

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

Evaluación de un modelo 3D *in vitro* a base de andamios de pericardio bovino y células humanas de la cavidad oral para investigación en odontología

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: Licenciado en Odontología

P R E S E N T A : Ulises Martín Arbaiza Martínez

Tutor: M. en C. Paloma Netzayeli Serrano Díaz Asesores: Esp. José Leandro Ernesto Lucio Leonel M en C. Guadalupe Hortensia Luévano Colmenero

León, Guanajuato, Agosto 2024







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.

Dedicatorias

Quiero dedicar principalmente mi proyecto a mis padres Rosa y Arturo que estuvieron en todo momento durante mi formación universitaria, que me apoyaron, me alentaron y me motivaron día a día para nunca rendirme. Además, agradecer infinitamente su apoyo emocional y económico para que nunca me faltara un material para realizar mis prácticas.

A mis hermanos Laura, Pablo, Carolina y Eduardo por siempre escucharme y darme sus consejos cuando más lo necesitaba, como también su apoyo incondicional y por creer en mí.

A mi gato piraña y mi perro Golden por acompañarme cuando tenía que desvelarme y ser parte de compañía.

Igualmente dedicarlo a personas que no son de mi familia, pero decidieron acompañarme durante mi licenciatura y estancia de servicio social Alberto, Clarisa, Lissy, Estef, Rubén, Mario, Johana, Denisse, Adrián, Amairani entre muchos más.

Finalmente a todos los doctores que fueron partícipes de mi formación profesional , que me ayudaron a dar lo mejor de mí para convertirme en un mejor profesional de la salud y una mejor persona.

¡Muchas gracias!

Agradecimientos

Agradezco a la UNAM y a la ENES Unidad León por brindarme la oportunidad de utilizar sus instalaciones para llevar a cabo este gran proyecto y proporcionarme un crecimiento profesional y personal.

A la Dra. Paloma Netzayeli Serrano Díaz por el gran apoyo y dirección de este proyecto, por su gran disposición para enseñarme a manejar las instalaciones, aparatos y materiales que se usan en el área de Nanoestructuras y Biomateriales del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León, y enseñarme a hacer los experimentos correspondientes a este proyecto.

A la Mtra. Guadalupe Hortensia Luevano Colmenero de quien siempre tuve el apoyo y la asesoría para llevar a cabo mis experimentos de la forma más eficiente, así también del apoyo y donación de materiales y por siempre estar dispuesta a explicarme cualquier duda referente a mi proyecto.

Al Dr. Jose Leandro Ernesto Lucio Leonel de quien siempre tuve el apoyo y la asesoría para llevar a cabo mis experimentos de la forma más eficiente.

Agradecimiento a la Dra. Elsa Nydia Hernández Ríos por la realización de la técnica con microscopía óptico confocal del Campus ENES, Juriquilla UNAM y por su gran dedicación al aportar conocimiento y su grandiosa paciencia.

Agradecimiento a la Dra. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano por la realización de la técnica de Hematoxilina y Eosina del Campus ENES, Juriquilla UNAM y por su gran dedicación.

Agradecimiento al Dr. José David Ramos Baena por el apoyo con las descripciones de los cortes histológicos de la técnica de Hematoxilina y Eosina del Campus ENES, León UNAM y por su gran dedicación.

A todos los doctores que forman parte del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León, porque cada uno me apoyó de alguna forma en diferentes momentos durante el desarrollo de mi tesis.

Abreviaturas

3D	Tridimensional
2D	Bidimensional
U.V	Ultravioleta
MEC	Membrana extracelular
GAG	Glicosaminoglicanos
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
FGH	Fibroblastos Gingivales Humanos
CE	Células Epiteliales
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
DMSO	Dimetilsulfóxido
H&E	Hematoxilina y Eosina
SEM	Microscopía electrónica de Barrido
OsO ₄	Tetróxido de Osmio
PI	Yoduro de propidio
ATE	Tridecil polietoxietanol
RAS-ATE	hinchamiento alcalino reversible
Tritón	t-octil fenoxi polietoxietanol
X-100	
DNasa/RN	Nucleasas
asa	
RHOE	Modelo epitelial oral humano reconstruido
LDH	Lactato hidrogenasa
CO2	Dióxido de carbono
°C	Grados celsius
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
SFB	Suero fetal bovino
PBS	Buffer de fosfato salino
ADN	Ácido desoxi borrunicelo
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
TAB	Tendón de aquiles bovino

Resumen

Introducción: La ingeniería de tejidos se ha expandido en el área de biomateriales con el fin de generar, reparar y estudiar los procesos celulares y moleculares mediante modelos 3D in vitro, donde se busca imitar la mucosa bucal al contar con una membrana de matriz extracelular y células gingivales a partir de cultivos primarios. Objetivo: Evaluar un modelo 3D in vitro en andamios de pericardio bovino utilizando células de Fibroblastos Gingivales Humanos y Queratinocitos a partir de cultivos primarios para uso en investigación de biomateriales en odontología. Metodología: Se cultivaron tres diferentes modelos 3D *in vitro* utilizando andamios de pericardio bovino utilizando células de FGH y Ce donde se caracterizaron los andamios mediante SEM. Se realizó inmunohistoquímica de los cultivos primarios de FGH utilizando el inmunomarcador vimentina y AE1/AE3 y Ki67 para CE. Posteriormente se caracterizaron los modelos 3D a los días 3, 5 y 8, con tinción de hematoxilina y eosina, propidio de yoduro, microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica y finalmente se observó la viabilidad celular mediante MTT. Resultados: La caracterización mediante SEM de los andamios mostró una superficie acelular de tipo seroso y fibroso con múltiples fibras de colágeno. Los cultivos primarios de FGH y CE fueron positivos a los inmunomarcadores Vimentina, AE1/AE3 y Ki67. Se obtuvieron tres grupos diferentes de modelos 3D los cuales estaban conformados de un andamio pericardio bovino, FGH y CE encapsuladas en un hidrogel TAB a excepción del grupo 3. Los modelos se caracterizaron con ensayo de voduro de propidio mediante microscopía confocal y microscopía óptica se observó el contenido y morfología celular de ambos tipos celulares, se continuó con ensayo histológico H&E donde se presentó una organización celular del Grupo 3 y mediante ensayo SEM se observó la adhesión celular en la superficie de los andamios. Finalmente se obtuvo la viabilidad celular de los modelos 3D los días 3, 5 y 8; Grupo 1: .142± .04, Grupo 2: .155 ± .03, y Grupo 3: .762 ± .04. Destacando mayor viabilidad celular del grupo 3 hasta el día 8. Conclusiones: el grupo experimental del grupo 3 presentó una mayor viabilidad, organización, proliferación y adhesión celular al no presentar células encapsuladas, en comparación al grupo 1 y grupo 2. Lo cual indica que estos modelos podrían ser utilizados para futuras investigaciones con otros biomateriales.

Abstract

Introduction: Tissue engineering has expanded in the area of biomaterials in order to generate, repair and study cellular and molecular processes using 3D in vitro models, where the aim is to imitate the oral mucosa by having an extracellular matrix membrane and gingival cells from primary cultures. Objective: To evaluate a 3D in vitro model in bovine pericardium scaffolds using Human Gingival Fibroblasts and Keratinocytes cells from primary cultures for use in biomaterials research in dentistry. Methodology: Three different 3D in vitro models were cultured using bovine pericardium scaffolds using FGH and Ce cells where the scaffolds were characterized by SEM. Immunohistochemistry of the primary FGH cultures was performed using the immunomarker vimentin and AE1/AE3 and Ki67 for CE. Subsequently, the 3D models were characterized at days 3, 5 and 8, with hematoxylin and eosin staining, propidium iodide, scanning electron microscopy and optical microscopy and finally cell viability was observed by MTT. Results: SEM characterization of the scaffolds showed an acellular serous and fibrous surface with multiple collagen fibers. Primary cultures of FGH and CE were positive for the immunomarkers Vimentin, AE1/AE3 and Ki67. Three different groups of 3D models were obtained which were made up of a bovine pericardium scaffold, FGH and CE encapsulated in a TAB hydrogel except for group 3. The models were characterized with a propidium iodide assay by confocal microscopy and optical microscopy, the cellular content and morphology of both cell types were observed, continued with a H&E histological assay where a cellular organization of Group 3 was presented and by SEM assay the cellular adhesion on the surface of the scaffolds was observed. Finally, the cell viability of the 3D models was obtained on days 3, 5 and 8; Group 1: $.142 \pm .04$, Group 2: $.155 \pm .03$, and Group 3: .762 ± .04. Highlighting greater cell viability in group 3 until day 8. Conclusions: the experimental group of group 3 presented greater cell viability, organization, proliferation and adhesion by not presenting encapsulated cells, compared to group 1 and group 2. Which indicates that these models could be used for future research with other biomaterials.

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	10
2. Marco teórico	11
2 .1. Modelos tisulares	11
2.1.1. Modelos 2D	11
2.1.2. Modelos 3D	12
2.2. TIPOS DE MODELOS TISULARES 3D	13
2.2.1. Modelos basados en andamios	
2.2.2. Esferoides	13
2.2.3. Organoides	14
2.2.4. Organ On a Chip	14
2.2.5. Hidrogeles	14
2.3. Biomateriales	
2.3.1 Biomateriales de origen biológico	
2.4. Biomateriales que provienen de la MEC	
2.4.1. Membrana extracelular	
2.4.2. Tejido de pericardio bovino	
2.4.3. Descelularización para la obtención de andamios	17
2.5. Epitelios de la cavidad oral	18
2.5.1. Epitelio plano estratificado queratinizado	19
2.5.2. Epitelio del paladar duro	19
2.5.3 -Células del epitelio estratificado queratinizado	20
2.5.3.1. Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH):	20
2.5.3.2. Población intrínseca	21
2.5.3.3. Población extrínseca	21
2.5.3.4. Población transitoria	22
2.6. Técnicas de caracterización Histológica	23
2.6.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E)	23
2.6.2 Inmunocitoquímica	23
2.7. Tinciones celulares en la caracterización de andamios 3D	23

2.7.1. Yoduro de Propidio (PI)	23
2.8. Ensayo de Viabilidad celular bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	
(MTT)	24
2.9 Microscopía como herramienta en la caracterización de modelos 3D	24
2.9.1. Microscopía óptica	24
2.9.2. Microscopía óptico confocal	24
2.9.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	25
3. Antecedentes	26
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos específicos	28
5. Planteamiento del problema	29
6. Justificación	30
7. Pregunta de investigación	31
8. Hipótesis	32
9. Diseño del estudio	33
10. Variables	34
11. Criterios de selección	35
11.1 Criterios de inclusión:	35
11.2 Criterios de exclusión:	35
11.3 Criterios de eliminación:	35
12. Equipo:	36
13. Metodología experimental	36
1. Obtención de Andamios, líneas celulares e Hidrogel	36
2. Cultivo celular de Células Epiteliales	37
3. Cultivo celular de Fibroblastos Gingivales Humanos	38
4. Conteo celular	39
5. Desarrollo de los modelos 3D	40
Primer modelo 3D: FGH encapsulados + Andamio + CE	40
Segundo modelo 3D: Fibroblastos Gingivales Humanos encapsulados + Andamio + Cél	ulas
Epiteliales	42
Tercer modelo 3D: Andamio + FGH + CE	43
6. Microscopía de fluorescencia	44
7. Inmunocitoquímica	44
8. Microscopía electrónica de barrido	44
9. Ensayo de viabilidad celular MTT	45
10. Ensayo histológico H&E	45

11. GRUPOS CONTROLES	46
Grupo control de FGH	46
Grupo control de FGH + CE	46
Grupo control de FGH + Hidrogel	46
Grupo control de CE	46
Grupo control de Andamio	46
14. Resultados:	47
1 Observación de los andamios mediante microscopía óptica y SEM	47
2Cultivos celulares	48
3 Inmunocitoquímica	49
4 Microscopía de fluorescencia	50
5 Ensayo de viabilidad celular MTT	53
6 Microscopía Electrónica de Barrido	63
7Ensayo histológico mediante hematoxilina y eosina	64
Andamios de pericardio bovino con medio para FGH	67
Hidrogel TAB	67
15. Discusión	68
16. Conclusión	72
17. Bibliografía	73

1. Introducción

Hoy en día, la aplicación de la ingeniería de tejidos se ha extendido mucho en el área de biomateriales debido a que algunos de sus objetivos son el generar o reparar tejidos faltantes por medio de modelos tridimensionales (3D) (Neishabouri et al., 2022).

Por lo que se emplean biomateriales de origen artificial o natural, que deben ser empleados en un lapso de tiempo determinado. Estos poseen la capacidad de incrementar o sustituir parcial o total cualquier tipo de tejido, órgano o función del cuerpo receptor (Marin et al., 2023).

Dado a esto, los modelos 3D proporcionan ambientes idóneos para experimentos *in vitro* permitiendo la proliferación de células independientes, la conservación de su estructura 3D y de sus funciones (Moysidou et al., 2020). Además, fisiológicamente estos modelos proporcionan una estructura celular compleja, una guía de adhesión y de migración celular, lo que hace que sus funciones sean más naturales en contraste a otro tipo de cultivo convencional (Parks et al., 2014). Permitiendo así, simular condiciones cercanas al de un tejido *in vivo* a comparación de un monocultivo y un cultivo bidimensional (2D) (Malgahães et al., 2020).

Por un lado, se han encontrado diferentes maneras de manufactura, de entre las cuales destacan la impresora 3D a través de andamios, cultivos en suspensiones, biorreactores y a base de andamios propiamente, entre otros (Shyam et al., 2023).

Se han desarrollado diferentes maneras de cultivo. Inicialmente se inició con el uso de monocultivos o con técnicas bidimensionales, sin embargo, en la actualidad se han optado con técnicas 3D en los cuales encontramos mayores ventajas al formar microambientes similares a un tejido vivo, donde existe un adecuado control del tejido, los errores estadísticos son mínimos, se trabajan bajo condiciones éticas al no utilizar seres vivos y son de un costo económico (Fina et al., 2013).

Uno de los componentes de vital importancia para los sistemas 3D son los andamios, mismos que serán el soporte para las células. Existe una amplia gama de andamios que se han explorado en los últimos años para los cultivos tridimensionales como son los andamios de colágeno, de nanofibra, poliestireno y policaprolactona, los cuales presentan algunos retos, sin embargo han sido una de las técnicas más utilizadas debido a la facilidad de llevarla a cabo. Dadas sus características y propiedades se puede formar un microambiente similar al de la cavidad bucal, ya que en algunos casos es posible utilizar tejido de pericardio bovino descelularizado como un andamio natural, al cual es posible agregar y adherir líneas celulares de la cavidad oral proporcionando modelos *in vitro* con condiciones similares al de un tejido *in vivo* para el estudio de biomateriales en odontología. (Yadev et al., 2011; Ryan et al., 2016).

2. Marco teórico

2.1. Modelos tisulares

La ingeniería de tejidos es un campo de la medicina regenerativa donde se crean modelos tisulares con el fin de producir sustitutos biológicos *in vitro* que imitan el entorno y funciones de un tejido *in vivo* al reparar, reemplazar y aumentar las actividades funcionales. Estos modelos están conformados principalmente de células, factores de crecimiento y biomateriales (Serrato et al., 2015). Estos tejidos permiten un adecuado ambiente para el crecimiento celular, además, de conservar la estructura tridimensional, sin embargo cuenta con la limitante al no tener la capacidad de generar vascularidad en los tejidos. (Ryan et al., 2016).

2.1.1. Modelos 2D

Los modelos tisulares 2D in vitro, son un método de cultivo bidimensional. Son una herramienta para conocer las funciones e interacciones biológicas de las células, como también el mecanismo de inicio y evolución de enfermedades, la producción de proteínas, la biología celular y la imitación de tejidos fabricados. Sin embargo, tanto su interacción intercelular, expresión de genes y proteínas es limitada, con un sistema vascular incapaz de imitar al tejido nativo. Su proceso se basa en el cultivo de monocapa de células en una superficie plana plástica o de vidrio, donde se adhieren y se esparcen. Dado a esto lo convierte en un sistema limitado para el estudio de estructuras celulares más complejas (Shyam et al., 2023; Moysidou et al., 2020).

2.1.2. Modelos 3D

Los modelos tisulares 3D son utilizados en la ingeniería tisular para generar o reparar tejidos u órganos faltantes, además como herramienta de estudio de mecanismos celulares y moleculares en procesos patológicos (Neishabouri et al., 2022). Este tipo de modelos tisulares proporcionan microambientes adecuados para tejidos *in vitro* al permitir la proliferación celular individual, conservar la integridad de su estructura y de sus funciones en tercera dimensión, al mismo tiempo es capaz de interactuar en un entorno con una población celular diversa al contar con redes de comunicación (Moysidou et al., 2020). Debido a estas propiedades de los modelos 3D al imitar tejidos *in vivo* nos dan alternativas para la investigación y regularización del uso de animales en la experimentación (Boraschi et al., 2017).

Por un lado, existen materiales los cuales han sido utilizados en la literatura y en la investigación para la formación de andamios 3D, los cuales pueden ser de origen natural provenientes de seres humanos o de animales, como también pueden ser de origen sintético. Es sabido que las características biológicas de los andamios naturales son mejores ya que proporcionan un microambiente adecuado, existe una interacción intercelular, son biocompatibles y tiene factor de degradabilidad (Neishabouri et al., 2022). Por lo que se utilizado materiales para la fabricación de modelos 3D a partir de tejidos de pericardio bovino, piel, pulmones intestinos, hueso, hígado entre otros, ya que estos están constituidos principalmente de colágeno (Moysidou et al., 2020)

Algunos modelos 3D de pericardio bovino, primeramente deben pasar por un tratamiento de descelularización para crear un andamio acelular que funcione como una MEC natural con el uso de compuestos químicos, biológicos y físicos. Por consiguiente, estos modelos deben ser esterilizados por agentes químicos como: ácido peracético, óxido de etileno, o mediante radiación ultravioleta (U.V) o radiación gamma (Grefen et al., 2018).

En estos modelos, es posible cultivar células específicas y similares al tejido de estudio que se quiere sustituir, reparar o generar. Dónde se administran sustancias esenciales para la generación de nuevos tejidos (Moysidou et al., 2020).

Finalmente, el andamio debe pasar por diversas pruebas de caracterización, para así garantizar el contenido celular y mantener las características bioquímicas y mecánicas.

Las pruebas utilizadas son macroscópicas, microscópicas, tinciones y análisis mecánicos (Neishabouri et al., 2022).

A pesar de tener una estructura tridimensional, estos modelos carecen de la capacidad de generar vascularidad al tejido que es esencial para dar condiciones nutricionales y de oxígeno (Shyam et al., 2023). Además, estos modelos son de un costo más elevado y su sistema celular es de mayor complejidad a comparación a un modelo convencional 2D (Ryan et al., 2016).

2.2. TIPOS DE MODELOS TISULARES 3D

2.2.1. Modelos basados en andamios

Los andamios funcionan como un soporte bioartificial que son conformados por técnicas que proporcionan condiciones ideales de oxígeno, nutrientes y movimiento de elementos y desechos (Shyam et al., 2023; Habanjar et al., 2021). Estos proporcionan una estructura tridimensional para el crecimiento celular y de tejidos. Los andamios deben ser biocompatibles, contar con una superficie porosa, con un pH neutro, son de carga superficial, también deben ser biodegradables y permitir la adhesión celular. Estos sistemas basados en andamios pueden estar hechos de biopolímeros naturales, sintéticos o híbridos, a base de hidrogeles o matrices extracelulares (Habanjar et al., 2021).

2.2.2. Esferoides

Los esferoides 3D, son un conjunto de células redondas con una superficie antiadherente , los cuales pueden estar constituidos con células primarias o inmortalizadas. Estos métodos de cultivos no utilizan andamios sólidos, en los esferoides se utilizan diferentes tipos de técnicas para la fabricación de cultivos de células en suspensiones tridimensionales, lo que permite que las células sean capaces que se auto ensamblen, así favoreciendo la formación de tejidos sin la necesidad de un andamio estructural (Shyam et al., 2023).

2.2.3. Organoides

Los organoides 3D, son tejidos multicelulares que están especialmente organizados para ser utilizados para el estudio de la formación de tejidos u órganos. Usualmente se utilizan para realizar modelos tridimensionales para analizar las interacciones intercelulares, la farmacología y la microbiología farmacéutica. Estos modelos son derivados de células madres pluripotentes y embrionarias para la formación de órganos humanos como el hígado, el cerebro, pulmones, etc. Sin embargo, la falta de vascularidad lo vuelve una limitante para crear estructuras similares *in vivo* (Shyam et al., 2023).

2.2.4. Organ On a Chip

Estos modelos utilizan un sistema específico para la formación de tejidos y órganos para estudios de enfermedades y fármacos. Estos emplean el uso de microfluidos y líneas celulares para la formación de sistemas micro fisiológicos que imiten condiciones fisiológicas y mecánicas como la de un tejido *in vivo* (Shyam et al., 2023).

2.2.5. Hidrogeles

Actualmente en la ingeniería de tejidos se emplean hidrogeles a base de redes de polímeros hidrófilos que cuentan con una estructura tridimensional, estos son suaves y viscosos. Debido a sus características tienen una gran capacidad de retención de líquidos. Estos materiales están en una fase intermedia, por lo que no son líquidos ni sólidos, además de ser utilizado por la capacidad de liberar fármacos, regeneración de tejidos y mantener un medio idóneo para el cultivo celular (Fernandez et al., 2021).

Los hidrogeles se dividen en tres grupos principalmente según su origen (naturales, sintéticos e híbridos). Donde los naturales son provenientes de extractos animales o plantas, están conformados principalmente de carbohidratos y proteínas, como podría ser el colágeno, celulosa, quitosano, etc. Los sintéticos que son producidos de forma industrial, como alcohol polivinílico, polietilenglicol, etc. Por último, los híbridos que están conformados por materiales orgánicos e inorgánicos específicos (Tapia et al., 2024).

2.3. Biomateriales

Los biomateriales se definen a todo aquel material o conjunto de materiales de origen artificial o natural, que pueden ser empleados en un lapso de tiempo. Estos poseen la capacidad de incrementar o sustituir parcial o total cualquier tipo de tejido, órgano o función del cuerpo receptor. Su finalidad es mantener o mejorar la condición de vida del individuo u objeto (Marin et al., 2023).

Los biomateriales se dividen en cuatro grupos primarios: polímeros, cerámicos, metales y naturales. Estos deben contar con propiedades de no inmunogenicidad, ser biomiméticos, ser biocompatibles, biodegradables, bioabsorbibles, contar con capacidad de ser funcionalizados con proteínas y productos químicos bioactivos.

En los últimos años los biomateriales y la ingeniería de tejidos en odontología ha evolucionado bastante, con la regeneración de tejidos al combinar andamios de matriz extracelular funcionalizados con células específicas y señales con un adecuado control, ya que es posible desarrollar modelos biomiméticos para analizar y exponerlos en condiciones de inmunogenicidad (Mahesh et al., 2021).

2.3.1 Biomateriales de origen biológico

Los materiales de origen biológico están constituidos su mayor parte de tejido conjuntivo que es utilizado como biomaterial, que está formado por una proteína llamada colágeno, que cuenta con diversas características. Una de ellas son sus características mecánicas que le otorgan una fuerza tensil, extensibilidad, formación de agregados moleculares, retención de líquidos y capacidad de formar geles.

Por otro lado, sus características químicas le confieren la capacidad de formar enlaces covalentes de sus fibras, degradación por colagenasas, reabsorción tisular, semipermeabilidad, y posibilidad de interactuar con diversas moléculas. Además, cuenta con características biológicas como, antigenicidad reducida, favorece la adhesión celular, interacción con trombocitos y activación del sistema de coagulación. Normalmente el colágeno se obtiene de origen bovino.

El cual es tratado por procesos de entrecruzamiento del colágeno para disminuir la antigenicidad de este mismo y así aumentar la vida media del tejido (Lizarbe et al 2007).

2.4. Biomateriales que provienen de la MEC

2.4.1. Membrana extracelular

La membrana extracelular (MEC) es una estructura tridimensional de red macromolecular de origen natural, que está conformada principalmente de agua, proteínas estructurales; colágeno, elastina. Proteínas especializadas: fibrina, laminina, fibronectinas y proteoglicanos estructurales especializados. Estos compuestos la convierten en una membrana de tipo basal, que proporciona un soporte mecánico y estructural al anclaje de diferentes células (Fernández et al., 2019). Asimismo, cuenta con funciones de proliferación, diferenciación, viabilidad, adhesión, migración, polaridad y apoptosis celular (Moffat et al., 2022). Por lo cual se utiliza la membrana extracelular descelularizada como un andamio natural ya que proporciona un sustrato de soporte mecánico y un soporte biológico tridimensional para ser utilizado posteriormente como un medio de cultivo celular 3D (Zhang et al., 2022).

2.4.2. Tejido de pericardio bovino

Uno de los andamios que ha sido explorado ampliamente y que incluso ya se comercializa es el tejido de pericardio bovino como; Surgifoc®, Braile biomédica, etc, mismos que están compuestos por colágeno de tipo I, con una estructura que se caracteriza por ser de tipo mecánico no lineal y anisotrópico. Que consiste en una red de fibras de colágeno y elásticas, que están adheridas a una matriz. Asimismo, se compone de glicosaminoglicanos (GAG) libres y proteoglicanos. Este tipo de tejido ha sido aplicado como un biomaterial para la elaboración de bioprótesis de válvulas cardiacas, parches abdominales o vaginales para reparar sus paredes (Mendoza et al., 2011; Bielli et al., 2018).

2.4.3. Descelularización para la obtención de andamios

Los andamios de origen natural han sido explorados ampliamente y que incluso se comercializan cómo; SpongeCol®, SphereCol®, etc. Otros de tejido de pericardio bovino (Surgifoc®) que para ser utilizados como andamios que para garantizar la bioseguridad para su uso deben ser descelularizados para aislar las células y compuestos de la matriz extracelular, principalmente ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) (Neishabouri et al., 2022). Con el propósito de preservar la biología y dar estructura mecánica de la membrana extracelular (MEC) y permitir una interacción celular y formación de tejidos (Pagoulatou et al., 2012). Mediante este procedimiento, se obtiene una matriz extracelular virgen que es biológicamente reconocibles y adecuados para la adhesión, proliferación y viabilidad celular (Neishabouri et al., 2022). Por un lado, funcionan como soporte mecánico para la proliferación del tejido nuevo con una guía al crecimiento. (Marin et al., 2023). Los procedimientos de descelularización se llevan a cabo mediante técnicas mecánicas, químicas, detergentes, enzimáticas o una combinación de estas. Para garantizar el éxito de este procedimiento se deben realizar pruebas de microscopía, de tinción y análisis mecánicos (Neishabouri et al., 2022). El método de descelularización a elección debe contar con las características adecuadas al tejido que se aplica, para no afectar las características físicas del andamio (Brown et al., 2014). Como son los detergentes no ionizantes, que son sustancias químicas, que tienen como función disolver y separar las membranas celulares de su estructura interna. (Mendibil et al., 2020). Estos tipos de agentes son los más utilizados por su costo económico, son de acción rápida y de alta eficacia (Moffat et al., 2022). Por lo tanto, se ha optado por su aplicación ya que no dañan la estructura de la membrana extracelular, no alteran ni destruyen los enlaces lipídicos y sin dañar a los enlaces proteicos (Akbari et al., 2017).

2.5. Epitelios de la cavidad oral

La mucosa de la cavidad oral se encuentra revestida por dos capas estructurales y de origen embriológico, el epitelio y del corion, las cuales están en contacto mutuo con el estrato basal . El tipo de epitelio que se encuentra revistiendo la mucosa de la cavidad oral, puede ser de tipo estratificado plano o pavimentoso estratificado. El cual también puede ser queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado (Figura 1). De acuerdo con la zona de la cavidad oral, existen diferencias estructurales, además de contener células epiteliales (CE) que fungen la tarea de protección entre la cavidad oral y el tejido conectivo (Gomez et al., 2019; Capitán et al., 2006).



Figura 1. Tipos de epitelios en la cavidad oral; queratinizado (A), paraqueratinizado (B) y no queratinizado (C)(Gómez y cols, .2019).

2.5.1. Epitelio plano estratificado queratinizado

Este tipo de epitelio está conformado por dos grandes poblaciones de células, por una población intrínseca conformada completamente por queratinocitos que representan un 90%, y una población extrínseca que no corresponde al epitelio, denominada población residente, que es el 9% que abarcan melanocitos, células de Merkel y de Langerhans y por último la población transitoria, que es el 1% conformada por granulocitos, linfocitos, y monocitos (Gomez et al., 2019).

2.5.2. Epitelio del paladar duro

La mucosa del paladar duro es gruesa y resistente. Se distingue por presentar un rafe medio en su línea media y por presentar elevaciones de mucosa denominadas rugas palatinas. Es de tipo masticatoria. Se caracteriza por contener principalmente una gran cantidad de fibras de colágeno tipo I, que se adhiere y se inserta perpendicularmente al periostio (Gomez et al., 2019; Actis et al., 2014).

El epitelio del paladar duro está revestido por un epitelio plano estratificado queratinizado y con un corion de tejido conectivo, además de contar con una gran cantidad de fibras de colágeno. Este epitelio prevalece con patrón celular V. Que se distingue por tener una superficie con patrones porosos sobre su superficie, donde también presenta oquedades denominadas lagunas. Además, contiene pares de Citoqueratinas 5-14 y 1-10, que se encuentran revistiendo las superficies internas y externas, que son más numerosas en el paladar duro (Gomez et al., 2019; Capitán et al., 2006)

Este epitelio dispone de un grosor de 0.2 a 0.3 milímetros (mm), el cual es conformado por el estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo (Capitán et al., 2006).

2.5.3 -Células del epitelio estratificado queratinizado

2.5.3.1. Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH):

Son un tipo de células mononucleares, no polarizadas que se encuentran en la cavidad oral, son las más numerosas, ya que aproximadamente representan de un 60-65% del tejido conectivo (Víctor et al., 2019).

El origen embriológico de los FGH provienen de las células de la cresta neural que los diferencia de otro tipo de fibroblastos que son de origen mesenquimatoso (Víctor et al., 2019). Estos se encargan de la adaptación funcional de los tejidos, debido a que son capaces de la síntesis, resorción y degradación de las enzimas del colágeno y de la sustancia fundamental (Vargas et al., 2016).

Los FGH en cultivos primarios se caracterizan por presentar un aspecto fusiforme u ovalado con abundantes prolongaciones que se encuentran en su periferia permitiendo una mejor comunicación intercelular y asimismo una mayor adhesión sobre la superficie (Figura 2). En su citoesqueleto está constituido por familias de microfilamentos de actina que le confieren movilidad y contracción celular y cuenta con proteínas fibrosas como la vimentina que son parte de filamentos intermedios del mismo citoesqueleto (Víctor et al., 2019).



Figura 2. Se muestran Fibroblastos Gingivales Humanos de aspecto fusiforme u ovalado, aumento x10 (Fuente propia).

2.5.3.2. Población intrínseca

Queratinocitos: su nombre se debe a que son CE que están destinadas a queratinizarse. Contiene pares de citoqueratinas 5-14 y 1-10 por lo que para estudio de inmunohistoquímica es utilizado marcadores como la pancitoqueratina (AE1/AE3) (Gomez et al., 2019). Las características morfológicas de los queratinocitos en cultivos primarios suelen presentar un aspecto poligonal,alargadas y planas (Figura 3) (Morino et al., 2019).

Durante su formación suelen migrar a las capas más profundas del epitelio. Los queratinocitos conforman el epitelio oral y se dividen en cuatros estratos: estrato basal, espinoso, granuloso y córneo (Roque et al., 2008).



Figura 3. Se muestran Células Epiteliales de aspecto poligonal, aplanadas y alargadas, aumento X10 (Fuente propia)

2.5.3.3. Población extrínseca

- Melanocitos: son células claras con núcleo pequeño. Su citoplasma es redondo con prolongaciones alargadas de apariencia dendrítica. Se ubica en el estrato basal. Además, se distingue por disponer de gránulos precursores de melanina y de un aparato de Golgi desarrollado.
- Células de Merkel: estas células se encuentran en el epitelio oral, carecen de prolongaciones de apariencia dendrítica y se relacionan con los queratinocitos ocasionalmente mediante desmosomas.
- Células de Langerhans: son las células responsables de dar comienzo a la respuesta inmunológica a los antígenos que traspasan por el epitelio. Disponen de

receptores de superficie y marcadores inmunológicos. Son de origen hematopoyético e intervienen en la respuesta inmunológica (Gomez et al., 2019; Roque et al., 2008).

2.5.3.4. Población transitoria

- Granulocitos: son un tipo de glóbulo blanco también conocidos como leucocitos polimorfonucleares, así como dice su nombre contiene pequeños gránulos en su interior de formas variables como son: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
- Linfocitos: son un tipo de leucocitos que se encuentran en el torrente sanguíneo, que se encargan de los mecanismos de defensa y de las reacciones inmunitarias. Son los encargados del rechazo de los órganos trasplantados. Se dividen en linfocitos T y B.
- Monocitos: es un tipo de célula inmunitaria que se encuentra dentro y fuera del torrente sanguíneo. Se encargan de deglutir sustancias extrañas y también interaccionan con las inmunoglobulinas (Roque et al., 2008).

2.6. Técnicas de caracterización Histológica

2.6.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E)

Es un ensayo de tinción que se utiliza frecuentemente para el estudio de la estructura de células y tejidos con el uso de dos tintes. Uno básico para la hematoxilina y otro ácido para la eosina. Donde la hematoxilina pigmenta de tono violeta azulado zonas ácidas de células y de tejidos, conocidos como basófilos, como los ácidos nucleicos, proteoglicanos, ribosomas y la cromatina. Por otro lado, la eosina pigmenta de tono rosado zonas básicas, como los eosinófilos, como son las fibras de colágeno, fibras elásticas, fibras musculares y el citoplasma de la célula (Gomez et al., 2019; Simancas et al., 2021).

2.6.2 Inmunocitoquímica

La técnica de inmunohistoquímica es una técnica de inmunofluorescencia que es utilizada frecuentemente para la localización de macromoléculas que están presentes en cultivos celulares primarios. Asimismo se utilizan anticuerpos para determinar si existen ciertos antígenos en nuestro cultivo celular. Por lo cual, los anticuerpos al momento de unirse al antígeno o a la enzima activan una tinción, dando como resultado la observación del antígeno bajo el microscopio (Novus et al., 2024). Esta técnica nos permitirá observar si existen los antígenos Ki67 y Ae1/ae3 que están presentes normalmente en células epiteliales y el antígeno Vimentina para células de fibroblastos gingivales humanos.

2.7. Tinciones celulares en la caracterización de andamios 3D

2.7.1. Yoduro de Propidio (PI)

PI es una molécula fluorescente que se adhiere al ADN. Tiene la capacidad de cruzar pasivamente a células que poseen una membrana plasmática íntegra. Es utilizada para determinar la viabilidad celular, la apoptosis o necrosis celular, donde las membranas plasmáticas se vuelven permeables sin depender del mecanismo de muerte. PI tiene una excitación de longitud de onda de 400 a 600 nm y emite una luz de fluorescencia de 600 y 700 nm, es compatible con láseres y fotodetectores, que son encontrados en citómetros de flujo (Crowley et al., 2016).

2.8.EnsayodeViabilidadcelularbromurode3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

El ensayo MTT, es un tipo de estudio que tiene como función observar la viabilidad celular de las mitocondrias, es un compuesto colorante de tono amarillo. Este compuesto es capaz de disolverse en un colorante de tono violeta, conocido como formazán. Este forma cristales insolubles en agua que quedan atrapados en el interior de las células y deben ser solubilizados con Dimetilsulfóxido (DMSO). El resultado del formazán es proporcional al número de células viables, y la forma de evaluar los resultados es mediante Espectrofotometría de la luz U.V a una absorbancia de 570 nm (Ghasemi et al., 2021; Van et al., 2015)).

2.9 Microscopía como herramienta en la caracterización de modelos 3D.

2.9.1. Microscopía óptica

La microscopía óptica es una serie de métodos y técnicas utilizadas para obtener imágenes de objetos diminutos para su investigación o estudio, para esto emplear la luz (Altamirano et al., 2015).

En la actualidad existen diferentes tipos de microscopios ópticos, el microscopio más utilizado para estudio histológico es el microscopio óptico convencional o de luz de campo claro. Es un sistema que funciona por medio de un sistema compuesto por dos lentes convergentes, y también por un sistema de objetivo. Esto posibilita una amplificación en la visualización. Asimismo, cuenta con una resolución de 0.2 µm o 20 nm (Gomez et al., 2019).

2.9.2. Microscopía óptico confocal

La microscopía de óptica confocal es una técnica que permite el estudio de moléculas fluorescentes presentes en células y/o tejidos. Utiliza como fuente de energía luz UV, que actúa sobre la muestra a diferentes longitudes de onda para provocar una respuesta fluorescente con la ayuda de fluorocromos inducidos al tejido (Gomez et al., 2019).

Donde la luz de excitación permite apartar la luz fluorescente emitida. Por lo tanto, la luz emitida por la muestra es detectada por el ojo o el sistema de cámaras digitales.

Finalmente las zonas fluorescentes del tejido brillan en un fondo de contraste para ser detectadas (Von et al., 2011).

Este cuenta con un límite de resolución de 0,13-0,15µm. Donde existen diferentes tipos de microscopios ópticos confocal, como puede ser de uso convencional, invertido y epifluorescencia (Gomez et al., 2019).

2.9.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Es un instrumento que es utilizado para obtener imágenes indirectas al analizar las características estructurales y tridimensionales de la superficie celular de una muestra o modelo 3D (Alberts et al 2010).

Esta técnica consiste en la aplicación de un haz de electrones sobre la superficie de una muestra. Donde el haz entra en contacto con el modelo efectuando un barrido a lo largo de la superficie lo que ocasiona la aparición de electrones secundarios al estar en contacto con ella. Estos electrones secundarios son localizados por un detector, proporcionando una señal eléctrica que posteriormente es amplificada y finalmente transmitida a un monitor.

Para examinar las muestras, deben ser fijadas con glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato, posteriormente de ser fijadas se lavan con el mismo tampón fosfato. Se recomienda posfijar las muestras con Tetróxido de Osmio (OsO₄) en tampón fosfato. Se prosigue con deshidratar las muestras con soluciones crecientes de acetona o etanol y luego se secan en un proceso de secado de punto crítico. Luego las muestras se colocan sobre portamuestras de aluminio, utilizando plata coloidal como adherente y conductor lo que lo convierte en un blanco adecuado para un rayo de electrones. Después se realiza metalización con oro con el propósito de asegurar una correcta conductividad eléctrica y así finalmente ser analizadas bajo el microscopio (Gomez et al., 2019).

3. Antecedentes

En el campo de la ingeniería tisular se ha optado por el uso de andamios fabricados de pericardio bovino son un biomaterial natural que son utilizados normalmente para la generación de modelos tisulares, el cual debe pasar primeramente por un proceso de descelularización para aislar las células y compuestos de la matriz extracelular para crear una matriz virgen, para mantener sus propiedades mecánicas y estructurales. En este estudio, se compararon tres métodos de descelularización, para identificar la efectividad de cada uno sobre los GAG. Primeramente un tratamiento con detergente no-iónico (Triton X-100), seguido de un proceso de hinchamiento alcalino reversible (RAS-ATE) y adicionalmente con nucleasas (DNasa/RNasa). Se realizó un conteo de los GAG, y un ensayo histológico H&E, además, se analizó la morfología y la integridad estructural mediante SEM. Donde se identificó una pérdida del ADN del tejido del 97% con el método Triton X-100 y del 95% con RAS-ATE, sin embargo, el método RAS-ATE tuvo un mayor efecto de descelularización en el ADN. Concluyendo que los métodos de descelularización deben ser con agentes no iónicos (Mendoza et al., 2011).

Existe un estudio *in vitro* 3D en el cual se fabricaron 10 modelos tisulares, con andamios naturales y sintéticos comerciales a base de colágeno en los cuales se sembraron FGH y queratinocitos. Con el propósito de crear y mejorar un modelo 3D similar a la cavidad bucal para estudios biomateriales dentales. Donde se observó y se evaluó la integridad de la estructura, su porosidad, la biocompatibilidad y su capacidad de mimetizar. Los modelos fueron caracterizados con pruebas de microscopía electrónica de transmisión e inmunofluorescencia. Llegando a la conclusión que para realizar un modelo 3D de mucosa oral humana es crucial que el modelo cuente con una adecuada biocompatibilidad, estabilidad y una correcta porosidad (Moharamzadeh et al., 2008).

En este estudio, se realizó un estudio *in vitro* con modelos 3D con células epiteliales de mucosa bucal y FGH , además de modelos comerciales; un modelo epitelial oral humano reconstruido (RHOE) con células de carcinoma oral TR146 y un modelo EpiOral. Donde se analizó el daño tisular y la liberación de citocinas en contacto con células de *Candida albicans*, simulando una mucosa bucal común. Donde se identificó que la presencia de FGH contribuye a la proliferación de queratinocitos favoreciendo una respuesta inmuno histológica similar a la mucosa oral en comparación con los otros modelos. Asimismo, los modelos tisulares epiteliales y EpiOral mostraron una mayor respuesta inflamatoria de citoquinas en la presencia de *C. albicans*, contando con una respuesta inmune idónea. No obstante, los modelos comerciales no cuentan con células inmunitarias (Yadev et al., 2011).

En otro estudio *in vitro*, se generó un modelo tisular 3D con CE y FGH con colágeno. Asimismo, se utilizaron dos modelos comerciales: Skin RHOE y MatTek EpiOral. El propósito de este estudio fue comparar las características de un modelo no comercial *in vitro* contra modelos comerciales al evaluar la infección de biopelículas en una superficie de acrílico simulando una prótesis dental, para conocer el daño tisular y la expresión de virulencia de *C. albicans*. Donde los modelos no comerciales y comerciales mostraron actividad de lactato hidrogenasa (LDH). El modelo no comercial presentó ligeramente más daño tisular en comparación al modelo comercial MatTek EpiOral . Llegando a la conclusión que los modelos comerciales proporcionan una valiosa información en estudios *in vitro*, pero, presentan limitaciones al no permitir adhesión de células inmunitarias. Dado esto, el desarrollo de nuevos modelos de estudio no comerciales y económicos serían una alternativa para incorporar células inmunes (Morse et al., 2018).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluación de un modelo 3D *in vitro* en andamios de pericardio bovino utilizando células de fibroblastos gingivales humanos y queratinocitos a partir de cultivos primarios para uso en investigación de biomateriales en odontología.

4.2 Objetivos específicos

- 1. Obtener un modelo 3D usando células humanas de fibroblastos gingivales humanos y queratinocitos.
- 2. Evaluación superficial y estructural del constructo 3D por medio de H&E, SEM y PI.
- 3. Pruebas de viabilidad celular mediante ensayo de MTT.
- 4. Imagen por medio de microscopía óptica y confocal para observación de la morfología de los componentes estructurales del constructo 3D.

5. Planteamiento del problema

En la actualidad, se sigue trabajando con modelos experimentales *in vivo*, debido a que aportan diversas ventajas al obtener resultados confiables al realizar investigaciones. Sin embargo, existen modelos de cultivo donde se pueden aislar células sin la necesidad de utilizar animales, por lo tanto, existe el debate ético si es correcto utilizar seres vivos en la experimentación. En Estados Unidos de América y en Europa se aplicó la política de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento), con el objetivo de regular el uso de animales en la experimentación y desarrollar nuevas alternativas para realizar investigaciones (Boraschi et al., 2017).

Desde hace años se ha optado por trabajar con modelos 2D *en vitro*, los cuales tienen una serie limitaciones debido a su método de cultivo en monocapa. Estos limitan las interacciones celulares, la diferenciación celular, proliferación y vitalidad, además, de carecer de elementos sustanciales como el oxígeno, nutrientes y metabolitos (Tosca et al., 2023).

Actualmente en la ingeniería de tejidos se desarrollan modelos 3D con células específicas y similares al tejido que se quiere imitar (28). Se han realizado estudios con modelos tridimensionales *in vitro* comerciales con líneas celulares de fibroblastos gingivales y líneas celulares de carcinoma los cuales han tenido limitaciones, ya que estos modelos comerciales no permiten la adhesión de células inmunitarias para imitar un entorno más preciso de la cavidad oral. Por lo cual una ópcion sería evaluar modelos a base de andamios naturales con líneas celulares orales de cultivos primarios para generar un entorno similar a la cavidad oral (Morse et al., 2018).

6. Justificación

En la ingeniería de tejidos se realizan diversas investigaciones implementando modelos experimentales, tal como: *in vivo, in vitro* e *in sílico*. Durante años se han utilizado los modelos *in vitro* para estudiar las funciones biológicas de las células (26). Dado a sus funciones de crear ambientes similares al de un tejido *in vivo*, donde se trabajan con un mayor control, cuentan con condiciones éticas al no utilizar seres vivos, además de disminuir errores estadísticos y de ser de un costo económico (Fina et al., 2013).

Por lo tanto, se han implementado algunos modelos comerciales de cultivo 3D *in vitro* con líneas celulares de fibroblastos gingivales humanos y queratinocitos debido a la capacidad de recrear e imitar condiciones similares a la cavidad oral. (Yadev et al., 2011). Además, mejoran la interacción intercelular, obteniendo un ambiente físico químico, donde se conservan las propiedades fenotípicas intrínsecas, así favoreciendo la viabilidad y proliferación celular con el propósito de crear andamios funcionales para investigaciones de biomateriales (Shyam et al., 2023). Sin embargo, estos modelos comerciales no cuentan con la posibilidad de adherir células inmunitarias que se encuentran en células humanas de la cavidad oral en condiciones normales para ser modelos fieles a la cavidad oral (Yadev et al., 2011).

Finalmente, este proyecto dará como aporte evaluar modelos 3D *in vitro* en andamios de pericardio bovino utilizando células humanas de Fibroblastos Gingivales Humanos y Queratinocitos a partir de cultivos primarios para imitar un entorno lo más parecido a la mucosa de la cavidad oral para uso en investigación de biomateriales en odontología.

7. Pregunta de investigación

¿Es posible evaluar la viabilidad celular y la estructura de un modelo 3D *in vitro* mediante andamios naturales, utilizando células humanas de Fibroblastos Gingivales Humanos y Queratinocitos a partir de cultivos primarios?

8. Hipótesis

Los andamios de origen natural permiten la adhesión, proliferación y supervivencia de diferentes células que se encuentran en la cavidad oral.

9. Diseño del estudio

Tipo de estudio: experimental in vitro

Espacio y tiempo: CFATA y Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, UNAM. Febrero 2024- Marzo 2024

Universo de estudio: líneas celulares de; fibroblastos gingivales humanos y queratinocitos, y andamios de pericardio bovino descelularizados

Tipo y tamaño de muestra: tipo de muestra no probabilística, se llevarán a cabo 3 experimentos independientes en triplicado para cada paso experimental, donde n=9

10. Variables

Variable dependientes	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Medición
Viabilidad celular	Cuantitativa continua	Cantidad de células vivas y funcionales existentes en una población celular	Se observará la viabilidad celular de las mitocondrias del tejido 3D mediante ensayo MTT.	%
Estructura del andamio	Cualitativa Nominal	Los andamios proporcionan una estructura tridimensional sobre la cual las células pueden crecer y formar tejido. Deben ser porosos para permitir la difusión de nutrientes y gases	Se observará la estructura del tejido 3D mediante tinción H&E.	Presencia o ausencia
Morfología Celular	Cualitativa Nominal	La célula es la unidad más pequeña de materia viva, capaz de llevar a cabo todas las actividades necesarias para el mantenimiento de la vida. formada por un citoplasma rodeado por una membrana.	Se observará las características superficiales celulares y tisulares del andamio mediante SEM.	Presencia o ausencia

Variable Independientes	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Medición
Andamio	Cuantitativa Discreta	Estructura tridimensional que actúa como sustituto de la matriz extracelular permitiendo controlar los estímulos mecánicos que reciben las células.	Se utilizarán andamios de pericardio bovino como matriz extracelular para la realización de modelos tisulares 3D	Cantidad de andamios utilizados
Líneas celulares	Cualitativa Dicotómica	Células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.C	Se observará mediante microscopio óptico y se realizarán ensayos de inmunocitoquímica a líneas celulares de FGH y CE.	Si o no

11. Criterios de selección

11.1 Criterios de inclusión:

- 1. Técnicas relacionadas a andamios de pericardio bovino descelularizados.
- 2. Andamios de pericardio bovino funcionalizados con líneas celulares de fibroblastos gingivales humanos y queratinocitos.

11.2 Criterios de exclusión:

- 1. Técnicas diferentes a la técnica mencionada.
- 2. Líneas celulares no pertenecientes a seres humanos.

11.3 Criterios de eliminación:

- 1. Muestras contaminadas.
- 2. Células no viables.
- 3. Muestras que presenten cambios de color y/ o consistencia.
12. Equipo:

Para los ensayos hechos en este proyecto se utilizó el siguiente equipo: campana de flujo horizontal para células (Lumistell LH-120), Micropipeta Ecopipette 0.5-10 μ L (CAPP), Micropipeta 100 μ L (Thermo Scientific), Incubadora de humedad relativa (MIDI 40 CO2 Thermo Scientific), Microscopio Bifocal (LEICA DM500).

13. Metodología experimental

1. Obtención de Andamios, líneas celulares e Hidrogel

Los andamios y el Hidrogel de tendón de aquiles bovino (TAB) de origen natural se obtuvieron del Laboratorio de LaBAS, Laboratorio de biotecnología aplicada a la salud, de la División de Ciencias e Ingenierías, Campus León del Instituto Politécnico Nacional (Figura 4). El andamio se obtuvo de pericardio bovino, procedentes de rastros que cuenten con certificación Tipo Inspección Federal (TIF), el tejido fue sometido a un proceso de descelularización siguiendo el protocolo propuesto por Mendoza et al.,2011. En el cual proponen un proceso de hinchamiento alcalino reversible, seguido de un tratamiento con detergente no-iónico y un tratamiento adicional con nucleasas. Los andamios descelularizados fueron liofilizados y esterilizados por radiación gamma (con una dosis de 25 kGy) y se realizaron fotografías control con el microscopio óptico. Por un lado, se obtuvieron células criopreservadas de Fibroblastos Gingivales Humanos y Células Epiteliales del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII) ENES León, UNAM. Finalmente, los materiales y las células fueron utilizados para la realización de tres diferentes tipos de modelos tisulares; el primero modelo a base de FGH encapsulados en hidrogel, con andamio y CE, el segundo modelo a base de FGH encapsulados en hidrogel, andamio y CE encapsuladas en hidrogel, por último el tercer modelo con FGH, andamio y CE.



Figura 4. A) Muestra los andamios de pericardio bovino descelularizados.

2. Cultivo celular de Células Epiteliales

Las CE fueron cultivadas en placas de 100x20 mm y un área de 55 cm² (Corning costar, NY) (Figura 5) con medio suplementado e incubadas en la Incubadora de humedad relativa (MIDI 40 CO₂ Thermo Scientific) a 37°C con 5% CO₂. El medio de cultivo consistió en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich/D5796-1L) y Medio F-12 (Sigma-Aldrich), en proporción 3:1, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco/24140-079), 1 µg/mL de Factor de Crecimiento Epidermal (FCE) (Sigma-Aldrich), 0.4 µg/mL de Hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 1794 µg/mL de Adenina, 5 µg/mL de Insulina (Insulex), 1% de Penicilina y estreptomicina (Sigma-Aldrich).

Se realizaron cambios de medio y lavado con Disolución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich) cada 48 horas e incubadas bajo las mismas condiciones. Se utilizaron CE a partir del octavo pase para producir los modelos tisulares 3D.



Figura 5. Muestra cultivo celular primario de células epiteliales.

3. Cultivo celular de Fibroblastos Gingivales Humanos

Los FGH fueron cultivados en placas de 100x20 mm (Corning costar, NY) (Figura 6) con medio suplementado e incubados a 37° C con 5% CO₂. El medio de cultivo consistió en DMEM suplementado al 10% de FBS, 1% de GlutaMAXTM x100 mL (Gibco) y 1% de Penicilina y estreptomicina.

Se realizaron cambios de medio y lavaron con solución PBS cada 48 horas y fueron incubadas bajo las mismas condiciones. Se utilizaron FGH a partir del sexto pase para producir los modelos tisulares 3D.



Figura 6. Muestra cultivo celular primario de células de fibroblastos gingivales humanos.

4. Conteo celular

Se utilizaron dos placas de 100x20 mm y un área de 55 cm² (Corning costar, NY), una con CE y una de FGH, con una confluencia celular del 90% para realizar el conteo celular de cada tipo de célula de manera individual. Donde primeramente se realizaron 3 lavados con 1 mL de PBS, el cual fue aspirado, posteriormente se colocó 1 mL de Tripsina y se incubó a 37°C con 5% CO₂ por 5 minutos realizando movimientos mecánicos. Después, se agregó 2 mL de medio para desactivar la enzima. Se colocaron 1.5 mL del total en dos tubos eppendorf de 1.5mL para ser centrifugados (Centrifuge CL10, Thermo Scientific) a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el excedente para obtener el pellet, donde se agregaron 500 µL de medio en cada ependorf, se resuspendieron y se tomaron 10µL de células para colocarlos en la cámara de Improved Neubabuer (Boeco,.Germany) (Fugura 7) para realizar el condeo celular y preparar suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 10⁴cél / mL respectivamente.





Figura 7. Muestra conteo celular de CE sobre la cámara de Improved Neubabuer (Boeco,Germany).

5. Desarrollo de los modelos 3D

Primer modelo 3D: FGH encapsulados + Andamio + CE

Primeramente (día 01) se agregaron 60 μ L de PreGel (Figura 5) en 27 pozos en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland) (Figura 8). A la vez se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 10⁴ cél / mL de FGH en 40 μ L con medio, donde se colocaron en cada pocillo con el hidrogel TAB (Figura 9), los cuales se resuspendieron para ser encapsulados en el hidrogel por 48h y se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Los andamios tuvieron una dimensión de 5 mm de diámetro (Figura 10), los cuales se hidrataron (día 02) 24 h previo a su uso con 100 μ L de medio de cultivo para CE y fue incubado bajo las mismas condiciones por 24 h. Posteriormente (día 03) se retiró el medio, se lavó con 100 μ L de PBS y se agregaron y se agregó 50 μ L de medio para FGH , donde se colocaron los andamios de pericardio bovino con un espesor de 200 μ L sobre los FGH encapsulados, ya una vez dispuestos estos fungieron como andamio para permitir la adhesión de un segundo tipo células (CE) (Figura 11), las cuales fueron obtenidas a partir del epitelio oral, con una densidad celular de 2 x 10⁴ cél / mL en 50 μ L, m, estos fueron incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones.

Se realizaron cambios de medio 50 μ L de medio para FGH + 50 μ L de medio para CE cada 48 hrs. Una vez obtenidos los tejidos 3D se realizó el ensayo metabólico MTT para analizar la viabilidad celular para después ser evaluados histológicamente por tinción H&E y ser caracterizados por microscopía óptica con fluorescencia con Yoduro de propidio los días 3, 5 y 8. Además de ser sometidos a SEM el día 8.Se tomaron fotografías representativas del primer modelo 3D, los días 3, 5 y 8 mediante el microscopio óptico.





Figura 9. Hidrogel

Figura 11. Ejemplo del modelo 3D del Grupo 1



Figura 10. Andamios de pericardio bovino descelularizados de 6 mm de diámetro.



Figura 8. Muestra de la microplaca de 96 pocillos y el acomodo de los grupos experimentales. Este ensayo se hizo por triplicado.

Segundo modelo 3D: Fibroblastos Gingivales Humanos encapsulados + Andamio + Células Epiteliales

Primeramente (día 01) se agregaron 60 μ L del hidrogel en 27 pozos (Figura 12) en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland). que a la vez se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 104cél / mL de FGH en 40 μ L con medio, donde se colocaron en cada pocillo con el hidrogel , los cuales se resuspendieron para ser encapsulados en el hidrogel TAB por 48h y se incubaron a 37°C con 5% CO2. Los andamios de pericardio bovino tuvieron una dimensión de 5 mm de diámetro, los cuales se hidrataron (día 02) 24 h previo a su uso con 100 μ L de medio de cultivo para CE y fueron incubados bajo las mismas condiciones por 24 h. Posteriormente (día 03) se retiró el medio, donde se colocaron los andamios de pericardio bovino con un volumen de 200 μ L sobre los FGH encapsulados, una vez dispuestos estos fungieron como andamio para permitir la adhesión de un segundo tipo células (CE) (Figura 13), las cuales fueron obtenidas a partir del epitelio oral, con una densidad celular de 2 x 104cél / mL en 40 μ L + 60 μ L de PreGel para ser encapsuladas y se incubaron bajo las mismas condiciones por 48h.

Se realizaron cambios de medio 50 μ L de medio para FGH + 50 μ L de medio para CE cada 48 hrs. Una vez obtenidos los tejidos 3D se realizó el ensayo metabólico MTT para analizar la viabilidad celular para después ser evaluados histológicamente por tinción H&E y ser caracterizados por microscopía óptica con fluorescencia con Yoduro de propidio los días 3, 5 y 8. Además de ser sometidos a SEM el día 8.

Se tomaron fotografías representativas del segundo modelo 3D, los días 3, 5 y 8 con el microscopio óptico.



Figura 12. Muestra de la microplaca de 96 pocillos y el acomodo de los grupos experimentales. Este ensayo se hizo por triplicado.



Figura 13. Ejemplo del modelo 3D del Grupo 2

Tercer modelo 3D: Andamio + FGH + CE

Los andamios de pericardio bovino tuvo una dimensión de 5 mm de diámetro, se dispuso en 27 pozos en una placa de 96 pocillos (Corning costar, NY) (Figura 14). Los cuales se hidrataron (día 00) 24 h previo a su uso con 100 μ L de medio de cultivo para FGH y fue incubado a 37°C con 5% CO2 por 24 h. Posteriormente (día 01), se realizó el primer cultivo de FGH donde se preparon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 104cél / mL en 40 μ L con medio para fibroblastos gingivales humanos (FGH), que fueron colocadas sobre los andamios e incubados nuevamente bajo las mismas condiciones por 48 h. Posteriormente (día 03) se aspiró y se cambió el medio con 50 μ L para FGH. Previamente se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 104cél / mL equivalente a 50 μ L con medio para CE. Las CE fueron colocadas sobre los FGH para permitir la adhesión del segundo tipo células (Figura 15), las cuales fueron obtenidas a partir del epitelio oral y fueron incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones.

Se realizaron cambios de medio 50 μ L de medio para FGH + 50 μ L de medio para CE cada 48 hrs. Una vez obtenidos los tejidos 3D se realizó el ensayo metabólico MTT para analizar la viabilidad celular para después ser evaluados histológicamente por tinción H&E y ser caracterizados por microscopía óptica con fluorescencia con Yoduro de propidio los días 3, 5 y 8. Además de ser sometidos a SEM el día 8.

Se tomaron fotografías representativas del tercer modelo 3D, los días 3, 5 y 8 con el microscopio óptico.



Figura 14. Muestra de la microplaca de 96 pocillos y el acomodo de los grupos experimentales. Este ensayo se hizo por triplicado.



Figura 15. Ejemplo del modelo 3D del Grupo 3

6. Microscopía de fluorescencia

El andamio de pericardio bovino descelularizado con células de FGH y CE fue sometido a un protocolo de caracterización con Yoduro de Propidio siguiendo el protocolo propuesto por Kenar, H., et al. , 2011. Para visualizar el ADN residual del andamio, se utilizó solución de yoduro de propidio Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) y agua destilada a una concentración 1:1000 durante 10 min a temperatura ambiente, previamente se lavaron y aspiraron las muestras con 100 µL de solución de PBS , después fueron colocadas las muestras en portaobjetos con solución fijadora BacLight[™] mounting oil. para ser evaluados en un microscopio confocal fluorescente ApoTome (ZEISS, Imager.Z1). Se realizó el experimento por duplicado el día 3, 5 y 8.

7. Inmunocitoquímica

Se utilizaron dos placas de 100x20 mm con CE y una de FGH, con una confluencia celular del 90%. Donde primeramente se realizaron 3 lavados con 1 mL de PBS, el cual fue aspirado, posteriormente se colocó 1 mL de Tripsina y se incubó a 37°C con 5% CO₂ por 5 minutos realizando movimientos mecánicos. Después, se agregó 2 mL de medio para desactivar la enzima. Se tomaron 700 μ L para ser colocados sobre una laminilla electro cargada (Microscope Slides, Pearl No.7102) dentro de una placa de 100x20 mm, se embebió sobre medio hasta cubrir la laminilla y se incuba bajo las misma condiciones realizando cambios de medio cada 48 horas.

Posteriormente 4 días, se aspiró completamente el medio, se realizó un tren de lavado donde se lavó una vez con agua bidestilada, después se sumerge en acetona a 4°C durante 10 minutos, luego se realizaron 20 baños directamente en alcohol absoluto etanol, se lavó con agua destilada en 3 baños, y se mantuvieron en un recipiente embebidos en PBS para ensayo de inmunocitoquímica.

8. Microscopía electrónica de barrido

El andamio de pericardio bovino descelularizado y los modelos de pericardio bovino descelularizado con células de FGH y CE fueron sometidos a un ensayo SEM siguiendo el siguiente protocolo.

Los andamios y los tejidos se fijaron en solución tamponada de glutaraldehído al 2% durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Después se lavó rápidamente dos veces con agua destilada para eliminar el exceso de tampón. Se deshidrataron con etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 96% y 100%) dos cambios de 15 minutos cada uno en refrigeración a 4°C. Por último secado a punto crítico, montaje y observación. Se realizó el experimento el día 8.

9. Ensayo de viabilidad celular MTT

Para determinar la viabilidad y proliferación celular de los andamios de pericardio bovino descelularizado con células de FGH y CE fueron sometidos a un ensayo de MTT. Donde se preparó la sal de Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (Sigmal Aldrich) a una concentración de .2mg/mL en PBS. Después, se aspiró el medio de los pocillos de los modelos y se lavó con 100 μ L de PBS y se agregó 10 μ L de la sal de bromuro preparada . Se incubaron 37°C con 5% CO₂ por 3 horas. Posteriormente se retiró el MTT suplementado con medio y se colocó 100 μ L dimetilsulfóxido (DMSO) por 5 minutos y se realizaron lecturas en el espectrofotómetro MultiskanTM GO (Thermo ScientificTM) a 570 nm. Se realizó el experimento por triplicado el día 3, 5 y 8.

10. Ensayo histológico H&E

El andamio de pericardio bovino descelularizado con células de FGH y CE fue sometido a un ensayo histológico para fijación de las muestras para ensayo de hematoxilina y eosina con el siguiente protocolo. Primero se retiró el medio de las muestras y se lavó con 100 µL de PBS el cual se aspiró para después ser fijadas en solución fijadora (formaldehído al 4%), para continuación ser infiltradas en parafina y seccionadas en un microtomo. Posteriormente las muestras se montaron en un portaobjetos para ser teñidos con tinción H&E. Se continúo con desparafinar las muestras mediante Xileno (se realizaron dos inmersiones por separado de 5 min), luego se hidrató el tejido con soluciones de etanol en orden decreciente (100%, 96% y 80% y 70%)y se lavaron con agua destilada. Se prosiguió con la tinción de hematoxilina de Harris por 10 min, luego se realizaron 5 enjuagues no directos, después fueron sumergidos en alcohol ácido por 20 segundos y se lavaron nuevamente en solución común y agua amoniacal por 1 minuto y se lavaron con agua común. Por consiguiente se sumergieron las muestras en Eosina de 1 a 3 min, para después ser deshidratadas por soluciones de etanol y agua en orden creciente (70%, 80%, 96% y 100%), se siguió con el aclarado donde se sumergen en Xileno en dos inmersiones de Xileno y etanol absoluto 50:50, y en Xileno por 20 segundos y dos minutos. Finalmente las muestras son cubiertas con un cubreobjetos y se sellan con medio de montaje (Entellan) para ser observadas mediante el microscopio. Se realizó el experimento por triplicado el día 5 y 8.

11. GRUPOS CONTROLES

Grupo control de FGH

Posteriormente (día 01), se realizó el primer cultivo de FGH donde se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 104cél / mL en 100 μ L con medio para FGH en 9 pozos en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland) y se incubaron a 37°C con 5% CO₂.

Grupo control de FGH + CE

Se realizó un cocultivo donde se preparon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 10_4 cél / mL en 100 µL con medio para FGH, que fueron colocadas en 9 pozos en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland) y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones por 48 h. Posteriormente (día 03) se aspiró y se cambió el medio con 50 µL para FGH. Previamente se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 10_4 cél / mL equivalente a 50 µL con medio para CE que se agregaron encima de los 9 pozos de los FGH.

Grupo control de FGH + Hidrogel

Primeramente (día 01) se agregaron 60 μ L del hidrogel TAB en 9 pozos en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland) (Figura). A la vez se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 10⁴ cél / mL de fibroblastos gingivales humanos (FGH) en 40 μ L con medio para FGH, donde se disponieron en cada pocillo con PreGel , los cuales se resuspendieron para ser encapsulados en el hidrogel.

Grupo control de CE

Posteriormente (día 03) se prepararon suspensiones celulares con una densidad celular de 2 x 104cél / mL equivalente a 100 μ L con medio para CE en 9 pozos en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland) y se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Se realizaron cambios de medio cada 48 horas y se realizó ensayo MTT los días 3,5 y 8.

Grupo control de Andamio

El andamio tuvo una dimensión de 5 mm de diámetro, se dispuso en 9 pozos en una placa de 96 pocillos (Corning costar, NY). Los cuales se hidrataron (día 00) con 100 μ L de medio para FGH.

Se realizó cambio de medio a los grupos control cada 48 horas y se incubaron a 37° C con 5% CO₂. Se realizó ensayo MTT por triplicado los días 3, 5 y 8.

14. Resultados:

1.- Observación de los andamios mediante microscopía óptica y SEM

Se tomaron fotografías de los andamios de pericardio bovino y mediante el microscopio óptico (Figura 16). Se observó una estructura de fibras de colágeno ubicadas de manera aleatoria. Los andamios tuvieron un tamaño de 5 mm de diámetro y espesor de .4 a .45 mm. De consistencia firme con una superficie de aspecto serosa





Se caracterizaron los andamios de pericardio bovino descelularizados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (Figura 17), donde se observa una superficie serosa acelular con fibras de colágeno orientadas de manera aleatoria y en capas, y una vista con un corte sagital se presenta una superficie fibrosa con porosidades y diversas fibras de colágeno que proporcionan el espacio necesario para que las células se adhieran y proliferen.



Figura 17. Andamio de pericardio bovino, donde se observa su superficie (A) y vista sagital (B) con un tamaño de 20 µm.

2.-Cultivos celulares

Se realizaron cultivos primarios los cuales se les realizó recambio de medio cada 48 horas y se incubaron bajo condiciones ideales hasta tener una óptima confluencia celular. Se tomaron fotografías representativas de los cultivos de CE en su octavo pase celular donde se observa una morfología de tipo poligonal, aplanadas y alargadas (Figura 18) y del cultivo celular de los FGH en el sexto pase donde se observa una morfología en las células de tipo fusiforme u ovalado (Figura 19), mediante el microscopio óptico.



Figura 18. Muestra cultivo celular primario de CE. Con un aumento de A) 10X y B) 20X.



Figura 19. Muestra cultivo celular primario de células de FGH. a) con un aumento de 10X y b) 20X.

3.- Inmunocitoquímica

El ensayo de inmunocitoquímica de los FGH en su sexto pase celular mostró ser positiva al inmunomarcador Vimentina (Figura 20) de manera que se observa una coloración café en la célula debido a la presencia de proteínas fibrosas denominadas vimentina. Para las CE en su octavo pase celular mostró ser positiva a los inmunomarcadores AE1/AE3 (Figura 21) y Ki67 (Figura 22) de manera que se observa una pigmentación marrón en el citoplasma de las células y una pigmentación rojiza en el núcleo de la células debido a la expresión de citoqueratinas y proliferación. Confirmando que ambas líneas celulares se trataban tanto de CE como de FGH.



Figura 20. Inmunocitoquímica CE 9, Ki67. Aumento 10X (A) y 20X (B).



Figura 21. Inmunocitoquímica CE, AE1/AE3. Aumento 10X (A) y 20X (B).



Figura 22. Inmunocitoquímica FGH, Vimentina. Aumento 10X (A) 20X (B).

4.- Microscopía de fluorescencia

Se realizaron observaciones **mediante el ensayo de Yoduro de Propidio a los 3 grupos experimentales** los días 3, 5 y 8. Para el primer grupo experimental (Figura 23) el cual es un andamio compuesto por fibroblastos gingivales humanos encapsulados, los cuales presentaron tener una capa basal, a su vez la zona perteneciente al andamio de pericardio bovino se observó con CE demostrando mayor contenido de estas a diferencia de la capa donde se observan los FGH . Nótese la morfología de ambas líneas celulares donde se observan los FGH con un aspecto fusiforme u ovalado y las células epiteliales con un aspecto poligonal y alargado. Además de encontrar mayor confluencia celular el día 5.

Primer modelo 3D.



Figura 23. Fotografías representativas del ensayo de yoduro de propidio del Grupo 1 con la presencia de FGH y CE. Día 3, con un aumento 40X, ZStack (A), El dia 5, con un aumento 10X (B) y 40X (B1) T150ms-ZStack, día 8 con un aumento 10X (C) T150ms-ZStack.

Para el grupo 2 (Figura 24) el cual es un andamio igualmente compuesto por FGH al tener un capa basal con células las cuales fueron encapsuladas a su vez la zona perteneciente del andamio de pericardio bovino se observa con CE las cuales igual fueron encapsuladas. Donde se observan ambos tipos celulares, donde se aprecia mayor confluencia celular el día 5. Sin embargo se sospecha que al utilizar doble encapsulamiento de las células el microscopio confocal no fue capaz obtener una mejor resolución de la imagen.

Segundo modelo 3D.



Figura 24. Fotografías representativas del ensayo de yoduro de propidio del Grupo 2 con la presencia de FGH y CE. Día 3, con un aumento 10X, ZStack (A), El dia 5, con un aumento 10X (B) T150ms-ZStack, dia 8 con un aumento 10X (C) y 40X (C1) T150ms-ZStack.

Para el grupo 3 (Figura 25) el cual es un andamio compuesto por FGH presenta tener una capa basal que a su vez está la zona perteneciente al andamio de pericardio bovino se observa con CE demostrando un contenido similar tanto de CE y FGH. Además, de encontrar mayor confluencia celular el día 5 y 8. Nótese la morfología de ambas líneas celulares donde se observan los FGH con un aspecto fusiforme u ovalado y las células epiteliales con un aspecto poligonal y alargado.

Tercer modelo 3D.



Figura 25. Fotografías representativas del ensayo de yoduro de propidio del Grupo 3 con la presencia de FGH y CE. Día 3, con un aumento 10X, T150ms-ZStack (A), El dia 5, con un aumento 10X (B) y 40X (B1) T150ms-ZStack, día 8 con un aumento 40X (C) T150ms-ZStack.

5.- Ensayo de viabilidad celular MTT

Ensayo para la evaluación de la viabilidad celular de modelos mediante el protocolo del ensayo MTT los días 3,5 y 8 mostró una mayor viabilidad celular el día 5 en comparación al día 3 y 8 presentando el mismo caso en los grupos 1 y 2 y una mayor viabilidad celular el día 8 para el grupo 3.

Resultados del ensayo de MTT: primer modelo 3D, los días 3, 5 y 8.



Figura 26. Gráfica representativa del ensayo de MTT y su desviación estándar del primer modelo 3D conformado de FGH encapsulados, andamio de pericardio bovino y CE, donde se presenta una mayor viabilidad celular el día 5 respecto a los días 3 y 8.



Modelo 1. Día 3

Modelo 1. Día 5

Modelo 1. Día 8

Figura 27.Fotografías representativas mediante microscopio óptico del primer modelo 3D al día 3,5 y 8, aumento 10X.

Resultados del ensayo de MTT: segundo modelo 3D, los días 3, 5 y 8.



Figura 28. Gráfica representativa del ensayo de MTT y su desviación estándar del segundo modelo 3D compuesto de FGH encapsulados, andamio de pericardio bovino y CE encapsulada, donde se presenta una mayor viabilidad celular el día 5 respecto a los días 3 y 8.



Modelo 2. Día 3

Modelo 2. Día 5

Modelo 2. Día 8

Figura 29. Fotografías representativas mediante microscopio óptico del segundo modelo 3D al día 3,5 y 8, aumento 10X.

Resultados del ensayo de MTT: tercer modelo 3D, los días 3, 5 y 8.



Figura 30. Gráfica representativa del ensayo de MTT y su desviación estándar del primer modelo 3D compuesto de andamio de pericardio bovino con FGH y CE, donde se presenta una mayor viabilidad celular el día 8 respecto a los días 3 y 5.



Grupo 3. Día 3

Grupo 3. Día 5



Figura 31. Fotografías representativas mediante microscopio óptico del tercer modelo 3D al día 3,5 y 8, aumento 10X.

El ensayo para la evaluación de la viabilidad celular de los grupos controles los días 3, 5 y 8 mediante el protocolo del ensayo MTT..

Viabilidad celular

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y primer grupo, día 3.



sultados del ensayo de MTT. grupos controles y primer grupo, di

Figura 32. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos controles y del primer modelo experimental al tercer día, donde se observa mayor viabilidad celular en el grupo de FGH + CE y una viabilidad similar en los grupos de FGH y CE y una menor viabilidad celular cuando los FGH están encapsulados.



Figura 33. Se realizaron fotografías representativas de los grupos controles el día 3 para observar la confluencia celular: FGH (A) 10X y (A1) 20X, FGH encapsulados (B) 10X y (B1) 20X, CE (C) 10X y (C1) 20X y FGH + CE (D) 10X y (D1) 20X.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y segundo grupo, día 3.



Viabilidad celular

Figura 34. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos controles y del segundo modelo experimental al tercer día, donde se observa mayor viabilidad celular en el grupo de FGH + CE y una viabilidad similar en los grupos de FGH y CE y una menor viabilidad celular cuando los FGH están encapsulados.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y tercer grupo, día 3.



Viabilidad celular

Figura 35. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos control y del tercer modelo experimental al tercer día, donde se observa viabilidad celular en similar grupo de FGH y CE.

Evaluación de la viabilidad celular de los grupos controles, día 5 mediante el protocolo del ensayo MTT.

Viabilidad celular



Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y primer grupo, día 5.

Figura 36. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos controles y del primer modelo experimental al quinto día, donde se observa mayor viabilidad celular de FGH + CE y también mayor viabilidad en los demás grupos controles.



Figura 37. Se realizaron fotografías representativas de los grupos controles el día 5 para observar la confluencia celular: FGH (A) 10X y (A1) 20X, FGH encapsulados (B) 10X y (B1) 20X, CE (C) X10 y (C1) 20X y FGH + CE (D) 10X y (D1) 20X.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y segundo grupo, día 5.



Viabilidad celular

Figura 38. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos controles y del primer modelo experimental al quinto día, donde se observa mayor viabilidad celular en el grupo de FGH + CE y así también mayor viabilidad en los demás grupos controles.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y tercer grupo, día 5.



Viabilidad celular

Figura 39. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos control y del tercer modelo experimental al quinto día, donde se observa una viabilidad celular mayor grupo de FGH y aumento de viabilidad del grupo de CE y del tercer modelo experimental.

Evaluación de la viabilidad celular de los grupos controles, día 8 mediante el protocolo del ensayo MTT.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y primer grupo, día 8.



Viabilidad celular

Figura 40. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos control y del primer modelo experimental al octavo día, donde se observa mayor viabilidad celular en el grupo control de FGH y FGH + CE y ligero aumento en el grupo de FGH encapsulados, sin embargo menor viabilidad celular en el grupo de CE.



Figura. Se realizaron fotografías representativas de los grupos controles el día 8 para observar la confluencia celular: FGH (A) 10X y (A1) 20X, FGH encapsulados (B) 10X y (B1) 20X, CE (C) 10X y (C1) 20X y FGH + CE (D) 10X y (D1) 20X.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y segundo grupo, día 8.



Viabilidad celular

Figura 41. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos control y del primer modelo experimental al octavo día, donde se observa mayor viabilidad celular en el grupo control de FGH y FGH + CE y ligero aumento en el grupo de FGH encapsulados, sin embargo menor viabilidad celular en el grupo de CE.

Resultados del ensayo de MTT: grupos controles y tercer grupo, día 8.



Viabilidad celular

Figura 42. Gráfica representativa del ensayo MTT de los grupos controles y del tercer modelo experimental al octavo día, donde se observa una viabilidad celular mayor en el grupo de FGH y menor viabilidad celular del grupo de CE.

El ensayo para la evaluación de la viabilidad celular de los 3 modelos experimentales evaluada a los días 3, 5 y 8 mediante el protocolo del ensayo MTT, se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías (Figura 43) mediante el software GraphPad Prism Versión 10.3.0 (461) donde se utilizaron las variables de viabilidad celular (en absorbancia) y los días entre los 3 grupos, donde no se mostró una diferencia estadística, sin embargo demostrando que el grupo 3 tuvo una mayor viabilidad celular hasta el día 8 respecto a los grupos 1 y 2..



Figura 43. Gráfica representativa del ensayo MTT de los 3 grupos experimentales en los días 3, 5 y 8, donde se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías.

6.- Microscopía Electrónica de Barrido

Se caracterizaron los modelos 3D: primer modelo 3D, Segundo modelo 3D y tercer modelo 3D **mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM),**, en los cuales se identificaron la adherencia de las células de FGH y CE mayormente en la superficie serosa y menor en la superficie fibrosa en un corte sagital del andamio descelularizado de pericardio bovino.



Figura 44. Primer modelo 3D, donde se observa sobre la superficie del andamio con las líneas celulares adheridas desde una vista frontal (A) y una vista sagital (B).



Figura 45. Segundo modelo 3D, donde se observa sobre la superficie del andamio con las líneas celulares adheridas desde una vista frontal (A) y una vista sagital (B).



Figura 46. Tercer modelo 3D, donde se observa sobre la superficie del andamio con las líneas celulares adheridas desde una vista frontal (A) y una vista sagital (B).

7.-Ensayo histológico mediante hematoxilina y eosina

Se realizó caracterización de los modelos experimentales los días 5 y 8:

Cortes histológicos del grupo 1 (Figura 47) teñidos con hematoxilina y eosina. Microfotografía A) Vista con aumento a 4x, A1) Vista con un aumento a 10x, procesada después de 5 días, se identifica componente anfófilo homogéneo bien delimitado (PreGel) que se relaciona íntimamente con haces gruesos y compactos de fibras de colágena con distintas angulaciones entre sí, y ausencia de componente celular. Microfotografía C) Vista con un aumento a 4x, D) Vista con un aumento a 10x, procesada después de 8 días, se observa material bien delimitado con afinidad de tinción anfófila (Hidrogel) relacionado con tejido conectivo fibroso denso sin presencia de células.



Figura 47. Fotografías representativas del ensayo H&E del Grupo 1. Con la presencia del andamio de pericardio bovino, el hidrogel TAB. Día 5 aumento 4x (A) y 10x (A1). Día 8, aumento 4x (B) y 10x (B1).

Cortes histológicos del grupo 2 teñidos con hematoxilina y eosina (Figura 48). Microfotografía A) Vista con aumento a 4x, A1) Vista con un aumento a 10x, procesada después de 5 días, se identifican fibras de colágena organizadas en haces delgados y angulados entre con escasa presencia de células, relacionadas a componente anfófilo (Hidrogel) bien delimitado. Microfotografía C) Vista con un aumento a 4x, D) Vista con un aumento a 10x, procesada después de 8 días, se observa matriz de tejido conectivo fibroso denso sin presencia de células con relación a tejido anfófilo bien delimitado (Hidrogel).



Figura 48. Fotografías representativas del ensayo H&E del Grupo 2. Con la presencia del andamio de pericardio bovino, el hidrogel TAB. Día 5 aumento 4x (A) y 10x (A1). Día 8, aumento 4x (B) y 10x (B1).

Cortes histológicos del grupo 3 teñidos con hematoxilina y eosina (Figura 49). Microfotografía A) Vista con aumento a 4x, A1) Vista con un aumento a 10x, procesada después de 5 días, se identifica tejido conectivo compuesto por fibras de colágena gruesas y compactas con escaso componente celular. B) Vista con un aumento a 4x, B1) Vista con un aumento a 10x, procesada después de 8 días, se observa tejido conectivo fibroso denso con ausencia de componente celular en la parte central y en la periferia células de FGH y CE de aspecto ahusado y alargado dispuestas de manera difusa.



Figura 49. Fotografías representativas del ensayo H&e del Grupo 3. Con la presencia del andamio de pericardio bovino, el hidrogel y FGH y CE. Día 5 aumento 4x (A) y 10x (A1). Día 8, aumento 4x (B) y 10x (B1).

Andamios de pericardio bovino con medio para FGH



Se realizaron fotografías del grupo control de los Andamios. De los días 3, 5 y 8 (A, B y C) con el microscopio óptico con un aumento 10X y con aumento 20X los mismos días (A1, B1 y C1) (Figura 50).

Hidrogel TAB



Se realizaron fotografías del Hidrogel con el microscopio óptico con un aumento 10X (A) y con aumento 20X (B) (Figura 51).

15. Discusión

En la actualidad la ingeniería de tejidos se ha extendido en el área de biomateriales al poder generar tejidos faltantes por medio de modelos tridimensionales los cuales buscan imitar un tejido *in vivo*.

En el presente estudio se trabajó con modelos tisulares a base de andamios de pericardio bovino con FGH y CE para imitar la mucosa oral y ser utilizados para la investigación de biomateriales en odontología. Se utilizaron andamios de pericardio bovino debido a sus diversas propiedades para ser utilizado como una MEC así como lo reportó Bielli et al., (2018) en un estudio in vitro documentó que los tejidos de pericardio de origen bovino son ampliamente utilizados en la ingeniería de tejidos debido a su estructura de tipo mecánico, rica en colágeno y en glicosaminoglicanos que funcionan como una matriz extracelular biocompatible, permitiendo la proliferación y viabilidad celular para ser utilizado como un andamio. Los andamios pasaron por un proceso de descelularización primeramente por un proceso de hinchamiento alcalino reversible, seguido de tratamiento con detergente no iónico y finalmente por un tratamiento con nucleasas para ser utilizados como una MEC, así como lo documentó Mendoza et al., (2011) en un estudio para la descelularización de tejidos de pericardio bovino realizó un proceso de hinchamiento alcalino reversible, seguido de un tratamiento con detergente no-iónico y adicionalmente un tratamiento con nucleasas donde se demostró una alta efectividad de descelularización del tejido sin dañar considerablemente la integridad de la estructura y de los glicosaminoglicanos. El andamio de pericardio bovino del presente estudio se caracterizó mediante el ensavo SEM donde se observó una superficie acelular de tipo serosa y una superficie fibrosa con fibras de colágeno así como lo reportó Moharamzadeh et al ., (2008) en un estudio in vitro con modelos tisulares de pericardio bovino con FGH y CE mediante ensayos de microscopía electrónica e inmunotinciones observaron la estructura de los andamios de pericardio bovino presentaban una superficie fibrosa y serosa con fibras de colágeno posicionadas de manera aleatoria.

En este estudio se optó por utilizar cultivos primarios de FGH en un pase celular 6 a cuatro semanas de su primer subcultivo y CE en un pase celular 8 a ocho semanas de su primer subcultivo, ya que estas células están presentes en los epitelios de la cavidad oral. Donde la literatura menciona que los cultivos primarios deben ser utilizados en sus primeros pases celulares así como menciona Shwetha et al., (2019) en un estudio *in vitro* donde realizó un cultivo *ex vivo* de mucosa oral, donde llevó a cabo cultivos primarios de CE, destacando que los cultivos primarios suelen tener características celulares similares al tejido *in vivo*, sin embargo, las células de cultivos primarios tienen un límite de vida reducido denominado Hayflick , que propicia que entren a senescencia. En el presente estudio se realizaron cultivos primarios de FGH hasta obtener una óptima confluencia celular y se observó su morfología mediante microscopía óptica que presentaban un aspecto oval y prolongado así como lo documentó Víctor et al., (2019) en una revisión bibliográfica donde menciona que los FGH en cultivos primarios presentan una morfología

fusiforme u ovalada, con un citoesqueleto constituido con microfilamentos de actina y proteínas denominadas vimentina. En este estudio, para confirmar que eran FGH se realizó un ensayo de inmunocitoquímica con inmunomarcador vimentina los cuales fueron positivos así como lo documentó Alfonso et al., (2022) en un estudio in vitro se llevaron a cabo cultivos primarios de FGH y se caracterización con inmunohistoquímica los cuales fueron positivos al inmunomarcador vimentina. Además, en este estudio se realizaron cultivos primarios de CE donde se observó mediante microscopía óptica que tenían una morfología poligonal y estrellada así como lo documenta Motino et al., (2019) en un estudio in vitro donde realizaron cultivos primarios de CE donde describieron que su morfología son de aspecto poligonal, alargadas y planas. Además, en este estudio para confirmar que eran CE se realizó el ensayo de inmunocitoquímica con inmunomarcadores AE1/AE3 y KI67 los cuales también fueron positivos así como documentó Gómez., et al (2019) donde menciona que las citoqueratinas 5-14 y 1-10 son proteínas que se encuentran en el epitelio oral gueratinizado por lo gue el inmunomarcador AE1/ AE3 al ser un cóctel de citoqueratina es positivo a este tipo de células. AlFatlawi et al., (2023) en una revisión sistemática concluyeron que en once estudios diferentes de modelos 3D de mucosa oral in vitro utilizaron el inmunomarcador Ki67 que fue positivo a la proliferación de distintas citoqueratinas en zonas basales y en sus estratos.

Al caracterizar nuestras células y los andamios se realizaron tres grupos diferentes de modelos tisulares conformados por andamios de pericardio bovino, Fibroblastos Gingivales Humanos y queratinocitos orales encapsulados en un hidrogel TAB a excepción del grupo 3. Los modelos se sometieron al ensayo de Yoduro de Propidio los días 3, 5 y 8 bajo microscopía confocal donde presentó mayor proliferación de ambos tipos celulares en la capa basal durante el día 5 y decreciendo en el día 8 a excepción del grupo 3. Además, se observó la morfología de ambos tipos de células presentes así como lo documentó Colangelo et al., (2023) en un estudio *in vitro* donde se realizó un modelo 3D con fibroblastos gingivales humanos encapsulados en un hidrogel de ácido hialurónico realizaron un ensayo con Yoduro de Propidio donde se identificó mediante microscopía confocal la viabilidad celular de los modelos 3D y de su morfología.

El ensayo MTT demostró la viabilidad celular de los modelos tisulares 3D los días 3, 5 y 8 y de los grupos controles, donde se comprobó que la viabilidad celular más alta fue el día 5 para los grupos 1 y 2 y para los grupos controles de CE, sin embargo la viabilidad celular decrecía al día 8. Destacando también, que el grupo control de FGH tenían una mayor confluencia celular en comparación al grupo control del co-cultivo de FGH y CE. Por último, el grupo 3 experimental siguió viable al día 8 en comparación al grupo 1 y grupo 2 así como lo documentó Arenholt et al., (1987) en un estudio *in vitro* donde realizó un cultivo primario de células de FGH y CE, identificaron mediante ensayos de microscopía electrónica que las células gingivales *in vitro* entran en decadencia mitótica de la segunda a la cuarta semana después del primer pase celular entrando en

senescencia, destacando que en este proyecto se utilizaron CE epiteliales en un pase celular 8, o ocho semanas de su primer subcultivo.

Recalcando además que los grupos experimentales y controles se encontraban con una confluencia celular del 80% al 90% el día 5 ocupando la mayor área de superficie de los pozos, lo cual podría propiciar una fase estática al momento de llegar al 100% de confluencia celular así como lo reportó Verma et al., (2020) donde hicieron una revisión de la literatura sobre características y las etapas del ciclo de crecimiento de los cultivos celulares *in vitro;* división celular, crecimiento del subcultivo y el punto de saturación. Los cuales pasan por 3 vías desde el crecimiento del primer subcultivo hasta aumento súbito del 90% al 100% de confluencia celular donde las células se encuentran en íntimo contacto entre sí y sin espacio en la superficie entrando en una fase estática donde el crecimiento disminuye del 0% al 10%.

En el ensayo MTT el grupo 3 experimental presentó una mayor viabilidad celular el cual estaba conformado de un andamio de pericardio bovino, FGH y CE sin estar encapsulados en un hidrogel en comparación a los grupos 1 y 2, además se demostró que el grupo control de FGH no encapsulados tuvo una mayor viabilidad en comparación al grupo de FGH encapsulados durante los días 3, 5 y 8. Por lo que se cree que las estrategias de cultivos con hidrogeles pudieron afectar a la adhesión y viabilidad celular de los modelos 3D así como lo documentó Fernandez et al., (2021) en un estudio *in vitro* menciona que existen diversos factores que pueden alterar el crecimiento celular cuando las células se encuentran encapsuladas en un hidrogel, como es la plasticidad, degradación, viscoelasticidad, la fibrosidad, velocidad de relajación ante el estrés y el tipo de enlaces que contiene.

En este proyecto se caracterizaron los modelos 3D para estudio histopatológico con hematoxilina y eosina al día 5 y 8 donde se demostró que el grupo 3 tuvo presencia celular de FGH y CE, al presentar una mejor organización celular más cercana al tejido de interés, lo que se atribuye que las células al estar encapsuladas no pueden migrar y adherirse a una superficie serosa como es la del andamio así como lo documentó Moharamzadeh et al ., (2008) donde caracterizó con H&E modelos tisulares 3D a base de andamios de colágeno tipo 1 con FGH y CE encapsuladas en hidrogeles donde se demostrando una escasa adhesión y proliferación celular sobre los andamios de colágeno.

En el presente proyecto se caracterizaron los 3 modelos tisulares al día 8 mediante SEM, se observó mayor adhesión de ambos tipos de células sobre esta superficie serosa del andamio donde se realizó el cultivo celular y menor en la superficie fibrosa así como lo documentó Moharamzadeh et al ., (2008) en un estudio *in vitro* donde caracterizó mediante ensayos de microscopía electrónica modelos tisulares de colágeno tipo 1 con FGH y CE donde observó una mayor presencia celular sobre la superficie fibrosa debido

a que habían realizado los cultivos sobre esta superfice. Determinado que la siembra celular sobre una superficie porosa permite una mayor adhesión y proliferación celular.

Dado a los ensayos y resultados obtenidos fue posible generar modelos 3D a base de andamios de pericardio bovino con FGH y CE, sin embargo existen diferentes variables que se deben tomar en cuenta para generar un modelo con las características ideales al tejido que se requiere obtener.

La metodología empleada de cultivo del grupo 3 a base de un andamio de pericardio bovino con FGH y CE no encapsuladas permitió la adherencia de estas dos tipos de células, el cual podría mejorar en un futuro al utilizar cultivos primarios en sus primeros pases celulares sin ser encapsuladas y así obtener un modelo fidedigno con los estratos de la mucosa bucal.
16. Conclusión

Como conclusiones preliminares del presente estudio:

Los resultados reportados en este proyecto de investigación demuestran que los modelos tisulares 3D a base de andamios de pericardio bovino con FGH y CE de cultivos primarios tuvieron propiedades de adhesión, proliferación y viabilidad celular que en conjunto abren posibilidades para en un futuro uso en el área de odontología para la investigación de biomateriales dentales.

Se evaluó la superficie y estructura de los modelos 3D los días 3, 5 y 8 mediante caracterización con SEM donde se observó la adhesión y proliferación celular de ambos tipos de células sobre la superficie serosa del andamio, donde se considera que una superficie porosa podría tener una mayor adhesión y proliferación celular, igualmente con el ensayo de yoduro de propidio mediante microscopía confocal y óptica se observó la presencia y la morfología de FGH y CE y se caracterizaron con el ensayo H&E donde existió una organización celular del grupo 3 al día 8.

Se realizaron ensayos MTT para evaluar la viabilidad celular de los modelos 3D, donde el grupo 3 presentó una mayor viabilidad y proliferación celular, en comparación al grupo 1 y grupo 2 al no contar con células encapsuladas. Donde el grupo 3 presentó una viabilidad celular al día 3 de .148±03 y al día 8 un incremento a .762±.04.

Destacando también que las células de cultivos primarios deben ser utilizadas en sus primeros pases celulares para evitar un límite Hayflick y senescencia celular como se mostró en los modelos experimentales y en el grupo control de CE. Además, se debe tomar en cuenta las fases de crecimiento de los cultivos primarios para no alcanzar una confluencia celular prematura, así como también conocer los diferentes factores que pueden afectar la proliferación, migración y adhesión celular al estar encapsuladas.

17. Bibliografía

- Mendoza-Novelo, B., Avila, E. E., Cauich-Rodríguez, J. V., Jorge-Herrero, E., Rojo, F. J., Guinea, G. V., & Mata-Mata, J. L. (2011). Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. Acta Biomaterialia, 7(3), 1241–1248. <u>https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.017</u>
- Bielli, A., Bernardini, R., Varvaras, D., Rossi, P., Di Blasi, G., Petrella, G., Buonomo, O. C., Mattei, M., & Orlandi, A. (2018). Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 78, 420–426. <u>https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.12.003</u>
- 3. Gomez de Ferraris, M.E., Campos Muñoz, A. (2019). Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental 4ta. Medica Panamericana.
- 4. Capitán Cañadas, L. M. (2006). Caracterización histológica de mucosa oral de espesor completo obtenida mediante ingeniería tisular.
- Lizarbe, M. De la Cultura Científica y Tecnológica, V. P. de P. (s/f). SUSTITUTIVOS DE TEJIDOS: DE LOS BIOMATERIALES A LA INGENIERÍA TISULAR. (2007. Rac.es. Recuperado el 15 de noviembre de 2023, de <u>https://rac.es/ficheros/doc/00483.pdf</u>
- 6. Actis, A. B. (octubre, 2014). Sistema Estomatognático. Bases Morfofuncionales Aplicadas a la Clínica. 1ra Edición. Ed: Medica Panamericana S.A.
- Roque Limón, C., Vega Ramírez, C., (2008). tejido epitelial, presentación en tercera dimensión. Tesina para obtener el grado de cirujana dentista. Escuela Nacional Autónoma de México.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. International Journal of Molecular Sciences, 22(23), 12827. <u>https://doi.org/10.3390/ijms222312827</u>
- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Research Notes, 8(1). <u>https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8</u>
- 10. ALTAMIRANO, M. A. G. (2015). Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía óptica de campo claro.
- Shyam, R., Reddy, L. V. K., & Palaniappan, A. (2023). Fabrication and characterization techniques of in vitro 3D tissue models. International Journal of Molecular Sciences, 24(3), 1912. <u>https://doi.org/10.3390/ijms24031912</u>
- Moysidou, C.-M., Barberio, C., & Owens, R. M. (2020). Advances in engineering human tissue models. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 620962. <u>https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.620962</u>
- Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A.-M., & Majidi Zolbin, M. (2022). Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: Evaluation, modification, and application methods. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10, 805299. <u>https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299</u>.
- 14. Brown, B. N., & Badylak, S. F. (2014). Extracellular matrix as an inductive scaffold

for functional tissue reconstruction. Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 163(4), 268–285. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.003.

- Yadev, N. P., Murdoch, C., Saville, S. P., & Thornhill, M. H. (2011). Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis. Microbial Pathogenesis, 50(6), 278–285. <u>https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.11.009</u>.
- Morse, D. J., Wilson, M. J., Wei, X., Lewis, M. A. O., Bradshaw, D. J., Murdoch, C., & Williams, D. W. (2018). Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. Journal of Medical Microbiology, 67(3), 364–375. <u>https://doi.org/10.1099/jmm.0.000677</u>.
- 17. Víctor, S.-E., Antonio, D.-C., Msc, O., Celular, B., & Candidato A Doctor En Fisiología, P. (2019). Fisiología y usos terapéuticos de los fibroblastos gingivales Physiology and therapeutic uses of gingival fibroblasts. Edu.ve. Recuperado el 22 de noviembre de 2023, de <u>http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/vol20n1/art05.pdf</u>.
- 18. Vargas, A. P. C., Yáñez, B. R., Monteagudo, C.A., (2016). Periodontología e Implantología. 1ra Edición.
- Simancas-Escorcia, V., Leal-Betancur, J., Díaz-Caballero, A., & Orozco-Páez, J. (2021). Comparación de métodos histoquímicos para el análisis histológico de muestras de encía humana. Revista cubana de estomatologia, 58(4). <u>http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072021000400004</u>
- Mendibil, U., Ruiz-Hernandez, R., Retegi-Carrion, S., Garcia-Urquia, N., Olalde-Graells, B., & Abarrategi, A. (2020). Tissue-specific decellularization methods: Rationale and strategies to achieve regenerative compounds. International Journal of Molecular Sciences, 21(15), 5447. <u>https://doi.org/10.3390/ijms21155447</u>
- 21. Moffat, D., Ye, K., & Jin, S. (2022). Decellularization for the retention of tissue niches. Journal of Tissue Engineering, 13, 204173142211011. <u>https://doi.org/10.1177/20417314221101151</u>
- Akbari Zahmati, A. H., Alipoor, R., Rezaei Shahmirzadi, A., Khori, V., & Abolhasani, M. M. (2017). Chemical decellularization methods and its effects on extracellular matrix. Internal medicine and medical investigation journal, 2(3), 76. <u>https://doi.org/10.24200/imminv.v2i3.63</u>
- Fernández-Pérez, J., & Ahearne, M. (2019). Author Correction: The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. Scientific Reports, 9(1), 19818. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-019-56283-4</u>
- 24. Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., & Liu, C. (2022). Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. Bioactive Materials, 10, 15–31. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014
- 25. Fina, B. L., Lombarte, M., & Rigalli, A. (2013). INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN VIVO, IN VITRO O IN SILICO? Gov.ar. <u>https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/21655/CONICET_Digital_Nro.2572</u> <u>9.pdf?sequence=1&isAllowed=y</u>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures a comparison of different types of cancer cell cultures. Archives of

medical science: AMS. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743

- 27. Ryan, S.-L., Baird, A.-M., Vaz, G., Urquhart, A. J., Senge, M., Richard, D. J., O'Byrne, K. J., & Davies, A. M. (2016). Drug discovery approaches utilizing cell culture. Assay and Drug Development Technologies, 14(1), 19–28. https://doi.org/10.1089/adt.2015.670
- Shyam, R., Reddy, L. V. K., & Palaniappan, A. (2023). Fabrication and characterization techniques of in vitro 3D tissue models. International Journal of Molecular Sciences, 24(3), 1912. <u>https://doi.org/10.3390/ijms24031912</u>
- 29. Tosca, E. M., Ronchi, D., Facciolo, D., & Magni, P. (2023). Replacement, reduction, and refinement of animal experiments in anticancer drug development: The contribution of 3D in vitro cancer models in the drug efficacy assessment. Biomedicines, 11(4), 1058. <u>https://doi.org/10.3390/biomedicines11041058</u>
- Boraschi, D., & Italiani, P. (2017). Model Validity in Nanoimmunosafety: Advantages and Disadvantages of In vivo vs In vitro Models, and Human vs Animal Models. Current Bionanotechnology, 2(2), 71–76. doi:10.2174/2213529402666160601121721
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. D. P. (2015).
 3D cell culture systems: Advantages and applications. Journal of Cellular Physiology, 230(1), 16–26. <u>https://doi.org/10.1002/jcp.24683</u>
- 32. Marin, E. (2023). History of dental biomaterials: biocompatibility, durability and still open challenges. *Heritage Science*, 11(1). https://doi.org/10.1186/s40494-023-01046-8
- Grefen, L., König, F., Grab, M., Hagl, C., & Thierfelder, N. (2018). Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 29(11), 172. <u>https://doi.org/10.1007/s10856-018-6186-6</u>
- Pagoulatou, E., Triantaphyllidou, I.-E., Vynios, D. H., Papachristou, D. J., Koletsis, E., Deligianni, D., & Mavrilas, D. (2012). Biomechanical and structural changes following the decellularization of bovine pericardial tissues for use as a tissue engineering scaffold. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 23(6), 1387–1396. <u>https://doi.org/10.1007/s10856-012-4620-8</u>
- 35. Manikyam, H. K., Joshi, S. K., Vakadi, S., & Patil, S. B. (2021). Anticancer activity of terpenoid saponin extract of Psidium guajava on MCF-7 cancer cell line using DAPI and MTT assays. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *15*(12), 206-211.
- 36. Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D cell culture systems: Tumor application, advantages, and disadvantages. International Journal of Molecular Sciences, 22(22), 12200. <u>https://doi.org/10.3390/ijms222212200</u>
- Fernandez, D. V., & Vazquez, B. L. (2021).*Hidrogeles como plataformas tridimensionales para cultivos celulares: Diez parámetros a considerar y respuestas celulares asociadas*. (ICTP-CSIC), 28006, Madrid, España.,REVISTA DE PLÁSTICOS MODERNOS Vol. 121 Número 768.
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., Van Noort, R., Scutt, A. M., Smith, K. G., & Thornhill, M. H. (2008). Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 19(4), 1793–1801. <u>https://doi.org/10.1007/s10856-007-3321-1</u>

- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. Tissue Engineering. Part B, Reviews, 19(6), 485–502. <u>https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437</u>
- 40. von Bilderling, 2do Cuat Rimestre de 2011 Docentes: Lía Pietrasanta y. Catalina. (s/f). Tópicos en Biofísica Molecular. Uba.ar. Recuperado el 10 de julio de 2024, de http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_labo3.pdf
- Shwetha, H. R., Kotrashetti, V. S., Babu, N. C., Kumbar, V., Bhat, K., & Reddy, R. (2019). Ex vivo culture of oral keratinocytes using direct explant cell culture technique. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, *23*(2), 243–247. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_105_19
- 42. Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(7), db.prot087163. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163
- 43. Esmaeili Pourfarhangi, K., Mashayekhan, S., Asl, S. G., & Hajebrahimi, Z. (2018). Construction of scaffolds composed of acellular cardiac extracellular matrix for myocardial tissue engineering. *Biologicals: Journal of the International Association* of *Biological* Standardization, 53, 10–18. <u>https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.03.005</u>
- 44. Kenar, H., Kose, G. T., Toner, M., Kaplan, D. L., & Hasirci, V. (2011). A 3D aligned microfibrous myocardial tissue construct cultured under transient perfusion. *Biomaterials*, 32(23), 5320–5329. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.025
- Mahesh, Iyer, M. S., Swamy, R., Patil, K., & Raghunath. (2021). Biomaterials and their applications in dentistry - A literature review. *Journal of evolution of medical* and dental sciences, 10(26), 1940–1947. <u>https://doi.org/10.14260/jemds/2021/399</u>
- Magalhães, J., Pinheiro, M., Drasler, B., Septiadi, D., Petri-Fink, A., Santos, S. G., Rothen-Rutishauser, B., & Reis, S. (2020). Lipid nanoparticles biocompatibility and cellular uptake in a 3D human lung model. *Nanomedicine (London, England)*, *15*(3), 259–271. https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0256
- 47. Parks, A. C., Sung, K., & Wu, B. M. (2014). A three-dimensional in vitro model to quantify inflammatory response to biomaterials. *Acta Biomaterialia*, *10*(11), 4742–4749. <u>https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.07.029</u>
- 48. Alberts, B. Johnson, A. (2010). Biología molecular de la célula. 5ta edición,

Omega.

- 49. Novus.Immunocytochemistry (ICC) Handbook. Novus Biologicals a Bio-Techne Brand. (S/f-b). Novusbio.com. Recuperado el 10 de julio de 2024, de https://images.novusbio.com/design/BR_ICCguide.pdf
- 50. Tapia, I. A. N., Jiménez, R. M. J., & Barba, M. C. P. (2024). Hidrogeles en ingeniería de tejidos. *Materiales Avanzados*, (40), 64-70.
- 51. Serrato Ochoa, D., Nieto Aguilar, R., & Aguilera Méndez, A. (2015). Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, 64, 61–69. <u>https://doi.org/10.33064/iycuaa2015643597</u>
- 52. Morino, T., Takagi, R., Yamamoto, K., Kojima, H., & Yamato, M. (2019). Explant

culture of oral mucosal epithelial cells for fabricating transplantable epithelial cell sheet. *Regenerative Therapy*, *10*, 36–45. <u>https://doi.org/10.1016/j.reth.2018.10.006</u>

- Alfonso García, S. L. (2022). Caracterización de fibroblastos aislados de la mucosa palatina de individuos con defectos de labio y/o paladar hendido no sindrómico en cultivo 2D y 3D.
- Colangelo, M. T., Vicedomini, M. L., Belletti, S., Govoni, P., Guizzardi, S., & Galli, C. (2023). A biomimetic polynucleotides–hyaluronic acid hydrogel promotes the growth of 3D spheroid cultures of gingival fibroblasts. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, *13*(2), 743. <u>https://doi.org/10.3390/app13020743</u>
- 55. AlFatlawi, Z., Huang, M., Chau, D. Y. S., & D'Aiuto, F. (2023). Three dimensional (3D) gingival models in periodontal research: a systematic review. *Journal of Materials Science*. *Materials in Medicine*, 34(11). https://doi.org/10.1007/s10856-023-06761-z
- 56. Arenholt-Bindslev, D., Jepsen, A., MacCallum, D. K., & Lillie, J. H. (1987). The growth and structure of human oral keratinocytes in culture. *The Journal of Investigative Dermatology*, 88(3), 314–319. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12466191
- 57. Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. En *Animal Biotechnology* (pp. 269–293). Elsevier.