de las mismas.²⁰

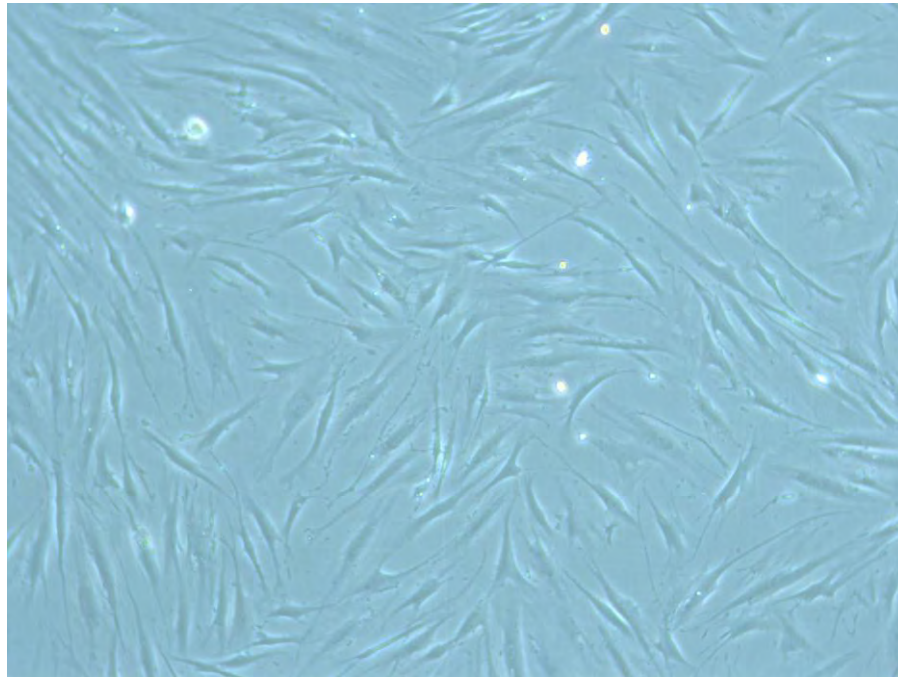


Figura 7. Fibroblastos humanos en la placa de Petri con morfología fusiforme. (100x aumentos).

Fuente: Directa

5.12 Regeneración de tejidos.

Cuando se dio inicio al cultivo de fibroblastos, comenzó una búsqueda en la ingeniería tisular para desarrollar substitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos; haciendo uso de matrices biológicas o aloplásticas reabsorbibles, solas o sembradas con células vivas, para fabricar estructuras tridimensionales que sirvan como material de injerto.¹¹

Los pilares básicos sobre los cuales se sustenta la ingeniería tisular son:

Prevenir una respuesta inmunológica, ya sea inflamación, rechazo o ambas. Crear el sustrato ideal para la supervivencia, desarrollo y diferenciación celular. La utilización de implantes biocompatibles compuestos por moléculas integrantes de la matriz extracelular. Proveer un adecuado medio ambiente para el desarrollo celular y tisular es crucial para mantener la función celular y el desarrollo del tejido neoformado.³

Esta metodología pone también, la aplicación de las técnicas de cultivo celular ya conocidas sobre matrices biodegradables que sirvan de soporte para su injerto en el huésped. Con los éxitos alcanzados con el manejo de células epiteliales se iniciaron los estudios para obtener las condiciones óptimas para el crecimiento, desarrollo y diferenciación en cultivo de diferentes tejidos especializados y tipos celulares, así como su aplicación clínica.²

La reparación y regeneración de tejidos dependerá del uso de polímeros biodegradables, andamios que apoyen, refuercen y organicen la regeneración de tejidos. El andamio se aplica como una matriz portadora de sustancias bioactivadas o células incorporadas; una serie de polímeros naturales y sintéticos están actualmente en uso como andamios de tejidos.²⁶

El aislamiento de células, su adhesión a los andamios bioresorbibles y su proliferación, son los componentes más importantes para los proyectos de ingeniería de tejidos.²⁶

5.13 Antecedentes:

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.¹³

Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días.²⁷

1907 Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales: utilizó técnicas de estudio *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, y demostró el crecimiento de fibras nerviosas en cultivo.²⁷

1910 Burrows: empleó plasma de pollo para nutrir los cultivos embrionarios de pollo.¹³

1913 Carrel: demostró la posibilidad de mantener en cultivo células de embrión de pollo, en condiciones de asepsia, durante un tiempo superior a la vida del animal.²⁸

1916 Rous y Jones: utilizaron por primera vez extractos enriquecidos en tripsina para disociar células de los tejidos.

1948 Sanford y cols: demostraron la formación de clones celulares.

1949 Polge: criopreservación celular a temperaturas bajo cero.¹

1952 Gey y cols: establecieron 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: observaron la inhibición de crecimiento por contacto en fibroblastos.

1955 Eagle: desarrollaron medios definidos y describe factores de adhesión.

1958 Temin y Rubin: desarrollaron un ensayo cuantitativo para la infección de células de pollo en cultivo por el virus del sarcoma de Rous.

1961 Hayflick y Moorhead: usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.²⁹

1962 Buonassisi: publicó los métodos para mantener células diferenciadas.

1965 Harris y Watkins: crean el primer heterocarion de células de mamífero por la fusión inducida por virus de células humanas y de ratón.

1968 Yaffe: estudió la diferenciación de mioblastos normales *in vitro*.

1969 Augusti-Tocco y Sato: establecieron la primera línea celular estable de neuroblastoma, línea de células diferenciadas.

1975 Rheinwald y Green: describieron un método para cultivar láminas de tejido epitelial *in vitro* utilizando como células cebadoras una capa de fibroblastos de ratón (células 3T3) letalmente irradiados, en un medio que contenía suero fetal-bovino y factores de crecimiento celular.^{1, 30}

1976 Sato y cols: publicaron una serie de trabajos que demuestran las distintas necesidades de hormonas y factores de crecimiento que precisan diferentes líneas celulares.²⁷

1977 Wigler y Axel: desarrollaron un método eficiente para introducir una copia simple de genes de mamífero en células en cultivo.

En 1980 Banks-Schelegel y cols: mostraron la viabilidad del epitelio cutáneo obtenido *in vitro*, empleándolo como injerto en animales de experimentación; lo que llevó al perfeccionamiento de estas técnicas haciendo posible la utilización de estos tejidos en el laboratorio, en la práctica clínica.²

1986 Martín y Evans Aíslan: cultivaron células madre embrionarias pluripotenciales del ratón.²⁸

1987 Se adjudicó el término tissue engineering (ingeniería tisular).³¹

1990 Phillips *et al.*: utilizaron fibroblastos cultivados *in vitro*, tratando de dilucidar el papel de los microorganismos y sus productos en la patogénesis de la enfermedad periodontal.²²

1990, De Luca *et al.*: reparación quirúrgica de la piel humana y defecto de la mucosa.²⁸

1990 Langdon *et al.*: reportaron el trasplante de una lámina epitelial a sitios retirados por maxilectomía radical.

1991 Ragoobar y cols.: utilizaron la técnica de cultivo *in vitro* de mucosa oral para cubrir defectos causados durante la realización de vestibuloplastias.³⁰

1992 Bayreuther *et al.*: la proliferación de fibroblastos de biopsias cutáneas han sido relacionadas con la edad cronológica del donante.³¹

1995 Odioso *et al.* desarrollaron un modelo de co-cultivo de queratinocitos y fibroblastos gingivales. Utilizaron de soporte tridimensional para el cultivo de fibroblastos una malla de nylon en lugar de colágeno.³²

1996 Garlick y Fenjves: crearon un método rápido y simple para aislar queratinocitos en la mucosa oral al igual que la piel.²⁸

1997 Tomakidi *et al.*: desarrollaron mayas tridimensionales como modelos para pruebas de compatibilidad con la mucosa oral.³²

1997 Sugimura y *cols.*: investigaron los cambios morfológicos producidos después de trasplantar una lámina cultivada de epitelio oral humano, sobre piel de ratones atímicos.⁵

1999 Izumi *et al.*: utilizaron células de queratinocitos para terapia génica.

CAPÍTULO 2

6. Planteamiento del Problema

En el área de cirugía bucal podemos encontrar problemas importantes, como 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.

En los últimos años los avances en la investigación científica, especialmente en la ingeniería tisular, han propuesto una gama de uso de cultivos celulares para aplicaciones en biomateriales o colocación de injertos. En la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León, de la UNAM se realizan investigaciones para la creación e innovación de biomateriales; sin embargo a la fecha no se cuenta con un protocolo para la obtención y cultivo de fibroblastos gingivales humanos (HGF) a partir de tejido gingival.

La problemática a resolver consiste en formular un método estandarizado de cultivo de fibroblastos gingivales humanos (HGF), los cuales se obtendrán de las muestras de tejido gingival humano, de los pacientes sometidos a odontectomías quirúrgicas de terceros molares inferiores, para la elaboración de futuras investigaciones en la ingeniería tisular.

7. Pregunta de investigación

¿Cuál es el método de estandarización del cultivo de tejido primario de fibroblastos gingivales humanos, obtenidos por biopsia de pacientes que acuden a las clínicas de la ENES, Unidad León de la UNAM?

8. Justificación

Los procedimientos de colocación de injertos, colocación de biomateriales e ingeniería tisular han aumentado exponencialmente cada año; dichos injertos se llevan a cabo para tratar de restablecer la funcionalidad de lesiones tisulares que resultan de diversas causas: quirúrgicas, degenerativas, patologías o traumáticas que pueden resultar incapacitantes.

Los fibroblastos tienen un gran potencial en regeneración de tejidos, ya que están involucrados en los procesos de cicatrización cuando ocurre un daño tisular. Los estudios de vanguardia, en relación con 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.

Por lo anterior, para ser consideradas como una posible alternativa terapéutica clínica, el aislamiento y cultivo de fibroblastos gingivales humanos debe ser estandarizado y totalmente reproducible. Este protocolo nos permitirá realizar cultivos celulares que en un futuro próximo servirán como base para formulaciones que permitan la regeneración tisular. Contando con un proyecto sustentado en las consideraciones bioéticas, científicas, tecnológicas y sociales que demanda la investigación del siglo XXI.

9. Objetivos

9.1 Objetivo general

Establecer un protocolo estandarizado y un método de cultivo de fibroblastos gingivales humanos (del inglés, HGF) *in vitro* de tejido gingival de pacientes que acuden a las clínicas de la ENES, Unidad León de la UNAM.

9.2 Objetivos específicos

- I. Comparar las técnicas de cultivo, disgregación enzimática con Tripsina-EDTA y explantes, que muestren mejores resultados para el establecimiento celular hasta lograr una confluencia del 80% de la población celular.
- II. Identificar el medio de cultivo ideal para la preservación de cultivos celulares de fibroblastos entre el medio α -MEM y DMEM.
- III. Cuantificar de forma exponencial el número de células cultivadas con el medio α -MEM y DMEM.
- IV. Criopreservar en criotubos los fibroblastos gingivales primarios para futuras investigaciones en su división celular menor a 4 PDL y tener biodisponibilidad en stock.

10. Hipótesis

10.1 Hipótesis de investigación

Los cultivos celulares de HGF tienen un éxito mayor al 50% con la técnica de cultivo por disgregación enzimática con el uso de DMEM + 20% de suero fetal bovino + 2% de antibiótico + 1% de glutamina, en comparación con la técnica de cultivo de explantes.

10.2 Hipótesis nula

Los cultivos celulares de HGF tienen un éxito menor o igual al 50% con la técnica de cultivo por disgregación enzimática con el uso de DMEM + 20% de suero fetal bovino + 2% de antibiótico + 1% de glutamina, en comparación con la técnica de cultivo de explantes.

CAPÍTULO 3

11. Marco metodológico

Tipo de estudio: experimental *in vitro*.

Diseño de estudio: puro, descriptivo, prospectivo y comparativo.

11.1 Universo de estudio/Muestra:

Muestra: no probabilística.

Método de muestreo: por cuotas.

Universo de estudio: pacientes que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, Unidad León.

Tamaño de muestra: 10 pacientes, 5 biopsias de tejido gingival por cada tipo de técnica de cultivo.

Densidad celular: número de células orales establecidas de tejido gingival humano cultivadas y para su criopreservación.

11.2 Criterios de Selección de la muestra:

La selección de pacientes se llevará a cabo mediante las siguientes características.

11.3 Criterios de inclusión

- Pacientes entre 18 y 30 años de edad que requieran odontectomías quirúrgicas de terceros molares inferiores, en la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM.
- Sin antecedentes de pericoronitis.
- Sin enfermedades sistémicas.
- Sin toxicomanías.
- Sin presencia de infección.

11.4 Criterios de exclusión

Pacientes que no tengan terceros molares inferiores.

11.5 Criterios de eliminación

- Cirugías que no tengan suficiente tejido gingival libre para biopsia.
- Muestras que entren en contacto con otra superficie antes de ser depositadas en la solución transportadora.
- Pacientes que se nieguen a firmar el consentimiento informado para la participación del estudio.

11.6 Variables de estudios

11.6.1 Variables dependientes

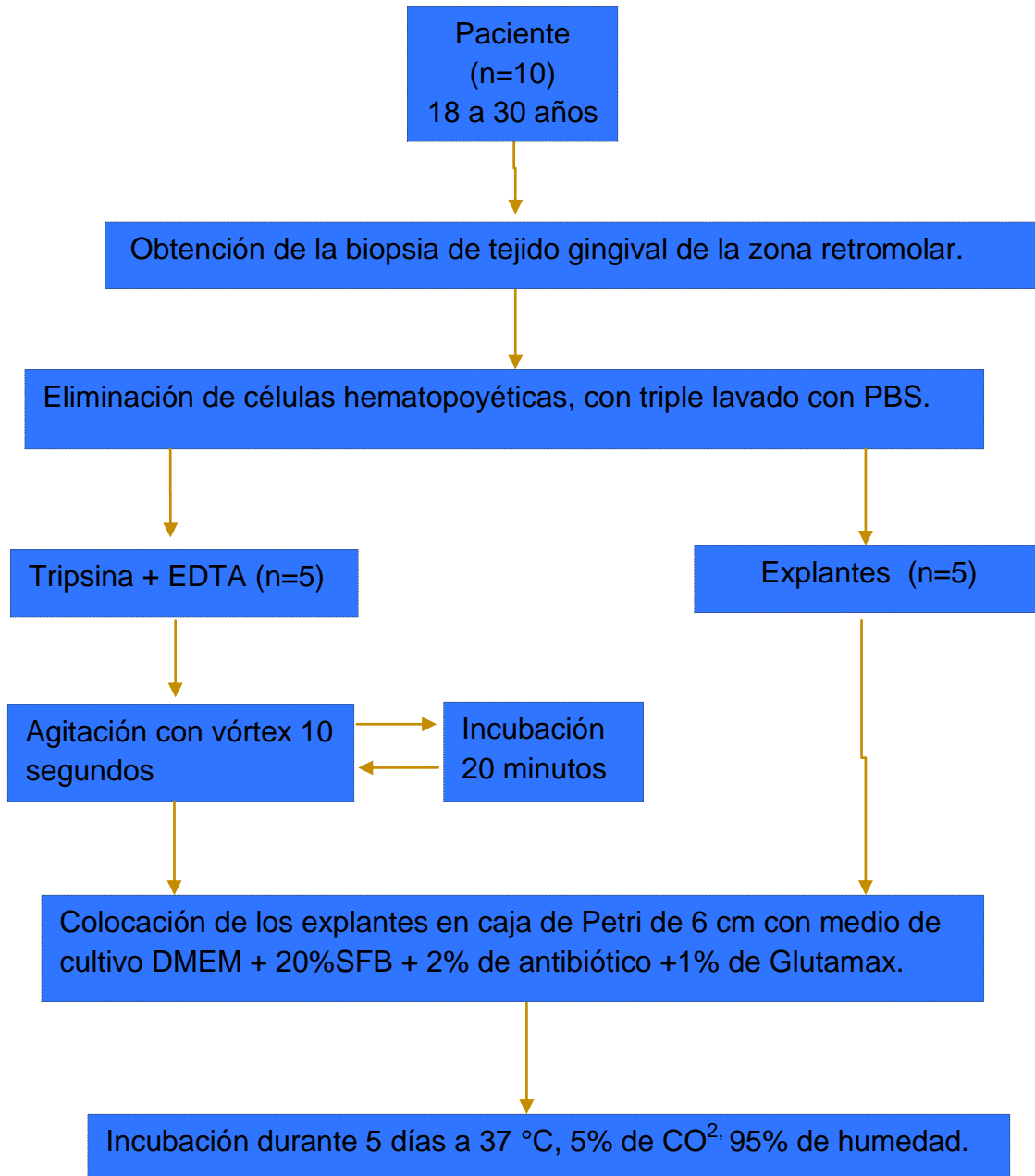
VARIABLE	DEFINICIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	ESCALA Y UNIDAD DE MEDICIÓN
Proliferación celular	Incremento del número de células por división celular, cuantificadas por medio de la actividad mitocondrial celular. ²⁶	Se utilizará el método de conteo celular por hematocitómetro, y se complementará con el método de cuantificación automática.	Cuantitativa discreta	De razones 0---n células/mL.

11.6.2 Variantes independientes

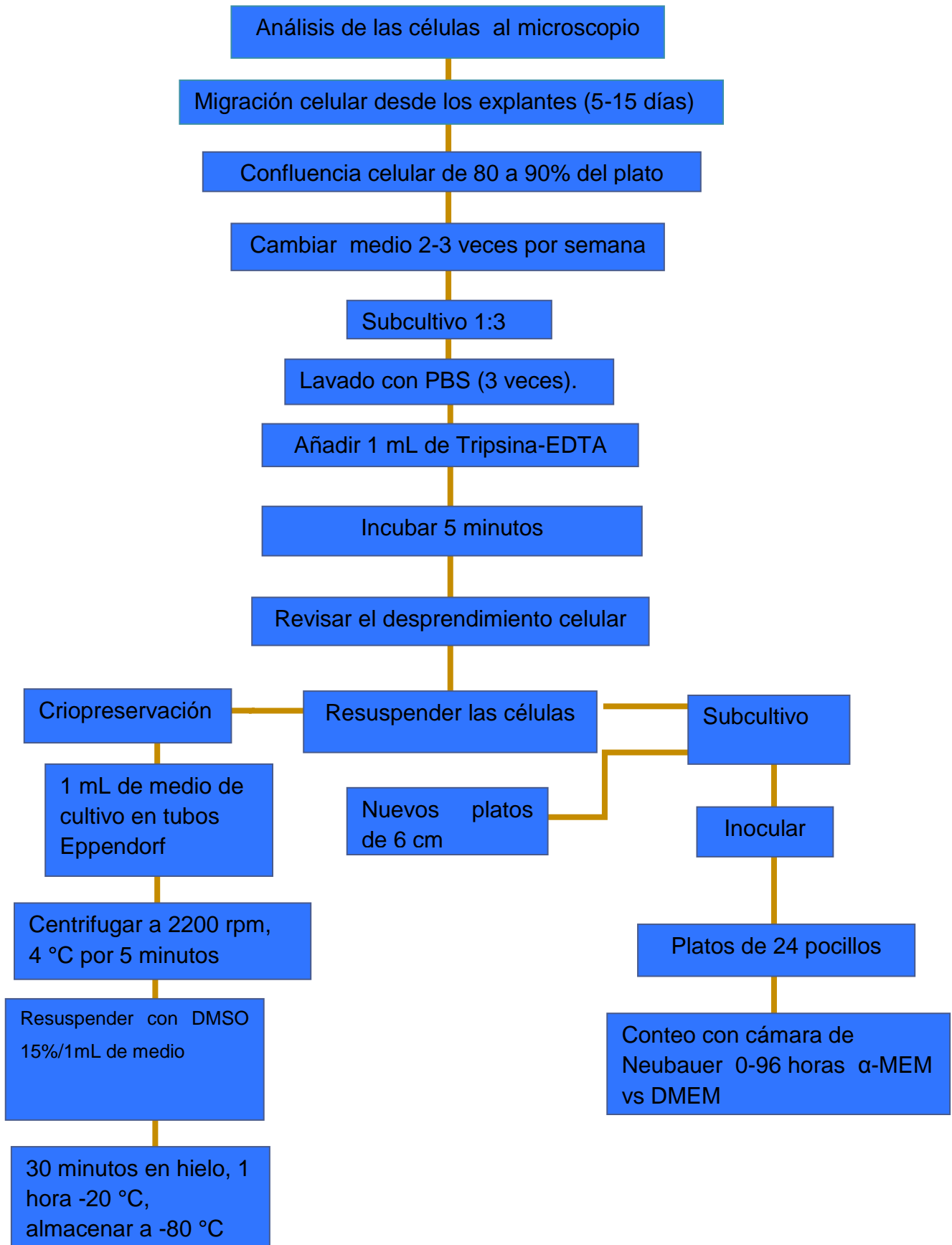
VARIABLE	DEFINICIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	ESCALA Y UNIDAD DE MEDICIÓN
Tipo de medio de cultivo	Mezclas de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento celular ³³ .	Se utilizará medio de cultivo α -MEM y DMEM adicionados con 20% de SFB + 2% de antibiótico + 1% de glutamax como análisis variable.	Cualitativa	Nominal 1-DMEM 2-MEM
Tiempo de proliferación celular	Incremento del número de células por división celular, cuantificadas por medio del conteo celular por hematocitómetro, y cuantificación automática ¹ .	Se considerará un rango de tiempo de 4 semanas de incubación.	Cuantitativa discreta	De razones 0- <i>n</i> horas de incubación
Técnica de cultivo	Método con el que se lleva a cabo un cultivo celular ³³ .	Explante y digestión enzimática.	Cualitativa	Nominal dicotómica 1-Explante 2-Digestión enzimática

11.7 Diseño experimental

Esquema 1. Metodología para el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos gingivales.



Esquema 2. Metodología para subcultivo y criopreservación.



12. Materiales y métodos

12.1 Materiales

Para lograr el éxito del proyecto fue necesario tener un control estricto y minucioso de los materiales, equipos e insumos a utilizar entre los cuales se contemplaron: Equipo: campana de flujo laminar horizontal (Lumistell^{MR} LH-120, Celaya, Guanajuato, México), microscopio (Leica AxioCamp MRc, Wetzlar, Alemania), centrifugadora (Beckman®, J2-MC, Indianápolis, EUA) incubadora (Binder®, Tuttlingen, Alemania), ultracongelador (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), Cámara de Neubauer (Boeco®, Alemania), espectrofotometro (Thermo Scientific®, Finlandia).

12.2 Muestra:

Muestras de tejido gingival obtenidos de biopsias de las odontectomías quirúrgicas de terceros molares inferiores, (n=10).

12.3 Instrumental

Bisturíes no. 20, pinzas de disección, micropipetas (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), frascos de cultivo Falcon® 12.5 cm² (Becton, Dickinson Labware, NJ, EUA), cajas Petri de 10-cm² y 6-cm² (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA).

12.4 Insumos

Buffer de fosfato (PBS, pH 7.4), suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) al 10% y 20%, Tripsina al 0,05% (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Penicilina/estreptomicina 10,000 UI/mL y 10,000 µg/mL (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).

12.5 Autorización

El protocolo fue evaluado por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, UNAM. Los pacientes que participaron en el estudio autorizaron previo consentimiento informado (Anexo 1), la donación de biopsias de tejido gingival tras haber realizado odontectomías quirúrgicas de terceros molares inferiores.

12.6 Implicaciones Bioéticas

El proceso de obtención de las muestras se llevó a cabo previo el consentimiento informado aprobado por la Comisión de Bioética y Seguridad de la ENES Unidad León, entregado a cada paciente previo a cada intervención en el que se explicaron de manera clara, breve y concisa los propósitos de la investigación.

Dicho consentimiento se realizó en concordancia con la versión revisada de la declaración de Helsinki (2008) y en estricto apego a las Leyes y reglamentos vigentes en nuestro país promulgados en el Reglamento de la Ley general de salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres humanos (1984) y La ley general de salud en materia de investigación para la salud (1984).

Teniendo como ejes rectores el respeto a cada individuo que desee participar en el proyecto así como la protección a la integridad física y psicológica de los pacientes, la confidencialidad de los datos proporcionados y el uso adecuado de las muestras obtenidas para fines de investigación y docencia.

De acuerdo al reglamento de la ley general de salud y al Título Segundo: De los 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. 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: 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; colección de excretas y secreciones externas, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales 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, 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, entre otros.

Para esta investigación, nos basamos en los aspectos bioéticos antes mencionados ya que la investigación se clasifica dentro de un riesgo mínimo para el paciente.

13. Desarrollo de la metodología

13.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron 10 muestras de biopsias de tejido gingival (encía) de pacientes sanos, entre 18 y 30 años, intervenidos en odontectomías quirúrgicas de terceros molares inferiores no erupcionados en la clínica de cirugía bucal, de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM unidad León. Las muestras se tomaron de aproximadamente 0.5 cm², obtenidas de la misma incisión que se utiliza para la odontectomías quirúrgicas de terceros molares y la sinéresis que se realizará de la misma manera de acuerdo al protocolo quirúrgico. Todos los pacientes dieron su conformidad sobre la naturaleza del estudio.

Las muestras se tomaron con pinzas Kelly, para su posterior colocación en el medio de transporte con PBS (pH 7.4) adicionado con 1% antibiótico (Gibco[®], Grand Island, NY, EU de Penicilina/Estreptomina 10,000 UI/mL y 10,000 µg/mL), manteniendo una temperatura de 4 °C.

13.2 Almacenamiento y tratamiento de las muestras

Las muestras depositadas en el medio de transporte se llevaron al Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria; Área de Nanoestructuras y Biomateriales, con el menor retardo posible; el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, dentro de la campana de flujo laminar (LumistellMR LH-120, Celaya, Guanajuato, México), se inició con tres lavados vigorosos con PBS durante un minuto, con el fin de eliminar restos de células hematopoyéticas o células adiposas. (Diagrama 1)

Diagrama 1. Procesamiento de lavado de muestras



Figura. 8 Muestra en PBS+1%antibiotico.
Fuente: Directa

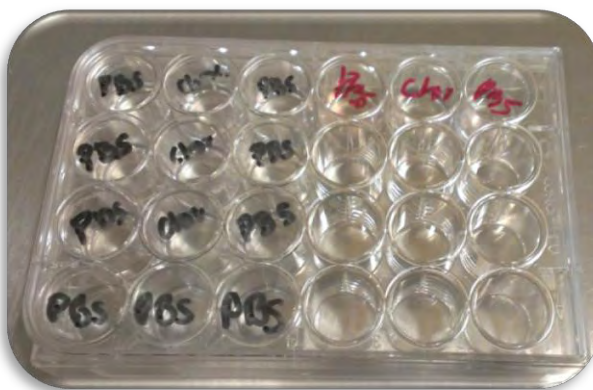


Figura. 9 Carro de lavado con PBS. Fuente: Directa



Figura. 10 Lavado triple con PBS. Fuente: Directa

13.3 Cultivo celular primario

Para el aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos gingivales (HGF) se procesaron por dos métodos: una disgregación enzimática del epitelio (n=5) y la utilización de explantes (n=5). Para el caso de la disgregación enzimática, con hoja de bisturí no. 20 se realizaron explantes de 1x1 mm³ aproximadamente, y se depositaron en tubos falcon de 15 mL a los cuales se les agregó 1 mL tripsina al 0.05% (Gibco[®], Grand Island, NY, USA), y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 60 minutos con agitación en Vortex (micro-centrifuge II MC-110, The Griffin Group INC, Sylvania Ohio, EUA) cada 20 minutos durante 1 min. En cuanto a la técnica de explantes, se colocó la muestra en una caja Petri estéril de 60x15 mm², donde se realizaron explantes de 1x1 mm³, aproximadamente con una hoja de bisturí No. 20, los cuales fueron fijados cuidadosamente al fondo del plato.

Para ambas técnicas, los tejidos se inocularon en medio de cultivo DMEM (Gibco[®]), adicionado con 20% de suero fetal bovino (FBS, Gibco[®]), sin activación de calor, 2% de antibiótico (10,000 UI/mL penicilina y 10,000 µM/mL estreptomina (Gibco[®]) y 1% de Glutamax (Gibco[®] by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) en platos de cultivo de 6 cm² (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY; EUA) y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y una atmósfera de 95% de humedad (Diagrama 2).

El plato se dejó incubar, durante 5 días, posterior a este periodo se realizó la visualización de la migración de células adheridas sobre la caja Petri y, se procedió a reemplazar el medio inicial por un volumen igual de medio fresco, presentando especial cuidado en no desalojar los explantes. El medio de cultivo fue cambiado a la semana del cultivo y después 2 veces por semana. Cuando las células proliferaron en la totalidad de la superficie de la placa, de aproximadamente el 80%, se consideró que ya estaba formada la monocapa de células.

Diagrama 2. Secuencia de cultivo

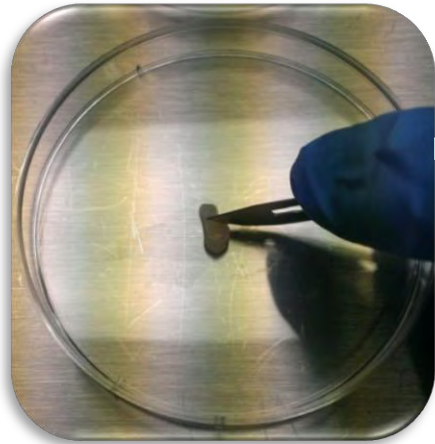


Figura. 11 Explante de tejido gingival. Fuente: Directa



Figura. 12 Agitación con vortex 10 segundos Fuente: Directa

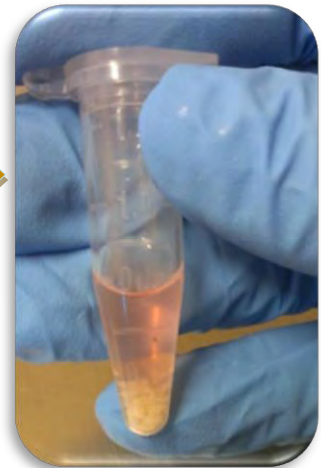


Figura. 13 explantes con Tripsina-EDTA Fuente: Directa

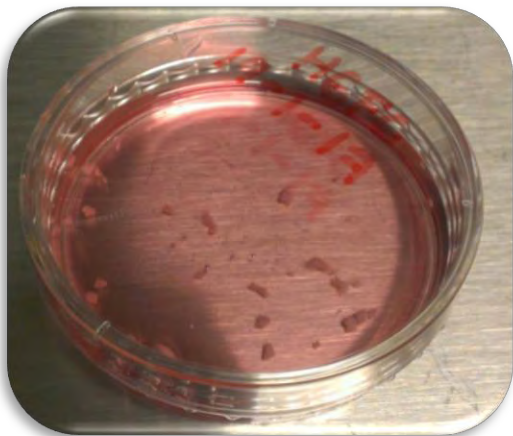


Figura. 15 cultivo primario de HGF. Fuente: Directa



Figura. 14 Incubación Fuente: Directa

13.4 Subcultivo celular

Con el fin de evitar la muerte celular por sobrepoblación, fue necesario realizar subcultivos o pasajes celulares, por lo cual se removieron todos los explantes con la bomba de vacío, se realizó triple lavado con PBS y se añadió 0.5 mL de Trpsina- EDTA (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA). Posteriormente, se realizaron desplazamientos manuales durante 20 segundos para asegurar que toda la superficie del plato fuera expuesta a la solución y con ello asegurar un mejor desprendimiento celular, se llevó a la incubadora por un periodo de 5 minutos a 37 °C.

Se retiraron los platos de la incubadora para observar el desprendimiento bajo el microscopio, se observó la presencia redondeada y altamente refractante de los cuerpos celulares flotando en la solución de Tripsina-EDTA (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA).

Dependiendo de la confluencia celular se determinó la viabilidad de realizar subcultivos en relación 1:3, para lo cual se realizó un pipeteado con la finalidad de conseguir una resuspensión y arrastre de la mayor cantidad de células para ser depositadas en los platos estériles nuevos, donde fueron inoculadas en razones de 1 o 0.5 mL en función de los platos a subcultivar, a los cuales se les añadió 6-10 mL de medio de cultivo. Los platos fueron colocados de nuevo en la incubadora bajo las mismas condiciones iniciales que los cultivos primarios.



Figura 16. Remoción de medio con bomba de vacío. Fuente: Directa



Figura 17. Lavado triple con PBS. Fuente: Directa

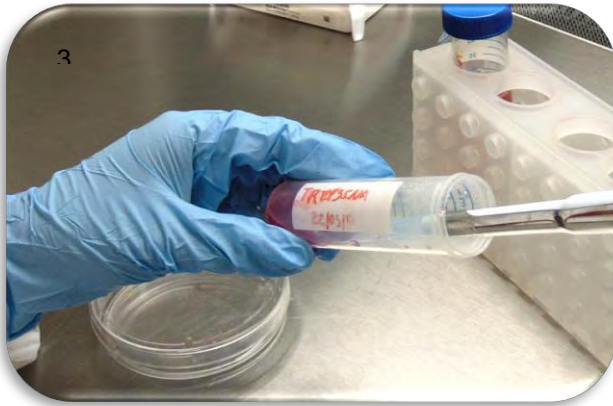


Figura 18. Colocación de Tripsina con EDTA 1mL Fuente: Directa



Figura 19. Incubación. Fuente: Directa

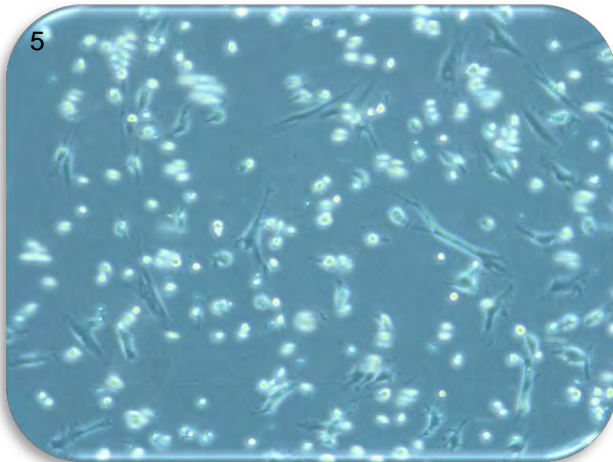


Figura 20. Desprendimiento celular, visto en Microscopio. Fuente: Directa

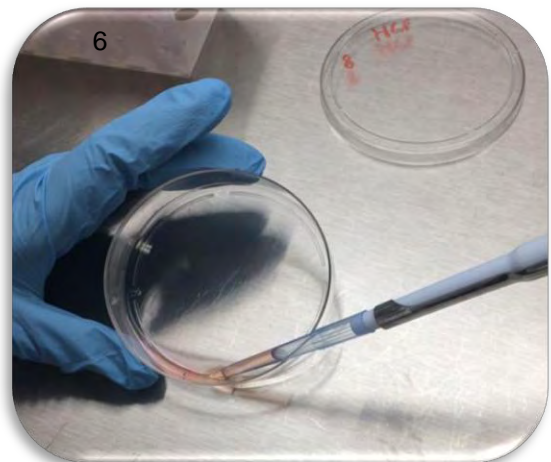


Figura 22. Desprendimiento celular. Fuente: Directa

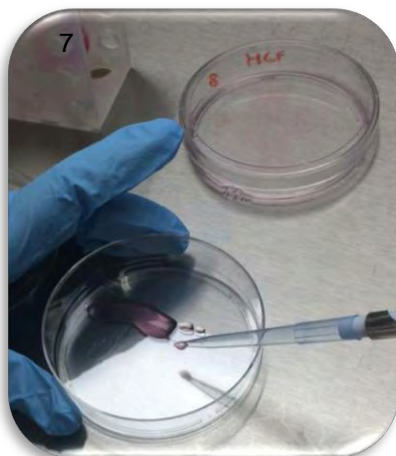


Figura 22. Colocación de células en nuevos platos. Fuente: Directa.

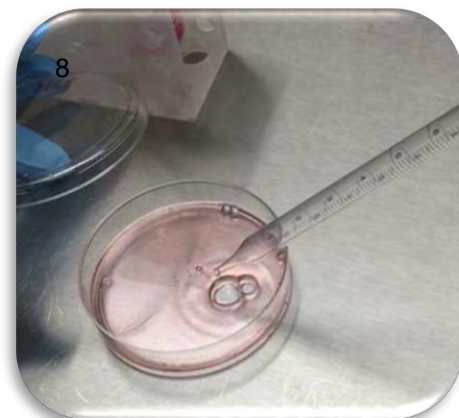


Figura 23. Adición de medio de cultivo DMEM. Fuente: Directa.

13.5 Recuento celular y comparación de medio de cultivo

El conteo celular es un procedimiento en el cual se calcula la cantidad de células contenidas en un volumen determinado. Se utilizó como método de recuento celular la cámara de Neubauer (Figura. 24 es una pequeña placa de vidrio que tiene grabada una cuadrícula en su parte central. Figura. 25), con el objetivo de 10 aumentos, que efectúa el recuento de las células en un área de 1 mm^2 , permitiendo realizar el conteo celular utilizando los 4 cuadrantes laterales de la cámara. Se utilizaron medios de cultivo DMEM o α -MEM adicionados con el 10% de SFB, 2% de antibiótico y 1% de Glutamax. El número de células por mililitro de suspensión permitió calcular el número de células totales en un rango de tiempo de las 0-96 horas de dos muestras de un total de dos experimentos independiente.



Figura.24 Hematocitómetro para conteo celular.
Fuente directa

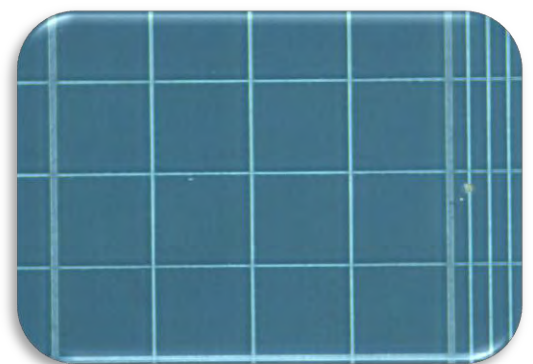


Figura. 25 Parte central del Hematocitometro. Fuente directa

13.6 Criopreservación celular

Las células fueron lavadas tres veces con solución buffer de fosfatos (PBS, 5 mL) y se agregó 1 mL de tripsina 0.05% de tripsina-0.025% EDTA y se incubaron durante 5 min a 37 °C; se comprobó el desprendimiento con microscopio observando a las células circulando libremente en la caja de cultivo. Se retiró la caja de la incubadora y se colocó sobre hielo. Se agregó 1 mL de DMEM+10% SFB frío (4 °C), se pipeteó y se resuspendió el medio. El contenido celular con el medio se transportó a tubos Eppendorf de 1.5 mL se agregó 1 mL de DMEM que contenía los fibroblastos en el tubo. Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2200 rpm a 4 °C y se retiró el medio por decantación o aspiración con bomba de vacío. Se agregó 1 mL solución criopreservadora DMEM+10% de SFB +15% Dimetil sulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) y se resuspendió usando la micropipeta. Los tubos fueron almacenados en hielo durante 30 minutos a 4 °C, 1 hora a -20 °C y fueron almacenados a -80 °C en el ultracongelador para su disposición en stock.



Figura 26. Células preparadas a centrifugar. Fuente: Directa



Figura 27. Centrifugadora. Fuente: Directa



Figura 28 Dimetilsulfoxido. Fuente: Directa

14. Análisis y representación de los datos

Se calculó la media, desviación estándar y porcentajes. Los datos obtenidos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, con una prueba de *t*-student y *t*-student pareada para comparar los tiempos de incubación de la proliferación celular. 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.

CAPÍTULO 4

15. Resultados

Aislamiento y crecimiento celular. Las células obtenidas a partir de biopsias de tejido gingival, obtenidos de odontectomías quirúrgicas de terceros molares inferiores no erupcionados mostraron un crecimiento general rápido con el método de disgregación enzimática, sin influir el diámetro del plato de Petri.

Bajo el microscopio óptico, se observaron células extendiéndose desde la superficie de los explantes de tejido gingival, observándose resultados a los 5 días (Figura 29), células dispersas adheridas al fondo del plato, con características morfológicas compatibles con fibroblastos, células con apariencia fusiforme, finas prolongaciones, núcleo único o doble oval cerrado.

A los 15 días de iniciado el cultivo, se observaron conexiones a través de las prolongaciones citoplasmáticas de la superficie celular, así como una disposición paralela de las células, lo que fue indicativo de los múltiples contactos intercelulares existentes (Figura 30).

A los 21 días se alcanzó un crecimiento celular, una alta confluencia y dirección celular unidireccional y un cambio en la morfología de dichas células; adquiriendo una forma más alargada y con disminución de prolongaciones citoplasmáticas, debido a la confluencia observada del 80-90% del plato (Figura 31).

De las 10 muestras que se tomaron, la técnica de disgregación enzimática con Tripsina-EDTA mostró mejores resultados con un éxito del 60%, contrastando notablemente a la técnica de explantes con un éxito del 40%. Para el establecimiento de los cultivos primarios utilizando el mismo medio para ambos casos (DMEM).

Con los resultados de este de protocolo se confirmó que es adecuado lograr la estandarización para el aislamiento de fibroblastos gingivales humanos, obtenidos de biopsias de tejido gingival de cirugías de terceros molares.

Al comparar la proliferación celular con los medios α -MEM y DMEM no se muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Mientras que el crecimiento celular exponencial a través del tiempo muestra significativamente un crecimiento celular en ambos medios. (Tabla 1 y Gráfica 1)

Cultivo de fibroblastos

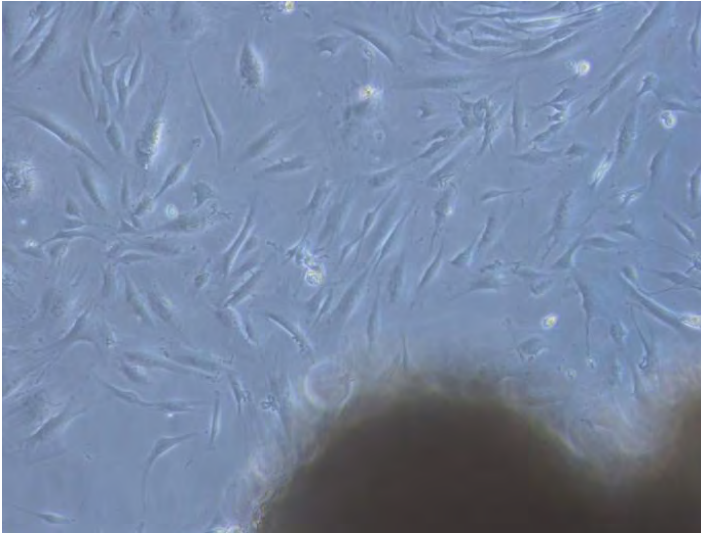


Figura 29. Extensión de fibroblastos a partir del explante a los 5 días. Fuente: Directa.

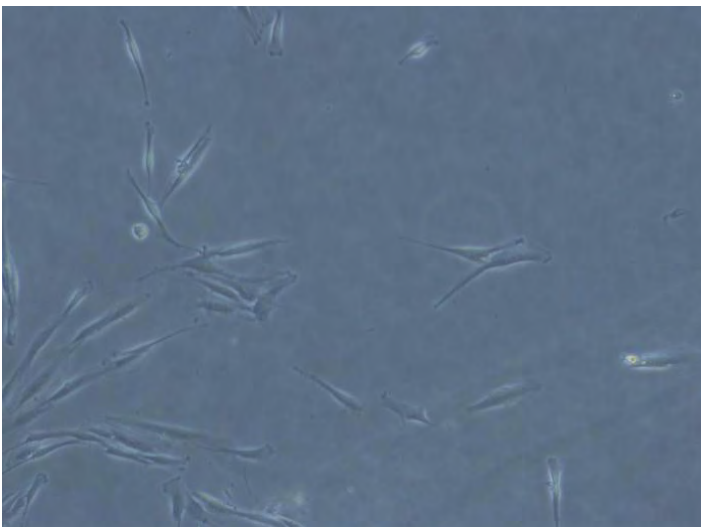


Figura 30. Fibroblastos a los 15 días. Fuente: Directa.

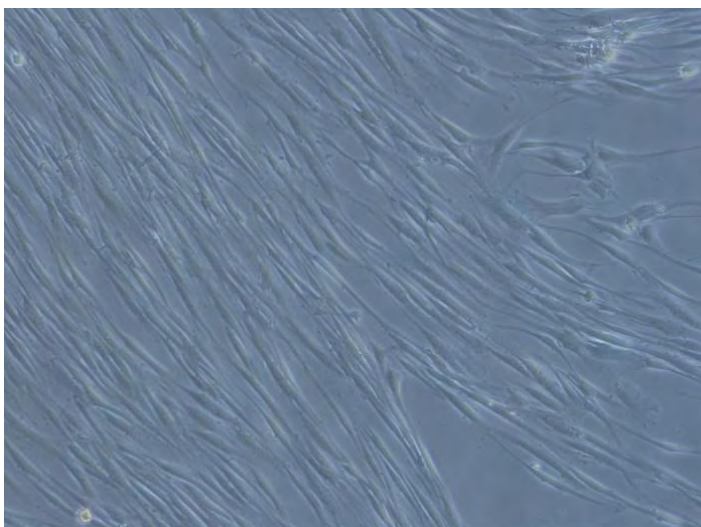
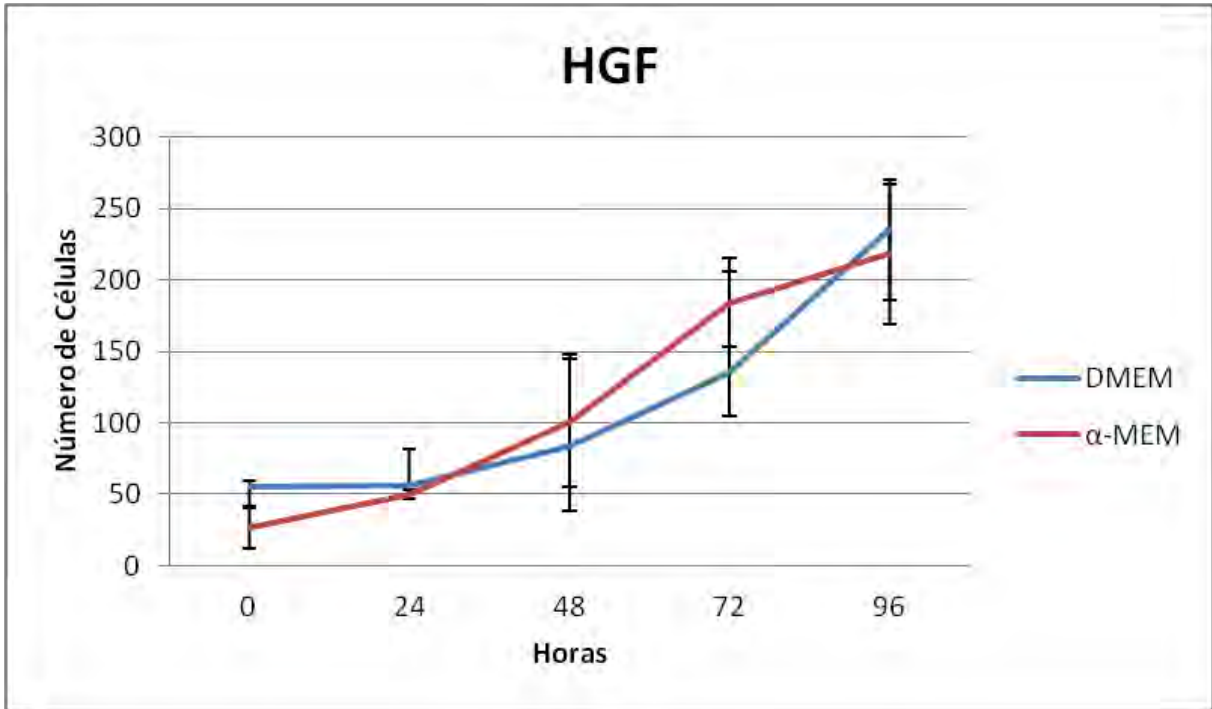


Figura 31. Fibroblastos a los 21 días. Fuente: Directa.



Gráfica 1. Crecimiento exponencial de fibroblastos gingivales humanos, comparando medios de cultivo α-MEM y DMEM. Fuente: Directa.

Tabla 1

Tiempo	DMEM	α-MEM	P valor
0	55.25 ± 4.03	27 ± 14.49	0.58
24	56 ± 25.25	49.5 ± 3.10	0.64
48	83.25 ± 64.82	100 ± 44.49**	0.68
72	135.7 ± 69.93	184 ± 31.27**	0.27
96	235 ± 34.65**	218 ± 48.74**	0.59

*p<0.05, **p<0.01. Fuente: Directa.

16. Discusión

En el presente trabajo se evaluó la posibilidad de que las células de fibroblastos gingivales humanos, puedan ser cultivadas y mantenidas, cumpliendo con un protocolo ya establecido.²² El establecimiento de una línea celular, no es sencillo. De acuerdo con otros estudios, se ha buscado tener las condiciones ideales para aislar y mantener *in vitro* dichas células. Bonvicino y cols. mencionan que el uso de cultivos de fibroblastos gingivales *in vitro* es factible, debido al hecho de que estas células exhiben morfología y distribución espacial similar al sistema *in vivo*.³³ Acosta y cols. hablan sobre las propiedades de los fibroblastos gingivales.²⁵ Somerman y cols. señalan que los pacientes deben cepillar bien sus dientes y utilizar solución salina estéril, en nuestro estudio utilizamos enjuague de clorhexidina al 0.02%, reduciendo el riesgo de contaminación.³⁴

Por otro lado, Kedjarune y cols. usaron el cultivo celular con explantes adheridos a la caja de Pretri²⁸, en nuestro estudio esta técnica de cultivo no tuvo tanto éxito como lo fue con el uso de disgregación enzimática con tripsina. González y cols. mencionan el uso de Tripsina con EDTA bajo agitación suave, lo cual nos proporcionó excelentes resultados a nuestro trabajo.³⁰ Soydan y cols. mencionan que el medio de cultivo debe llevar 10% de SFB inactivándolo con calor, de acuerdo a nuestro trabajo hubo mejores resultados utilizando SFB al 20% sin inactivación por calor.^{30, 36} Todos los autores consultados coinciden con el uso de medio de cultivo DMEM adicionado con 10% de SFB, 1% de Glutamina y 1% de Antibiótico (anfotericina/penicilina), dando éxito a nuestro proyecto. En relación a estudios previos, la proliferación celular desde los explantes va de 6 a 10 días de incubación.^{22,26,34} Al mismo tiempo del cultivo de fibroblastos se llevó a cabo cultivo celular de osteoblastos, siguiendo la misma metodología se encontró que el tiempo de proliferación fue de 7 días, para que esto se lograra, el plato debía estar inalterado.

Como se mencionó en la hipótesis, la técnica de cultivo para fibroblastos gingivales es la disgregación enzimática, la cual mostró mejores resultados en la adhesión, crecimiento y proliferación celular, en comparación con la técnica de explantes.

Algunos de los limitantes que se presentaron en torno a la investigación, fueron la contaminación de algunos medios de cultivo, porque no tuvieron éxito alguno (dos platos de cultivo). Esto provocó que se volviera a repetir hasta lograr la cuota de 10 muestras, 5 para cada grupo, lo cual retrasó ligeramente, el cronograma de actividades.

El paso a seguir para futuras investigaciones es el de caracterizar el fenotipo de los HGF con marcadores específicos positivos para vimentina y CD14. Esto con el objetivo de tener en stock células par futuras investigaciones.

17. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, es factible desarrollar el aislamiento y cultivo primario de células fibroblastos gingivales humanos en la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM Unidad León.

Los explantes cultivados tuvieron un éxito de 60% con disgregación enzimática y 40% de éxito con explantes.

Al elaborar el estudio de viabilidad y proliferación celular entre los medios de cultivo DMEM y α -MEM, demostramos que ambos medios tienen el mismo éxito en cuanto a la proliferación y viabilidad celular.

La confluencia celular de todos los cultivos logrados osciló entre el 80-90% de la totalidad del plato.

La criopreservación y almacenamiento celular son posibles realizar en la Escuela Nacional de Estudios Superiores UNAM Unidad León, si se cumplen los protocolos establecidos, teniendo resultados positivos tras su descongelación.

La ingeniería de tejidos es de gran interés en la odontología, para la regeneración de tejidos bucales, por lo que el aislamiento, cultivo y almacenamiento de células de fibroblastos gingivales humanos, en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria; Área de Nanoestructuras y Biomateriales, de la ENES- UNAM Unidad León; representa un gran paso para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas; a fin de ofrecer a los pacientes una nueva alternativa en la reconstrucción de tejido perdido o dañado, especialmente en la mucosa oral.

18. Bibliografía

- 1.- Berthiaume F. Maguite T. Yasmush M. Tissue Engineering and regenerative medicine: history, progress and challenges. C.B.Engineering J. 2011; (2):403-429.
- 2.- Arvelo F. Ingeniería de tejidos y producción de piel humana in vitro. Rev. Inv. Clínica. 2007; 48(2): 367-375.
- 3.- Falke G. Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando la ingeniería tisular. Art. A. Pediatr. 2000; 98(2): 103-116.
- 4.- Squier C.A., Finkelstein M. Oral an mucosa In: Oral histology, development, structure and function. 6th ed. Strasborg: Quintes sence books; 2003. 20-27.
- 5.- Gorlin R.Goldman H. Patología Oral. 1^a ed. Barcelona: Salvador editores; 1975.438-452, 849-860.
- 6.- Bello S., Peña J, Estrada L., Fontanilla M. Sustitutos de la mucosa oral, creados mediante ingeniería tisular: una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral. CES Odontología. 2001;(14):55-64.
- 7.- Ophof R, Van Reheden .R, Von den Hoff J., Schalkwijk J. Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. Biomaterials J. 2002; (23):41-48.
- 8.- Costea D, Loro L, Dimba E, Vintermyr O. Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithellium. Invest Dermatol J. 2003; 121(6): 1479-86.
- 9.- Bello S. Desarrollo y caracterización de tejido conectivo artificial de mucosa oral. [Trabajo de grado]. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 2002.
- 10.- Berkovitz B., Holand G.R., Moxham B.J. Atlas en color y texto de anatomía oral, histología y embriología, 2da ed., Madrid: Doyma Libros;1992, p. 199-210.
- 11.- Ramírez G. Cortina E, Salinas V. Modelos de experimentación para el estudio del tejido óseo. Reb. 2004;23(3):107–16.
- 12.- Tsukinoki K, Miyoshi Y, Aoki T, Karakida K, Ohta Y. In vivo experimental model of human gingival mucosa using immunodeficient mice. Periodontal.Res. J. 2007; 42(4):294-9.
- 13.- Shabana H, Ouhayoun J, Sawaf M, Forest N. Cytokeratine patterns of human oral mucosae in histiotypic culture. Arch Oral Biol. 1991;(36):747-758.

- 14.- Ahearne M, Lysaght J. Combined influence of basal media and fibroblast growth factor on the expansion and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. Ahearne et al. Cell Regeneration. 2014;(3):13-17.
- 15.- 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;(27):540-549.
- 16.- Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. Scanning Microsc. 2009; (8) 129-137.
- 17.- ThermoFisher scientific. DMEM, α -MEM, México. 2016. Fecha de actualización [28 de noviembre 2016] Disponible en <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10564037>
- 18.- Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. ALTEX. 2003; p275-281.
19. Preparación de phosphate buffered saline (PBS). Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2008. Consultado [28 de noviembre 2016]. Disponible en <http://www.thelabrat.com/protocols/3.shtmland4.shtml>.
- 20.- Gómez M, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2da Ed. Madrid: Panamericana; 2002. P.154-158.
- 21.- Genser F. Histología. 3 ed. Argentina: Panamericana; 2008.p 268-276.
- 22.- Soto J, Parra B. Contreras A. Cultivo y caracterización In vitro de una línea celular de fibroblastos gingivales humanos. Revista Estomatológica. 2000; 9(1)4-10.
- 23.- Gartner L. Hiatt J. Histología, texto y atlas. 1ra ed. México: McGraw-Hill Interamericana;1997. P.53-54.
- 24.- Padron K y cols. Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal. Avances en Biomedicina. 2012; 1(1): 4-8.
- 25.- Acosta A. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. Universtitias Odontológica. 2006;(27):26-33.
- 26.- Hillmann G. Zucht S. Geurtsen W. "Culture of primary human gingival fibroblast on biodegradable membranes". Biomaterials. 2002; (23) 1461-1469
- 27.- Kaul H, Ventikos Y. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. Tissue Eng Rev. 2015;21(2):203–217.

- 28.- Kedjarune, U. Pongprerachok, S. Arpornmaeklong P. Culturing primary human gingival epithelial cells: comparison of two isolation techniques. *Cranio-Maxillofacial S. J.* 2001;(29): 224-231.
- 29.- Cultek. Protocolos y técnicas. Soluciones de cultivos celulares. Consultado [29 de noviembre 2016]. Disponible en http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf
- 30.- González Méndez S. Junquera L. Peña I. García V. In vitro cultura whit collagen and human fibroblast of a full-thickness oral mucosa equivalent. *Rev. Esp. Cirugia Oral y Maxilofacial.* 2009; (31,2): 98-106.
- 31.- Maier A. Westendorp R. Relation between replicative senescence of human fibroblasts and life history characteristic." *A. Research Reviews.* 2009; (8):237-243.
- 32.- Samir A. Peña J. Estrada L. Ingeniería Tisular: una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral. *R. CES Odontología.* 2001;(14,1) 34-39.
- 33.- Bonvicino C., Prado L. Morphological, functional and biochemical characterization of canine gingival fibroblast. *Brazilian Dental J.* 2013; (24,2) 128-136.
- 34.- Somerman M. J. Archer S. Foster R. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro.* *J. Dent Res.* 1998; (67,1) 24-30.
- 35.- Hanazawa S., Hirose K., Bacterioides gingivalis fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts. *American Society for Microbiology.* 1998; (56,1) 272-274.
- 36.- Peruzzo M. Napimoga E. Evaluation of the biological behavior of mucograft in human gingival fibroblast: An In vitro Study. *Brazilian Dental J.* 2015; (26,6) 601-606.
- 37.- Volponi A. Kawasaki M. Adult human gingival epithelial cells as a source for whole tooth Bioengineering. *J Dent Res.* 2013; (X)1-6.
- 38.- Keira SM, Ferreira LM. Experimental model for fibroblast culture. *Acta cirúrgica Brasil.* 2004 (19) 11-16.

ANEXOS

Cultivo de fibroblastos gingivales humanos, ENES-León, UNAM


Anexo I. Consentimiento informado

Consentimiento Informado			
Título	“Estandarización de un método para el cultivo de células osteoblásticas”		
Investigador Principal	Alumnos: Méndez Vázquez Alejandra Gisela, Paulino González Ángel David		
Co-Investigador	Dra. Vilar Pineda Gabriela, Dr. García Contreras René		
Lugar	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36969, León, Gto.		
Introducción	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente explicación sobre el estudio de investigación propuesto. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio.		
Propósito	El propósito de esta investigación es los tejidos que le serán extraídos puedan ser donados a uno de los proyectos de investigación de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León		
Población de los participantes	<p>Para participar en esta investigación usted tendrá que:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; vertical-align: top;">Paciente sano</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. </td> </tr> </table> <p>No será permitido su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tiene alguna enfermedad de tejido óseo. - Pacientes que utilicen inmunomodulares, esteroides, o bifosfonatos. 	Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento.
Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. 		

Cultivo de fibroblastos gingivales humanos, ENES-León, UNAM

	<ul style="list-style-type: none"> - Tiene cáncer. - Alérgicos a la Penicilina - Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada. - Si tiene alguna enfermedad sistémica diagnosticada. - Está embarazada o se encuentra bajo lactancia. <p>Si usted califica, usted será uno de los participantes que colaborará en este estudio.</p>
<p>Procedimientos (Aproximadamente 20 minutos)</p>	<p>A usted se le pedirá:</p> <p>Leer y firmar este formulario de Informe de Consentimiento.</p> <p>Preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio.</p> <p>Preguntas acerca de su estado actual de salud.</p> <p>Participar en la toma de muestra de tejido óseo durante el tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores, se administrará anestesia local al paciente, se realizará tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores donde se retirará el tejido óseo como parte del procedimiento y se conservará en Phosphate-buffered saline (PBS).</p>
<p>Riesgos e Inconformidades</p>	<p>Se le informa que la toma de muestra de tejido óseo que se retira durante el tratamiento de odontectomías de terceros molares es considerada una técnica invasiva con riesgo mínimo.</p>
<p>Costos</p>	<p>No hay costo por la cual usted participe en este estudio, otro que su tiempo.</p>
<p>Confidencialidad</p>	<p>El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basado en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1999. Donde solo se accederá al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética, las autoridades sanitarias.</p>
<p>Participación Voluntaria</p>	<p>Su decisión de participar en este estudio es voluntaria.</p>
<p>Consentimiento</p>	<p>He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas las mismas han sido respondidas satisfactoriamente. Yo voluntariamente acepto participar en este estudio.</p>
<p>Firma del Paciente</p>	

Cultivo de fibroblastos gingivales humanos, ENES-León, UNAM

Consentimiento Informado			
Título	"Estandarización de un método para el cultivo de células osteoblásticas para la neoformación ósea: estudio <i>in vitro</i> "		
Investigador Principal	Mtra. Vilar Pineda Gabriela, Dr. García Contreras René		
Co-Investigador	Alumnos: Méndez Vázquez Alejandra Gisela, Paulino González Ángel David		
Lugar	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36969, León, Gto.		
Introducción	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente explicación sobre el estudio de investigación propuesto. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio.		
Propósito	El propósito de esta investigación es los tejidos que le serán extraídos puedan ser donados a uno de los proyectos de investigación de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León		
Población de los participantes	<p>Para participar en esta investigación usted tendrá que:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; text-align: center; vertical-align: middle;">Paciente sano</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. </td> </tr> </table> <p>No será permitido su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tiene alguna enfermedad de tejido óseo. - Pacientes que utilicen inmunomodulares, esteroides, o bifosfonatos. - Tiene cáncer. - Alérgicos a la Penicilina - Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada. - Si tiene alguna enfermedad sistémica diagnosticada. - Está embarazada o se encuentra bajo lactancia. <p>Si usted califica, usted será uno de los participantes que colaborará en este estudio.</p>	Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento.
Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. 		
Procedimientos (Aproximadamente 20 minutos)	<p>A usted se le pedirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leer y firmar este formulario de Informe de Consentimiento. • Preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio. • Preguntas acerca de su estado actual de salud. • Participar en la toma de muestra de tejido óseo durante el tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores, se administrará anestesia local al paciente, se realizará tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores donde se retirará el tejido óseo como parte del procedimiento y se conservará en Phosphate-buffered saline (PBS). 		
Riesgos e Inconformidades	Se le informa que la toma de muestra de tejido óseo se realiza durante el tratamiento de odontectomías de terceros molares, por lo cual los riesgos son los mismos que en el procedimiento quirúrgico ya descrito en el consentimiento informado clínico.		
Costos	No hay costo por la cual usted participe en este estudio, otro que su tiempo.		
Confidencialidad	El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basado en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1999. Donde solo se accederá al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética, las autoridades sanitarias.		
Participación Voluntaria	Su decisión de participar en este estudio es voluntaria.		
Consentimiento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas las mismas han sido respondidas satisfactoriamente. Yo voluntariamente acepto participar en este estudio. 		
Firma del Participante	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="border-right: 1px solid black; padding-right: 10px;"> <p style="font-size: 1.2em; font-family: cursive;">FLORIAN DEL ROSARIO Delgado</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>		