



Implementación de un protocolo de extracción de fibroblastos de tejido humano en el laboratorio de ensayos biológicos del programa de Bioingeniería de la Universidad de Antioquia

Juan David Bravo Patiño

Trabajo de investigación para optar al título de Bioingeniero

Asesoras:

Liliana María Arroyave Muñoz, Magíster (MSc) en Ingeniería de Materiales
Claudia Patricia Ossa Orozco, Doctor (PhD) en Ingeniería Metalúrgica y de Materiales

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Programa de Bioingeniería
Medellín
2022

Cita	Bravo Patiño [1]
Referencia Estilo IEEE (2020)	[1] J. D. Bravo Patiño, “Implementación de un protocolo de extracción de fibroblastos de tejido humano en el laboratorio de ensayos biológicos del programa de Bioingeniería de la Universidad de Antioquia”, Proyecto de investigación, Bioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, 2022.



Grupo de Investigación en Biomateriales -BIOMAT-.



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla.

Jefe departamento: John Fredy Ochoa Gómez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mis padres que mediante su apoyo incondicional siempre fueron el motor para el cumplimiento de mis objetivos. Por sus valiosas enseñanzas, consejos y principalmente por inculcar en mí el valor de la resiliencia.

Agradecimientos

Agradecimientos a mis asesoras Liliana Arroyave y Claudia Ossa por su acompañamiento y transmisión de conocimientos en el desarrollo del proyecto. A la Dr. Laura Osorio Vélez por su amabilidad y disponibilidad para la donación de las muestras de tejido. A la bioingeniería Yuli Perea por su ayuda con los procesos de esterilización. A los auxiliares de laboratorio Felipe y Gabriel por su cordialidad para el acceso al laboratorio de ensayos biológicos en la sede oriente de la Universidad de Antioquia. Al profesor Julián David Muñoz Duque del grupo de estudio Patobiología Quirón y a la histotecnóloga Luisa Fernanda Muñoz Muñoz por las tinciones de los hGF.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. OBJETIVOS	13
A. Objetivo general	13
B. Objetivos específicos	13
III. MARCO TEÓRICO	14
A. Ingeniería de tejidos	14
B. Tejido gingival	15
C. Fibroblastos	16
D. Fibroblastos autólogos vs alogénicos	17
E. Cultivo primario	18
F. Problemas asociados a la extracción de tejidos primarios	19
G. Biomateriales	20
IV. METODOLOGÍA	21
A. Protocolo de descontaminación	21
B. Biopsia gingival	23
C. Cultivo celular	26
D. Subcultivo celular	28
E. Conteo celular con cámara de Neubauer	29
F. Criopreservación de fibroblastos gingivales	31
G. Sustitutos de tejido vascular	31
H. Ensayos experimentales	33
a. Caracterización celular	33
b. Ensayo de citotoxicidad fibroblastos gingivales y L929	33
V. RESULTADOS	37

A. Test de esterilización	37
B. Cultivo celular	38
C. Subcultivo celular	39
D. Conteo celular	40
E. Caracterización celular	41
F. Ensayo de citotoxicidad	43
VI. ANÁLISIS	45
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS	52
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

TABLA I. TIPOS DE CÉLULAS EN LA LÁMINA PROPIA.	16
TABLA II. PROTOCOLO DE DESCONTAMINACIÓN .	21
TABLA III. TEST DE ESTERILIZACIÓN.	23
TABLA IV. PROCEDIMIENTOS APTOS PARA RECIBIR DONACIONES DE TEJIDO GINGIVAL.	24
TABLA V. DISTRIBUCIÓN DE CANTIDADES- DIA 2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.	35
TABLA VI. CONTEO CELULAR.	41
TABLA VII. DIFERENCIA DE % DE VIABILIDAD CELULAR ENTRE hGF Y L929.	44

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.Ciclo de la ingeniería de tejidos.	14
Fig. 2.Esquema de la histología gingival.	15
Fig. 3.Muestras de tejido depositadas en tubos eppendorf.	26
Fig. 4.Cabina de bioseguridad.	27
Fig. 5.Trozos de tejido gingival.	27
Fig. 6. Sedimento en el fondo de tubo falcon.	29
Fig. 7.Cámara de Neubauer.	30
Fig. 8.Distribución de cuadrantes en cámara de Neubauer.	30
Fig. 9.Montaje para la realización de sustitutos de tejido vascular.	32
Fig. 10. Sustitutos de tejido vascular.	32
Fig. 11.Células cultivadas en cubreobjetos.	33
Fig. 12.Placa de cultivo de 96 pocillos.	34
Fig. 13. Distribución placa de cultivo hGF y L929.	34
Fig. 14.Contaminación en caja petri.	37
Fig. 15.Detección de contaminación en caja petri.	37
Fig. 16.Migración de fibroblastos de tejido gingival	38
Fig. 17.Aumento en la confluencia de fibroblastos gingivales	39
Fig. 18.Confluencia del 80% de fibroblastos gingivales	39
Fig. 19.Confluencia uniforme de fibroblastos gingivales cultivados en frasco T-75	40
Fig. 20.Conteo de células en cuadrante I	41
Fig. 21.Fibroblastos sembrados en cubreobjetos	42
Fig. 22.Tinción de hGF por método H & E.	42
Fig. 23.Resultados de citotoxicidad para hGF	43
Fig. 24.Resultados de citotoxicidad para L929	44

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

hGF	Fibroblastos gingivales humanos
H&E	Hematoxilina y eosina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco [pH 7,2]
SFB	Suero fetal bovino
PS	Penicilina y estreptomycinina

RESUMEN

Los fibroblastos son las células más abundantes del tejido conectivo, juegan un papel importante en la cicatrización de heridas mediante la formación de matriz extracelular. Gracias a su prominencia, muchas enfermedades, lesiones y patologías genéticas están vinculadas a este tipo de células, lo cual permite a investigadores realizar avances bioquímicos mediante el cultivo celular de fibroblastos. El aislamiento de células a partir de la extracción de tejidos primarios es un componente esencial para la investigación médica, ya que son una fuente confiable para comprender el proceso fisiológico, morfológico y molecular de las células humanas. El objetivo de este proyecto fue implementar y estandarizar un protocolo de extracción de fibroblastos de tejido gingival. Para ello se realizó una propuesta inicial del proceso de extracción celular utilizando biopsias de tejido gingival clínicamente sanas. La extracción de las células se realizó utilizando una combinación del método de digestión enzimática y el método de explante directo. Después de varios pasajes se obtuvo un cultivo celular confluyente. Finalizado lo anterior se realizó la caracterización morfológica mediante tinción de H&E verificando la morfología característica de los fibroblastos y caracterización cuantitativa mediante el uso de un hemocitómetro. Mediante el ensayo de citotoxicidad MTT se evaluó la biocompatibilidad de un biomaterial proporcionado por el grupo de investigación BIOMAT con los fibroblastos gingivales (hGF) obtenidos. Se obtuvo una menor viabilidad celular comparable con la línea L929.

***Palabras clave* — hGF, 1929, viabilidad celular, biomaterial, contaminación.**

ABSTRACT

Fibroblasts are the most abundant cells of connective tissue and play an important role in wound healing through the formation of extracellular matrix. Due to their prominence, many diseases, injuries and genetic pathologies are linked to this cell type, allowing researchers to make biochemical advances through fibroblast cell culture. Isolation of cells from primary tissue extraction is an essential component for medical research, as they are a reliable source for understanding the physiological, morphological and molecular process of human cells. The objective of this project was to implement and standardize a protocol for the extraction of fibroblasts from gingival tissue. For this purpose, an initial proposal of the cell extraction process was made using clinically healthy gingival tissue biopsies. Cell extraction was performed using a combination of the enzymatic digestion method and the direct explant method. After several passages, a confluent cell culture was obtained. Morphological characterization was performed by H & E staining to verify the characteristic morphology of fibroblasts and quantitative characterization using a hemocytometer. Using the MTT cytotoxicity assay, the biocompatibility of a biomaterial provided by the "BIOMAT" research group with the obtained gingival fibroblasts (hGF) was evaluated. A lower cell viability comparable with the L929 line was obtained.

***Keywords* — hGF, I929, cell viability , biomaterial, contamination.**

I. INTRODUCCIÓN

El uso de fibroblastos en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos representa un gran avance en las investigaciones globales. Esto debido a su facilidad de aislamiento y a su capacidad de secretar varios factores de crecimiento y citocinas, los cuales desencadenan actividades celulares como la proliferación, diferenciación y la formación de matriz extracelular. Estas células crecen y se expanden rápidamente a partir de muestras pequeñas, lo cual convierte a los fibroblastos en candidatos adecuados para estudios funcionales, bioquímicos y genómicos [1],[2].

A partir de ellos se ha logrado tratar diversos tipos de lesiones como: úlceras crónicas y quemaduras, además de patologías genéticas de la piel como la epidermólisis bullosa más conocida como piel de mariposa [3]. Existen diversos productos comerciales para el tratamiento de estas enfermedades, sin embargo, la comercialización de dichos productos no es común, por lo cual se recurre a otro modelo de tratamientos de tipo curativo y nutricional [4]. Por tal motivo el establecimiento de cepas de fibroblastos proporciona un vehículo mediante el cual se pueden aplicar estudios bioquímicos. Además de proporcionar material genético, los cultivos celulares de fibroblastos establecidos a partir de biopsias de tejidos pueden proporcionar al investigador un modelo en el que puede estudiar enfermedades específicas [1].

La norma ISO 10993 establece a los fibroblastos de la línea celular L929 como candidatos predilectos para la realización de ensayos biológicos como el ensayo de citotoxicidad [5]. Sin embargo, la dificultad y el tiempo de espera para conseguir estas células en el laboratorio de ensayos biológicos sede El Carmen y la poca relevancia clínica de los datos derivados de estudios *in vitro* con líneas celulares generan complicaciones al momento de realizar pruebas de desempeño biológico a biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos [6],[7].

El grupo de investigación de biomateriales de la Universidad de Antioquia ha realizado investigaciones importantes referentes a la ingeniería de tejidos mediante la creación de scaffolds de origen polimérico y cerámico para la regeneración de distintos tejidos del cuerpo. La aplicación de ensayos biológicos en dichos scaffolds es indispensable para evaluar y tener una aproximación de lo que será el comportamiento celular *in vivo*, es decir, la adherencia celular, proliferación y diferenciación. El objetivo de este proyecto fue la implementación de un protocolo de extracción de fibroblastos de tejido humano, la caracterización morfológica y

cuantitativa de las células extraídas y finalmente la evaluación citotóxica de un biomaterial particular con el cultivo celular mediante el ensayo MTT.

Se obtuvieron hGF transcurridos 6 días de haber realizado el cultivo del tejido. La confluencia uniforme de las células se observó a partir del tercer pasaje. Los hGF se caracterizaron mediante la tinción con hematoxilina y eosina (H&E), se observó el núcleo y el citoplasma de las células. El ensayo de citotoxicidad dio como resultado la comparación de los hGF y la línea celular L929, encontrando una menor lectura de absorbancia por parte de las células provenientes de la mucosa bucal, pero su viabilidad celular fue comparable con respecto a su control negativo. Por otro lado los hGF presentaron una mayor viabilidad celular frente al dimetilsulfóxido (DMSO). Con base a los resultados, fue posible disponer de un protocolo estandarizado y verificado que mediante su uso permitirá de manera sencilla obtener un número considerable de hGF para evaluar biomateriales en prácticas de laboratorio para el programa de bioingeniería y futuros proyectos de investigación de pregrado y posgrado.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Implementar un protocolo de extracción de fibroblastos de tejido humano en el laboratorio de ensayos biológicos del programa de bioingeniería de la Universidad de Antioquia.

B. Objetivos específicos

- Proponer un proceso de extracción de fibroblastos de tejido humano
- Caracterizar morfológica y cuantitativamente los fibroblastos mediante técnicas de microscopía.
- Evaluar la citotoxicidad en un biomaterial particular usando los fibroblastos extraídos.

IV. MARCO TEÓRICO

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos representa una alternativa viable al trasplante de órganos o tejidos evitando inconvenientes como la escasez de estos y el rechazo inmunológico en el caso de trasplantes alogénicos. Uno de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos es desarrollar tratamientos para la reconstrucción de tejidos que no poseen la capacidad de regenerarse, esto a partir de tres herramientas básicas: células colonizadoras, biomateriales (scaffolds) y factores de crecimiento [8]. El ciclo de la ingeniería de tejidos empieza a partir de una biopsia de tejido del paciente, seguido de esto las células de interés son aisladas y expandidas mediante técnicas de cultivo celular, después, las células son cultivadas en una matriz extracelular artificial conocida como scaffold y mediante el uso de un bioreactor que proporciona estímulos mecánicos y factores de crecimiento es posible generar un tejido artificial que finalmente será implantado en el paciente (**Fig. 1**) [9]. Sin embargo, existen bastantes complicaciones que impiden el progreso de este campo multidisciplinario. Una de las principales problemáticas en la ingeniería de tejidos es encontrar una fuente celular adecuada, de fácil recolección, alta capacidad proliferativa y que además mantenga una adecuada capacidad de diferenciación [10].

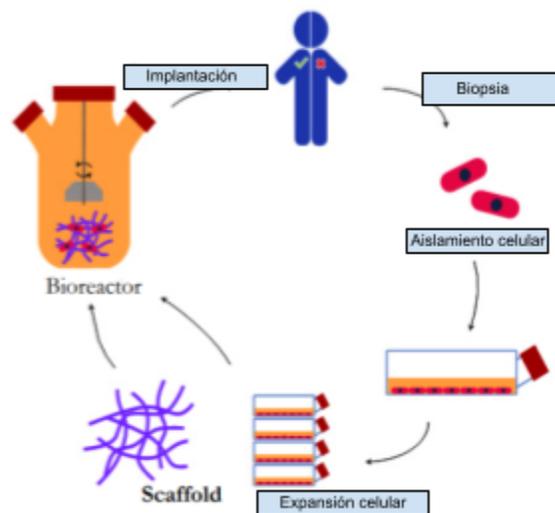


Fig. 1. Ciclo de la ingeniería de tejidos, modificado de [9].

La fuente celular posee una gran influencia en el éxito de los tratamientos aplicados en la ingeniería de tejidos. Las células aplicables a este campo se pueden clasificar en autólogas (células propias del paciente), alogénicas (células humanas de otro paciente) y xenogénicas (células de otra especie) [11].

Tejido gingival

El tejido gingival o encía hace parte de la mucosa encargada de la masticación, cuya distribución rodea la porción cervical de los dientes [12]. Posee propiedades importantes en la función masticatoria como resistir la fricción de los alimentos. Se compone de una capa epitelial y un tejido conjuntivo adyacente denominado lámina propia (**Fig. 2**).

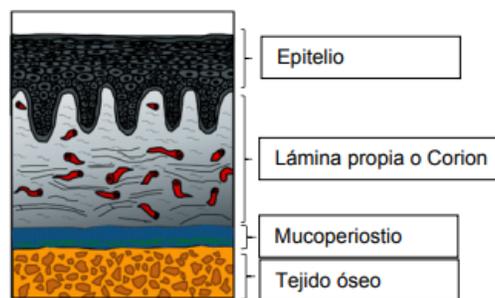


Fig. 2. Esquema de la histología gingival [10].

El tejido conjuntivo o la lámina propia se encarga de soportar el epitelio bucal. Se divide en dos capas: superficial y profunda. El tejido conjuntivo está compuesto por distintos tipos de células como fibroblastos, histiocitos, macrófagos, mastocitos, leucocitos, linfocitos, células de plasma y endoteliales. Las características morfológicas, la función y distribución de las células mencionadas se describen en la **TABLA I** [13].

TABLA I
TIPOS DE CÉLULAS EN LA LÁMINA PROPIA, modificado de [13]

Tipo de Célula	Características Morfológicas	Función	Distribución
Fibroblasto	Estrellado o alargado	Se encarga de la secreción de fibras y sustancia fundamental	Lámina propia
Histiocito	Forma de huso o estrellado	Se encarga de ser precursor del macrófago funcional	Lámina propia
Macrófago	Redondo, posee núcleo basófilo.	Fagocitosis	Áreas de inflamación crónica
Mastocito	Redondo u ovalado, posee gránulos basófilos.	Secreción de mediadores inflamatorios y agentes vasoactivos	Parte subepitelial de la lámina propia
Leucocito	Redondo con núcleo lobulado	Fagocitosis y muerte celular.	Áreas de inflamación aguda dentro de la lámina propia; y epitelio
Linfocito	Redondo con núcleo basófilo y citoplasma escaso	Respuesta inmune humoral	Áreas de inflamación aguda y crónica.
Célula Plasmática	Núcleo redondo y citoplasma intensamente basófilo	Síntesis de inmunoglobulinas	Áreas de inflamación crónica, a menudo perivasculares
Célula Endotelial	Normalmente asociado con una lámina basal	Revestimiento de los canales sanguíneos y linfáticos	Canales vasculares de la lámina propia

Fibroblastos

Los fibroblastos corresponden a la principal y a la más abundante célula del tejido conectivo, posee morfología en forma de huso y juega un papel importante en la fase proliferativa de cicatrización de heridas. Entre sus funciones más importantes se encuentra producir matriz extracelular responsable de mantener la integridad estructural del tejido [14].

Los fibroblastos se encuentran en diferentes sitios anatómicos, todos poseen morfología similar; sin embargo, estudios de micromatrices de ADN han demostrado que los perfiles de expresión génica y algunos fenotipos son dependientes del sitio anatómico; estos sintetizan proteínas de la matriz extracelular de una manera específica [3]. Un ejemplo de ello es la función que cumplen los fibroblastos de la lámina propia de la mucosa bucal, encargados de la elaboración y renovación de la fibra y la sustancia fundamental [13].

Los fibroblastos de origen animal, específicamente los fibroblastos de ratón L929 son ampliamente usados en los ensayos biológicos de biomateriales, principalmente en ensayos de citotoxicidad. Su uso se debe a varios factores: Son fáciles de obtener, están bien caracterizados y permiten una menor desviación estándar en los experimentos [7]. Adicionalmente los fibroblastos L929 están considerados por normas ISO como modelos para probar materiales biomédicos [5]. Sin embargo, la dificultad y el tiempo de espera para conseguir estas células en el laboratorio y la poca relevancia clínica de los datos derivados de estudios *in vitro* con líneas celulares generan complicaciones al momento de realizar pruebas de desempeño biológicas a biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos [6],[7].

Fibroblastos autólogos vs alogénicos

Los fibroblastos autólogos poseen la capacidad de una mejor restauración del tejido, además de una mínima formación de cicatrices en comparación con sustitutos alogénicos. Otra de sus bondades es que no conllevan riesgo de rechazo ni riesgo de infección cruzada. Sin embargo, existe una carencia de células autólogas en cultivo para obtener un número representativo de estas [3].

Los fibroblastos alogénicos, al igual que los fibroblastos autólogos tienen la capacidad de crioconservarse, esto representa una gran ventaja ya que se encuentran disponibles para estudios futuros. Los fibroblastos alogénicos poseen el riesgo de rechazo, sin embargo, estudios a sustitutos vivos, compuestos por fibroblastos alogénicos han demostrado que dichas células son detectables a partir de la sexta semana por lo que se ha sugerido que las células alogénicas finalmente se reemplazan silenciosamente por células huésped. Además, se demostró que las células no tenían componentes antigénicos evitando la inducción de anticuerpos específicos. Una explicación propuesta de lo anterior es que a medida que se cultivan fibroblastos *in vitro*, las células presentadoras de antígeno, como las células de Langerhans, se pierden gradualmente después de los pases en serie y, por lo tanto, ya no están presentes en los sustitutos de piel cultivados; por lo tanto, no estimulan un proceso de rechazo agudo [3].

Cultivo primario

Los fibroblastos pueden ser extraídos de distintos tejidos del cuerpo humano, un ejemplo comercial de ello es Isolagen Therapy™ (Laviv™) , un producto de terapia celular autóloga compuesto por una suspensión de fibroblastos cultivados derivados de la propia piel del paciente [15].

Para lograr el aislamiento celular se pueden emplear dos tipos de técnicas: degradación enzimática y cultivo de explantes. La degradación enzimática, cómo su nombre lo indica, utiliza una enzima cómo la Colagenasa I o la tripsina para lograr la separación de la célula del tejido. En la técnica de cultivo de explantes o explante directo se realiza una degradación mecánica del tejido sin utilizar enzimas. Ambas técnicas tienen cómo objetivo lograr la migración de las células del tejido a la placa de cultivo para su posterior aplicación en terapias celulares o ensayos biológicos [3],[7].

Los cultivos primarios se ven influenciados por varias características externas cómo: la edad del donante, el subtipo de fibroblastos y el sitio anatómico de extracción. Estudios han demostrado que los fibroblastos de piel de donantes de más edad, en comparación con los fibroblastos de piel más jóvenes, tienden a una migración más lenta, poseen un tiempo de vida menor y tienen un tiempo prolongado de duplicación de la población celular. Además responden menos a factores de crecimiento [3].

Comúnmente el aislamiento de fibroblastos se realiza a partir de biopsias de piel en zonas cómo: párpado, parte posterior de la oreja, ingle y cicatriz abdominal. Los fibroblastos aislados de la cicatriz abdominal presentan mayores tasas de proliferación celular y también una mayor viabilidad celular después de ser sometidos a criopreservación. Sin embargo, los métodos de obtención de fibroblastos de piel requieren procedimientos invasivos bajo anestesia local causando incomodidad al paciente durante y después del procedimiento de biopsia. Adicionalmente es vital tener en cuenta la zona de intervención quirúrgica con el fin de no generar un daño estético en el paciente [16].

La piel y la mucosa bucal utilizan mecanismos similares de reparación de tejidos. Sin embargo, la regeneración tisular es superior en la cavidad oral, obteniendo una curación sin cicatrices con una

inflamación reducida, una reepitelización más rápida y una curación acelerada. Esto se debe a la diferencia de fenotipo entre fibroblastos dérmicos y fibroblastos provenientes de tejido gingival. Los hGF son capaces de diferenciarse en múltiples linajes como: osteoblastos, adipocitos y condrocitos; también expresan marcadores asociados a células madre mesenquimales y poseen propiedades asociadas a la secreción de citocinas antiinflamatorias. Adicionalmente estudios han demostrado que los hGF presentan funciones angiogénicas y una mayor deposición de colágeno tipo I para el tratamiento de heridas dérmicas [17].

Otra de las ventajas de los hGF es su fácil obtención a partir de biopsias de tejido gingival. Existe una gama amplia de procedimientos quirúrgicos empleados en consultorios odontológicos en los cuales se realiza una recesión de tejido gingival, algunos de los más comunes son: injertos gingivales [18], hiperplasia gingival asociada a medicamentos [19], alargamiento coronal dental [20], extracciones de terceros molares y cirugía plástica Peri-Implantar [21]. Generalmente en estos procedimientos los tejidos son desechados a pesar de su potencial en el campo de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

Problemas asociados a la extracción de tejidos primario

Las células primarias aisladas de los tejidos como la pulpa dental o la encía poseen una vida útil finita, pero son preferibles para estudiar el proceso del ciclo celular, la apoptosis y la reparación celular en condiciones controladas. Además, las células primarias son deseables en pruebas de citotoxicidad para tener una mayor aproximación a lo que sería una situación *in vivo* [22].

A pesar de las bondades investigativas de los cultivos primarios el aislamiento de células primarias de los tejidos requiere mucho tiempo y trabajo, el número de células suele ser muy bajo en comparación con el número casi ilimitado de células en líneas celulares continuas [23]. La contaminación microbiana representa uno de los problemas más comunes que pueden ocurrir tanto en células provenientes de cultivos primarios como en líneas celulares establecidas. Esta puede provenir de distintas fuentes, entre las cuales se encuentran: manipulación del operador, entorno del laboratorio, reactivos contaminados, esterilización incorrecta en materiales de laboratorio y mala limpieza. Sin embargo, las biopsias provenientes de mucosa oral son más propensas a la contaminación al estar inmersas en un entorno bacteriano [24].

Biomateriales

Un scaffold o andamio debe tener como objetivo principal simular la matriz extracelular, con el fin de cumplir: proliferación, diferenciación y síntesis celular. Este andamio 3D sirve como plantilla del tejido para que las células puedan colonizar el material y de esta manera producir matriz extracelular. Adicionalmente un scaffold debe facilitar la migración celular, el flujo de nutrientes y la salida de desechos. Por otro lado debe tener propiedades mecánicas acordes al tejido que se pretende regenerar y debe poseer una biodegradabilidad controlable. Existen diversos métodos para el diseño de scaffolds; mediante métodos no convencionales se puede controlar la forma del scaffold, el porcentaje de porosidad y el tamaño de los poros. Algunos de ellos son: láser, boquilla e impresión 3D. Por el contrario mediante métodos convencionales resulta difícil obtener características específicas en el andamio, sin embargo, cada método genera un scaffold con una morfología de los poros propia para la aplicación requerida. Algunos de los métodos convencionales son: gel casting, sol-gel, emulsificación y liofilización, y separación de fases [25].

La biocompatibilidad y la bioactividad son dos de las características más importantes que debe tener el scaffold. La bioactividad determina el grado de interacción y reconocimiento que tendrán las células con la matriz extracelular con el fin de proliferar el material. Existen biomateriales con un alto grado de biocompatibilidad pero con una baja bioactividad lo cual los convierte en materiales no ideales para la ingeniería de tejidos. Sin embargo, para solucionar este problema los materiales pueden ser combinados con otros materiales bioactivos. Un ejemplo de ello son los scaffolds de quitosano con adición de hidroxapatita (HA); la adición de este material bioactivo produce osteoconductividad en los andamios y mejora la capacidad de adsorción de proteínas. Otro ejemplo de scaffolds utilizados para la regeneración de tejido óseo son los sustitutos óseos inyectables a base de carragenina [26]. El PVA por su parte también es un material biocompatible pero de baja bioactividad, por ello se mezcla con moléculas bioactivas como la gelatina, el quitosano o el almidón entre otros, para mejorar su interacción biológica [46]

La biocompatibilidad determina si un material es tóxico o dañino para el cuerpo a partir de la evaluación de productos que entran en contacto con el paciente directa o indirectamente. Para ello

se emplea la prueba de citotoxicidad, la cual puede realizarse de modo indirecto poniendo en contacto el extracto del biomaterial a evaluar con las células. Las células establecidas por la norma ISO 10993 para realizar el ensayo de citotoxicidad son fibroblastos de ratón de la línea celular L929 [5]. Sin embargo el uso de células de origen humano permite una aproximación más cercana a lo que sería el comportamiento del organismo *in vivo*, frente al material [3].

V. METODOLOGÍA

1. Protocolo de descontaminación

Con el fin de evitar problemas asociados a la contaminación de cultivos primarios se desarrolló un protocolo de descontaminación en el laboratorio de ensayos biológicos del programa de Bioingeniería de la Universidad de Antioquia previo a la realización del cultivo celular. Las etapas del protocolo se describen en la **TABLA II** [27].

TABLA II
PROTOCOLO DE DESCONTAMINACIÓN modificado de [27].

Nombre de la actividad	Descripción	Recomendaciones
Descontaminación general del laboratorio con formaldehído	Se prepararon 3 tubos que contenían 1 ml de formaldehído cada uno. Cada tubo se destapó y se dejó en la superficie de los equipos de laboratorio donde generalmente puede existir el riesgo de contaminación (Cabina de flujo laminar, incubadora, mesones). El laboratorio debe permanecer cerrado por aproximadamente 3 días hasta que la solución de formaldehído se evapore completamente	Es indispensable el uso de guantes quirúrgicos. Una vez se abran los tubos se recomienda salir rápidamente del laboratorio debido a su alto contenido tóxico.
Asepsia del personal de laboratorio	Se tuvieron en cuenta varios aspectos relacionados a técnicas de asepsia para la entrada al laboratorio de ensayos biológicos. El laboratorio está dividido en 3 cuartos y en cada uno de ellos se deben tener en cuenta las siguientes características: <ol style="list-style-type: none">1. Cuarto externo: En el cuarto externo cada miembro del equipo de investigación hizo el respectivo cambio de prendas (bata, gorro, zapatos o uso de polainas y tapabocas).2. Cuarto intermedio: Cada persona inicialmente hizo el lavado de manos	

con jabón quirúrgico con clorhexidina. Después mediante el uso de toallas quirúrgicas se limpiaron con alcohol al 70% todos los implementos externos que serían ingresados a cuarto interno cómo: celular, lápices, cuadernos, etc. Finalmente se empleó el uso de guantes quirúrgicos.

3. Cuarto interno: Para la manipulación de equipos y reactivos es importante desinfectar constantemente las manos con alcohol al 70%. También es recomendable evitar hablar mientras se hacen actividades en la campana de flujo laminar. De igual manera, evitar tocar el rostro o zonas del cuerpo que no hayan sido desinfectadas.

Limpeza del laboratorio

Se limpiaron con desinfectante las paredes y pisos del laboratorio. Para la desinfección de los equipos (campana de flujo e incubadora) se realizaron 3 etapas de limpieza: Primero se se limpió adecuadamente las superficies de los equipos con detergente, después se removió el detergente aplicado con agua estéril y finalmente se limpia nuevamente las superficies de los equipos con alcohol al 70%

Se debe realizar la limpieza de pisos y paredes una vez al mes. La limpieza de los equipos se debe hacer cada 15 días.

Esterilización de campana de flujo laminar y limpieza de material

Antes de realizar actividades en la campana de flujo laminar se limpió la superficie de esta con alcohol al 70%, después todos los implementos que iban a ser manipulados se desinfectaron con alcohol al 70% y se ingresaron a la cabina (Pipetas, Cajas de puntas, Beakers, gradilla y marcador.) Seguido de esto, se encendió la luz ultravioleta por 15 min. Después se encendió la campana por 3 min para estabilizar el flujo de aire. Luego, todos los reactivos que iban a ser utilizados se desinfectaron con alcohol al 70% y se ingresaron a la campana de flujo laminar. Finalizado el trabajo en la campana, se desinfectaron y se guardaron todos los implementos en su respectivo lugar. Se limpió nuevamente la superficie de la cabina con alcohol al 70% y se apagó el equipo.

Evitar estar en el cuarto interno mientras la luz ultravioleta está encendida, esto con el fin de evitar la exposición a la radiación.

Esterilización de incubadora y limpieza de material	El agua destilada de la incubadora se reemplazó cada 15 días. Adicionalmente todos los frascos y placas de cultivo se limpiaron con alcohol al 70% antes de colocarlos en la incubadora.	
Esterilización de instrumentos	Todos los instrumentos necesarios para realizar el protocolo de cultivo como: portacuchillas, pinzas, placas petri, pipetas, tubos eppendorf, tubos falcon, etc, se esterilizaron en autoclave antes del procesamiento del tejido.	Es muy importante tener en cuenta la fecha de vencimiento de la esterilización de los instrumentos. De igual manera la fecha de vencimiento de instrumentos sellados como cuchillas, jeringas, etc.
Test de esterilización	Con el fin de comprobar que todos los instrumentos y reactivos que se utilizarían estaban libres de contaminación se realizó una prueba de esterilidad a cada uno de ellos. Para la prueba de esterilidad se utilizaron las cantidades de reactivos mencionadas en la TABLA III . Cada prueba se hizo en un tubo falcon, el cual se marcó con el nombre del reactivo o instrumento. Cada tubo se limpió con alcohol al 70% y se incubó por 24 horas.	Los tubos eppendorf son los principales instrumentos que deben estar libres de contaminación, ya que estos son los que tendrán el primer contacto con el tejido

TABLA III
Test de esterilización

Nombre de reactivo o instrumento sometido a revisión	Cantidad de reactivo o medio de cultivo (ul)	Cantidad SFB (ul)
PBS	500	500
Colagenasa I	500	500
L-glutamina	500	500
Anfotericina B	500	500
Tubos falcon	500	25
Tubos Eppendorf	500	25
Caja petri	2000	100
Punta amarilla (200 ul)	500	25
Punta azul (1000 ul)	500	25

2. Biopsia gingival

La recolección de muestras fue aprobada por el Comité de Bioética en Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria (CBE-SIU) (Anexo I). Las muestras

de tejido gingival fueron donadas por pacientes de la Dr Laura Osorio Velez. Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de exclusión para la donación del tejido:

- Pacientes con diversas afecciones gingivales como, por ejemplo, la hiperplasia.
- Pacientes cuyo acceso a lesiones en la estructura dental como caries extensas es complicado
- Pacientes con problemas estomacales o renales
- Pacientes con problemas asociados a coagulopatías

Los tejidos donados se obtuvieron a partir de intervenciones quirúrgicas en donde generalmente el tejido gingival no cumple ninguna función y es desechado. En la **TABLA IV** se mencionan los procedimientos quirúrgicos que fueron aptos para la donación de tejido gingival [18],[21].

TABLA IV
Procedimientos aptos para recibir donaciones de tejido gingival [18],[21]

Origen: Procedimientos quirúrgicos periodontales	Origen: Procedimientos de cirugía oral menor
Injerto gingival libre para recubrimiento radicular	Regularización de rebordes post-extracción dentaria múltiple
Injerto gingival desepitelizado para mejorar biotipo y condiciones peri-implantares	Nivelación ósea en edentulismo tipo IV para colocación de implantes de oseointegración.
Alargamiento coronal en erupción pasiva alterada	Destape de implantes tipo PUNCH
Alargamiento coronal preprotésico	Resección de torus prominente
Pseudobolsa en tuberosidades	Gingivectomía de tejido bamboleante previo a prótesis total en reabsorción parcial de reborde
Gingivectomía en hiperplasia gingival asociada a medicamentos de uso crónico	Exodoncias de terceros molares con exceso de tuberosidad o tejido retromolar

Después de la lectura y aceptación del consentimiento informado (Anexo II) por parte de los pacientes se procedió a la intervención quirúrgica para la obtención de la muestra de tejido gingival.

Para reducir los riesgos de infecciones en el cultivo primario se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones pre quirúrgicas por parte de los donantes:

-
- Los donantes se enjuagaron la boca con gluconato de clorhexidina después de cada comida durante los 2 ó 3 días anteriores a la cirugía: Estos enjuagues son fundamentales para que la boca del paciente llegue lo más limpia posible a la intervención. Sin embargo, el uso de clorhexidina puede producir una leve tinción marrón de los dientes si se utiliza por tiempo prolongado, por lo cual es indispensable que el paciente únicamente se enjuague la boca durante dos o tres días. Adicionalmente es aconsejable suspender el consumo de bebidas oscuras como vino tinto o café ya que estos pueden potenciar el proceso de tinción [28].
 - Los donantes se cepillaron bien la boca y usaron seda dental antes de acudir a la cita para operarse.

Con el mismo objetivo de mitigar riesgos de contaminación, el personal encargado de realizar la intervención quirúrgica siguió las siguientes recomendaciones.

- Mantener excelentes condiciones de asepsia en el consultorio donde se realizará la cirugía
- Todo el equipo a utilizar en la intervención debe estar estéril
- Minimizar el tiempo de traslado del tejido desde la zona de intervención hasta el tubo eppendorf
- Antes de manipular los tubos eppendorf, limpiarlos con alcohol a 70%

Ya en el consultorio odontológico, previo al procedimiento de extracción se llevó a cabo la antisepsia intraoral a través de cepillado dental y el uso de un enjuague con clorhexidina al 0,12 %. Se utilizaron también, barreras de protección extraorales cubriendo el perímetro alrededor de los labios de los pacientes con povidona yodada al 10 %. Seguido de esto se realizó la operación quirúrgica que cada paciente requería. Después, el tejido gingival sobrante se lavó con solución fisiológica estéril para eliminar restos de sangre. Cada muestra tuvo un tamaño aproximado de 3 mm^2 . Finalmente mediante el uso de pinzas estériles los tejidos se depositaron en 2 tubos eppendorf, (**Fig. 3**) que contenían 500 ul de DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco [pH 7,2]), suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibióticos (penicilina, estreptomycin) al 5%

[7]. Los tejidos se llevaron inmediatamente desde la clínica odontológica hasta el laboratorio de ensayos biológicos de la universidad de Antioquia ubicado en la sede oriente para su posterior procesamiento.

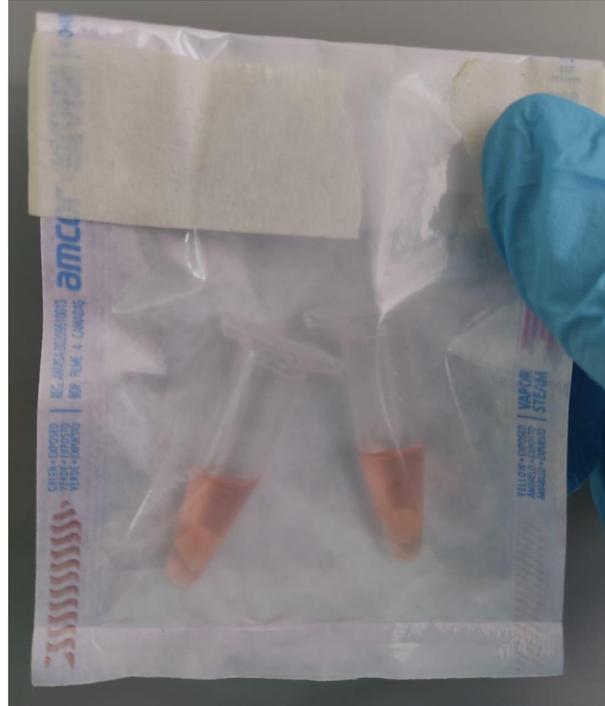


Fig. 3. Muestras de tejido depositadas en tubos eppendorf. Autoría propia.

3. Cultivo celular

El procesamiento del tejido se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad en el laboratorio de ensayos biológicos, (**Fig 4.**) y se mantuvieron todos los protocolos de esterilización antes de los experimentos como se mencionó en la **TABLA II**. Las muestras de tejido obtenidas se lavaron y se desinfectaron primero en PBS (pH 7,4-+/-0,1) durante 2-3 minutos. Para ello se utilizó una caja petri plástica previamente esterilizada. Después, en la misma caja petri se depositó 1 ml de medio con el fin de que el tejido quede sumergido mientras se realizaba el corte. El tejido se cortó en trozos de 1 mm × 1 mm con la ayuda de una cuchilla BP estéril No. 22, (**Fig. 5**) [7].

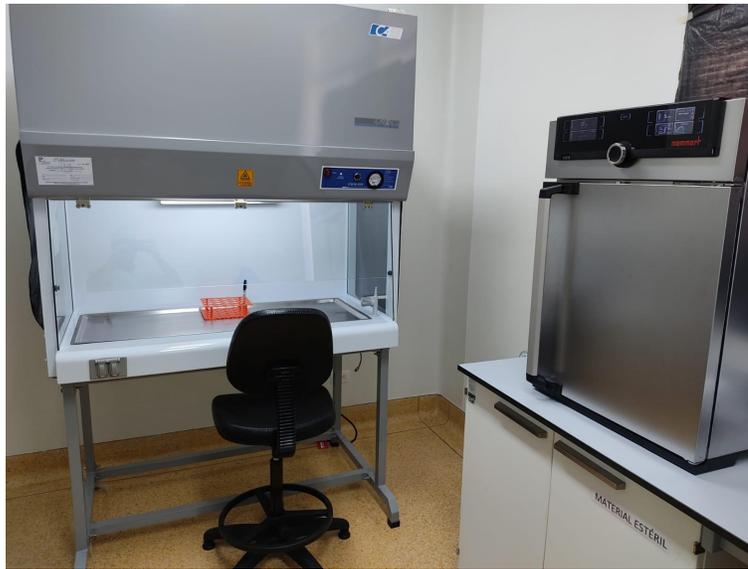


Fig. 4. Cabina de bioseguridad. Autoría propia.



Fig. 5. Trozos de tejido gingival. Autoría propia.

Con ayuda de la punta de una jeringa estéril los trozos de tejido se depositaron en un tubo falcon previamente esterilizado. Después se adicionó una cantidad suficiente de colagenasa I con el fin de que los tejidos queden sumergidos en la solución. El tubo falcon se incubó a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 por una hora. Finalizada la hora se inactivó la colagenasa I añadiendo un volumen igual o mayor

de DMEM muy frío en el tubo. Después la solución se centrifugó a 1100 rpm durante 10 minutos [29]. Pasado el tiempo de centrifugación se observó la formación de un sedimento en el fondo del tubo. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de DMEM con el cual se resuspendió varias veces el fondo del tubo mediante el uso de una pipeta. Se comprobó que el sedimento se había despegado del fondo del tubo y se depositó el medio con el sedimento (pequeños trozos de tejido) en un frasco T-25. Adicionalmente se depositaron en el frasco 3 ml de DMEM, SFB 10 % , PS 1%, L-Glutamina 1%. Se aseguró de no exceder la cantidad de medio depositado en el frasco, esto con el fin de que los trozos pequeños de tejido se adhirieran fácilmente a la superficie del matraz [7],[29]. El frasco se incubó a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 .

4. Subcultivo celular

Cada dos días se realizó el mantenimiento del cultivo celular, el cual consistió en cambiar el medio de cultivo y revisar la confluencia de las células. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70-80 % alrededor del tejido se realizó el subcultivo celular [7],[30]. Inicialmente se revisó y se retiró el medio del frasco de cultivo. El medio se transfirió a un tubo falcon y se marcó como “Medio de inactivación”. Después la superficie del frasco donde se encontraban las células se lavó suavemente tres veces con PBS. Se retiró el PBS y se añadió 2 ml de tripsina EDTA al 0,05% previamente calentada en incubadora por 10 minutos. Se ingresó el frasco a la incubadora por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se observó en el microscopio óptico la morfología de las células y si estas estaban completamente desprendidas de la superficie plástica del matraz de cultivo. Se dieron suaves golpes con la palma de la mano en uno de los lados del matraz de cultivo con el fin de acelerar y aumentar el desprendimiento celular. Finalmente cuando la mayoría de las células estaban desprendidas se añadió el “Medio de inactivación” con el fin de inactivar la tripsina y evitar la muerte de las células. Seguido de esto la suspensión celular junto con el medio fueron transferidos a un tubo falcon y se sometió a centrifugación a 1365 rpm por 5 minutos [29]. Finalizado el tiempo de centrifugación se observó la formación de un sedimento en el fondo del tubo, (**Fig. 6**). Se retiró el sobrenadante y se agregó 900 μ l de DMEM con el cual se resuspendió varias veces el fondo del tubo mediante el uso de

una pipeta. Se comprobó que el sedimento se había despegado del fondo del tubo y se depositó el medio con el sedimento en un frasco T-75. Finalmente se adicionaron en el frasco, 9 ml de DMEM, SFB 10 %, PS 1%, L-Glutamina 1%. El frasco se incubó a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 . El medio se cambió cada 24 horas hasta alcanzar una confluencia del 70-80 % en todo el matraz de cultivo.

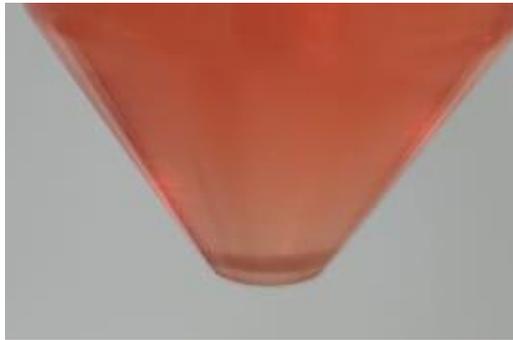


Fig. 6. Sedimento en el fondo de tubo falcon. Autoría propia.

5. Conteo celular con Camara de Neubauer

Una vez alcanzada una confluencia celular del 80% o mayor en el frasco T-75, se procedió a realizar el conteo celular. Para ello se siguió el procedimiento descrito en subcultivo celular hasta la obtención del sedimento inmerso en 900 μ l de medio el cual se denominó “células en suspensión”. Se depositó en un recipiente estéril 20 μ l de azul de tripano y 20 μ l de células en suspensión y se homogeneizaron mediante pipeteo constante. Finalmente se tomaron 10 μ l de la mezcla homogeneizada y se depositaron cuidadosamente en la cámara de Neubauer, (**Fig. 7**). Se trasladó la cámara al microscopio óptico invertido y se realizó el conteo en cada uno de los cuadrantes. Los datos fueron promediados y multiplicados por un factor de 20,000.



Fig. 7. Cámara de Neubauer, modificado de [29]

El conteo se realizó en cada cuadrante de la cámara de Neubauer (**Fig. 8**). Las células se clasificaron en luminosas (vivas) y opacas (muertas).

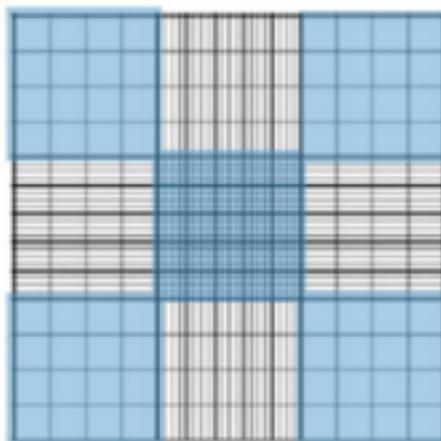


Fig. 8 Distribución de cuadrantes en cámara de Neubauer modificado de [29]

Se debe tener en cuenta que la mezcla depositada en la cámara de Neubauer posee una relación 1:1. Cada cuadrante posee un volumen de 0.1 mm^3 correspondiente a $0.1 \mu\text{L}$. Sin embargo, una media parte de la solución en la cámara corresponde a azul de tripano, por lo tanto únicamente la mitad del volumen total del cuadrante son células, esto es $0,05 \mu\text{L}$. Teniendo en cuenta que la cantidad total de células suspendidas es de $1000 \mu\text{L}$ se utilizaron las siguientes ecuaciones para determinar la totalidad de células vivas y el porcentaje de viabilidad celular.

$$\# \text{ Células vivas totales} = \frac{\text{Prom Cv} * \text{Vc}}{\text{Vt}} \quad (1)$$

Donde:

Prom Cv: Promedio de células vivas por cuadrante

Vt: Volumen total de células en un cuadrante (0,05 μL)

Vc: Volumen total de células suspendidas (1000 μL)

Simplificando la ecuación 1 se obtiene:

$$\# \text{ Células vivas totales} = \text{Prom Cv} * 20000 \quad (2)$$

Para determinar la viabilidad celular se emplea la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Prom Células Vivas}}{\text{Células totales}} * 100 \quad (3)$$

6. Criopreservación de fibroblastos gingivales

Se realizó el procedimiento de crioconservación para los hGF obtenidos en el 3 pasaje. Para ello se realizaron los procedimientos de subcultivo celular y conteo celular. Una vez se obtuvo el número total de hGF en el frasco, se determinó el volumen correspondiente a 1 millón de células. Este volumen corresponde al 60% del volumen de la solución de congelación. A partir de este volumen se calculó el 30% de SFB y el 10% dimetilsulfóxido (DMSO). La solución de congelación se depositó en un vial de almacenamiento criogénico denotado con la fecha, la cantidad de células, la viabilidad celular y el número de pasaje de las células. Posteriormente los viales se congelaron a -4°C por una hora y después se introdujeron en el ultracongelador a -80°C [7]. Se congelaron 4 crioviales con 1 millón de células c/u.

7. Sustitutos de tejido vascular

Se preparó una solución 9 % de alcohol polivinilo (PVA) w/v respecto al solvente en un baño termorregulado a $86^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 15 min con agitación constante de 600 rpm, (**Fig. 9**). Seguido de esto la solución se dejó enfriar hasta alcanzar los 60°C , después se agregó 1% de gelatina w/v respecto al solvente y se agitó por una hora. Finalmente la solución se vertió en un molde y se congeló a -20°C 7 veces. Las muestras

se esterilizaron con etanol y se depositaron en frascos estériles para su posterior uso en el ensayo de citotoxicidad, (**Fig. 10**).

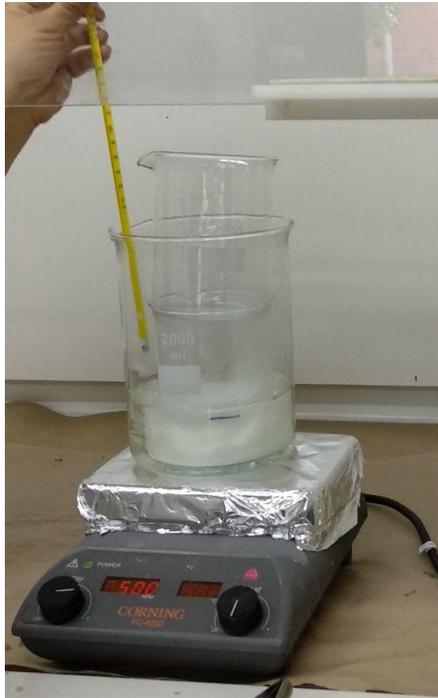


Fig. 9. Montaje para la realización de sustitutos de tejido vascular. Cortesía: L, Arroyave



Fig. 10 Sustitutos de tejido vascular. Autoría propia.

8. Ensayos experimentales

a. Caracterización celular

La caracterización celular se realizó a partir de muestras de hGF cultivados en placas de cubreobjetos. Para ello se utilizó una placa de 6 pocillos, seguido de esto se ubicaron 3 cubreobjetos en 3 pocillos de la placa. Se tomó un frasco T-75 previamente cultivado y se realizaron los procedimientos correspondientes a subcultivo y conteo celular. Finalmente se sembraron 100,000 células en la superficie de cada cubreobjeto y se agregó 1 ml de DMEM, SFB 10 %, PS 1%, L-Glutamina 1%, (**Fig. 11**) La placa se incubó a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 por 24 h.

Transcurrido el tiempo se retiró cuidadosamente el medio de cada pocillo y se agregó a cada pocillo 5 ml de formol al 10 % como fijador para la conservación de las células adheridas. Se esperó un periodo de 24 horas y se retiró el formol de cada pocillo. La placa se trasladó al grupo de estudio Patobiología Quien que se encargó de realizar la caracterización de los hGF cultivados en los 3 cubreobjetos, mediante el método de tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

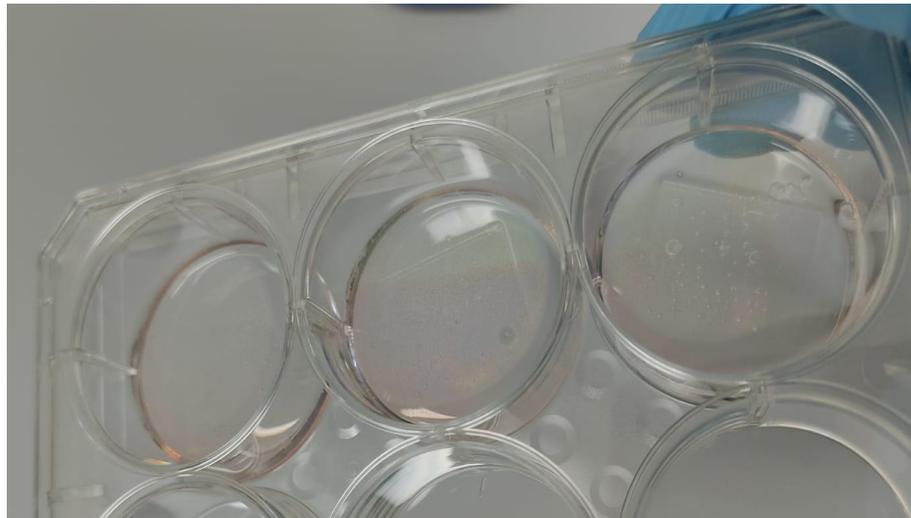


Fig. 11. Células cultivadas en cubreobjetos. Autoría propia.

b. Ensayo de citotoxicidad fibroblastos gingivales y L929

El ensayo de citotoxicidad se realizó en un periodo de 3 días. El procedimiento se ejecutó para dos tipos de células: hGF y la línea celular de fibroblastos de ratón

L929. El ensayo se llevó a cabo en una placa de cultivo de 96 pocillos (**Fig. 12**). La **fig. 13** representa la distribución desde la columna 2 hasta la columna 8 de la placa de cultivo. Las filas A, B, C, E, F Y G de la placa contuvieron las mismas cantidades y soluciones determinadas específicamente para cada columna.

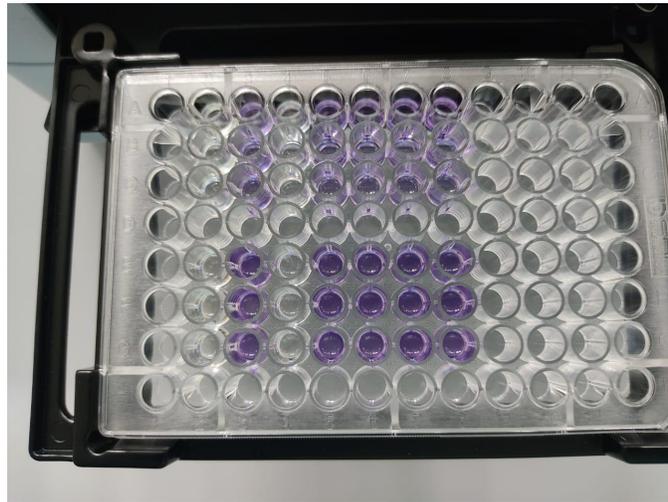


Fig. 12. Placa de cultivo de 96 pocillos . Autoría propia

		Ensayo de citotoxicidad						
	Fila	BLANCO	Celulas (-) sin tratamiento	Celulas (+) muertas	S. Vascular 100%	S. Vascular 75%	S. Vascular 50%	S. Vascular 25%
Fibroblastos gingivales	A							
	B							
	C							
I929	E							
	F							
	G							

Fig. 13. Distribución placa de cultivo hGF y L929. Autoría propia.

A continuación se describe el procedimiento realizado cada día.

Día 1

El primer día se realizó el cálculo de las células necesarias para realizar el ensayo de citotoxicidad. Para ello se tomó un frasco T-75 previamente cultivado y se siguió el protocolo de subcultivo celular y conteo celular [7]. En cada pocillo se depositaron 10,000 células hGF o L929 dependiendo de la placa de cultivo (exceptuando la columna denominada “Blanco”). Suspendidas en 100 ul de

DMEM, SFB 10 % , PS 1%, L-Glutamina 1%. En total se sembraron 18 pocillos para cada placa de cultivo. Cada placa de cultivo se incubó a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 .

Adicionalmente el primer día se prepararon los extractos con los biomateriales realizados en una etapa anterior. Para ello se depositaron los extractos previamente esterilizados en frascos estériles y se adicionó medio de cultivo siguiendo la norma ISO 10993 así [5]: por cada 0,1 g de extracto del sustituto óseo y por cada 0,2 g del sustituto de tejido vascular se debe depositar 1 ml de DMEM, SFB 10 % , PS 1%, L-Glutamina 1%. Finalmente las placas de cultivo se incubaron a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 por 24 h.

Día 2

Transcurridas 24 h se llevaron las placas de cultivo al microscopio óptico y se observó si las células sembradas se encontraban adheridas. Se retiró el medio de todos los pozos cuidadosamente y seguido de esto, los pozos de cada placa de cultivo tuvieron la distribución de contenido detallada en la **TABLA V** [5], donde M1 representa el extracto obtenido de la muestra a evaluar.

TABLA V
Distribución de cantidades - Día 2 ensayo de citotoxicidad [5].

Nombre de la columna	DMEM (10% SFB, 1%PS, 1% L-GLUTAMINA) (μ L)	SOLUCIÓN M1 (μ L)	DMSO (μ L)
Blanco	100	-	-
Células (-) sin tratamiento	100	-	-
Células (+) muertas	90	-	10
S. Vasculares 100%	-	100	-
S. Vasculares 75%	25	75	-
S. Vasculares 50%	50	50	-
S. Vasculares 25%	25	75	-

La distribución de contenido se realizó cuidadosamente con el fin de evitar la muerte de las células sembradas. Finalmente las placas de cultivo se incubaron a 37 °C en una cámara humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 por 24 h.

Día 3

En el tercer día se retiró cuidadosamente el medio de cada uno de los pozos de las placas de cultivo. Enseguida se agregó rápidamente 50 μl de reactivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en todos los pozos de cada placa de cultivo. Finalizado esto se cubrió ambas placas con papel aluminio y se incubó por un periodo de 2 horas. Transcurrido el tiempo se retiró el reactivo MTT de todos los pozos de las placas y se agregó en todos los pozos de las placas 100 μl de isopropanol. Finalmente se introdujo cada placa en el lector de microplacas ELISA y se mantuvo en agitación durante 15 minutos [5]. Se realizaron dos lecturas de absorbancia a 570 nm. Los datos fueron guardados para un posterior análisis estadístico.

VI. RESULTADOS

1. Test de esterilización

El test de esterilización presentó como control negativo la caja petri. La contaminación se detectó mediante la visualización del medio turbio con un aspecto lechoso, (**Fig. 14**).

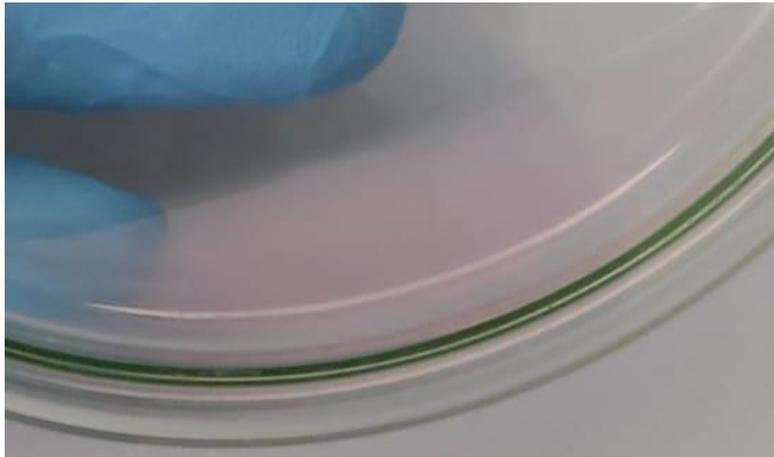


Fig. 14. Contaminación en caja petri. Autoría propia.

La caja petri se trasladó al microscopio invertido y se visualizó la fuente de contaminación, (**Fig 15**). La caja petri fue descontaminada, desechada y reemplazada por una caja petri plástica previamente esterilizada antes de realizar el procedimiento de cultivo celular.

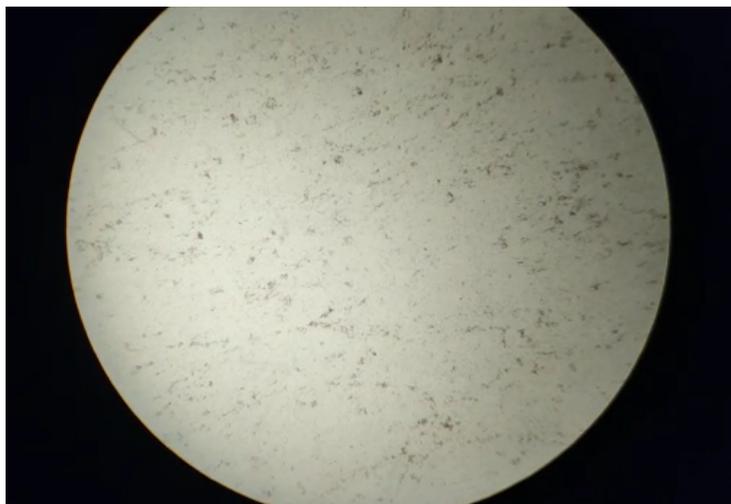


Fig. 15. Detección de contaminación en caja petri, 50 x. Autoría propia.

2. Biopsia

Se obtuvieron 4 donaciones de tejido gingival, extraídas en el consultorio privado de la doctora Laura Sofía Osorio Vélez, cumpliendo con todos los estándares mencionados en la metodología.

3. Cultivo celular

De las donaciones de tejido gingival, dos tuvieron un exitoso cultivo primario a partir de la combinación de las técnicas enzimática y explante. Las muestras restantes se descartaron por contaminación. A continuación se describen las etapas del cultivo primario.

A. Sexto día

Transcurridos seis días después de haber realizado el cultivo primario de tejido gingival, se observó la migración de células con forma de huso en los extremos de dos tejidos ubicados en el frasco T-25, (**Fig. 16**).

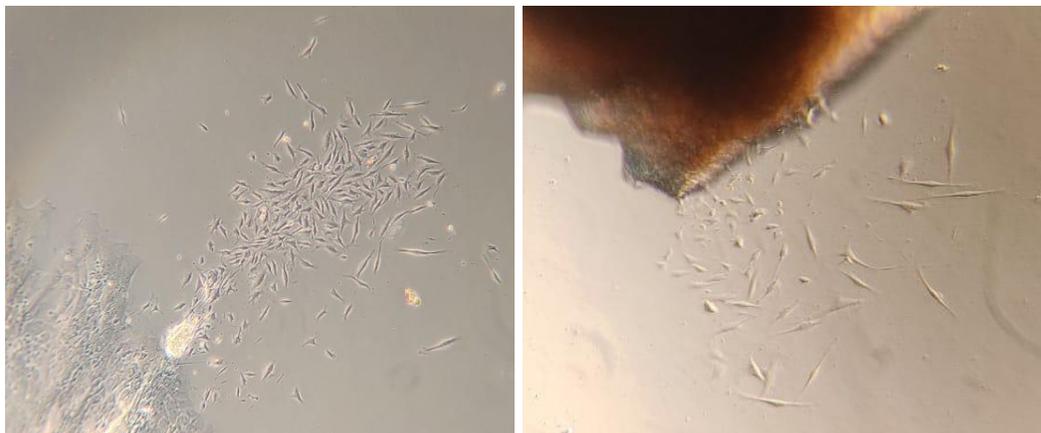


Fig. 16. Migración de fibroblastos de tejido gingival, izquierda 50 x, derecha 200 x. Autoría propia.

B. Octavo día

Se observó un aumento considerable en la confluencia de los fibroblastos gingivales. La morfología celular no tuvo un cambio significativo, sin embargo, se observa un claro alargamiento de los fibroblastos denotando una mayor adherencia

al frasco de cultivo, (**Fig. 17**). Adicionalmente, se observaron pequeñas células con forma esférica



Fig. 17. Aumento en la confluencia de fibroblastos gingivales. Ambas 200 x. Autoría Propia.

C. Onceavo día

En el día 11 las células alcanzaron una confluencia del 80 % alrededor de los tejidos. La morfología tuvo un cambio significativo demostrado en el alargamiento de las células, (**Fig. 18**). El número de células esféricas disminuyó y hubo una predominancia de células fusiformes largas. Debido a que el crecimiento solo se produjo alrededor del explante y no de manera uniforme en todo el frasco, se procedió a realizar la etapa de subcultivo celular.

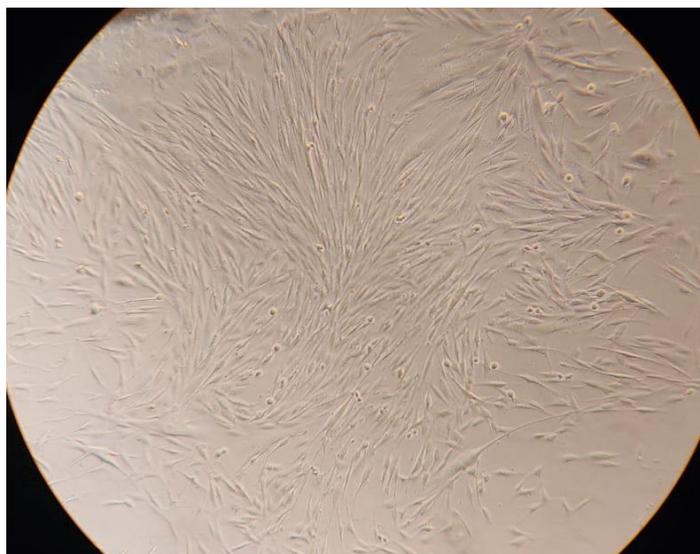


Fig. 18 Confluencia del 80 % de fibroblastos gingivales. 200 x. Autoría propia.

4. Subcultivo celular

El subcultivo de los hGF se realizó en un frasco T-75. Las células alcanzaron una confluencia uniforme del 90 %; generando una monocapa de células fusiformes largas en todo el frasco de cultivo transcurridos 9 días de haber realizado el subcultivo, (**Fig 19**). Durante este periodo de tiempo las células se mantuvieron e incubaron con un control constante de cualquier contaminación. Después las células se contaron y se sub-cultivaron en dos frascos T-75 correspondientes al pasaje 3. A partir de aquí las células tuvieron un crecimiento acelerado alcanzando una confluencia en un rango aproximado de 90 % a 100 % en 3 días. Nuevamente se realizó el conteo celular, se calculó la viabilidad celular y se determinó la cantidad de células necesarias para el ensayo de citotoxicidad y para la caracterización con H&E. Las células restantes se congelaron mediante el procedimiento de criopreservación de fibroblastos gingivales.

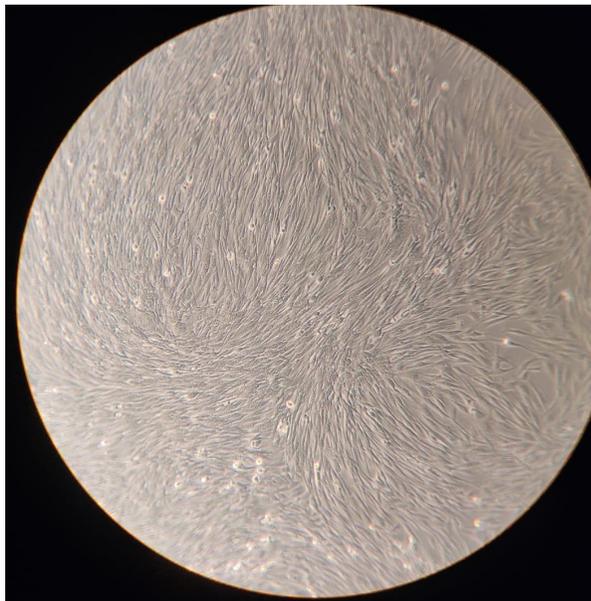


Fig. 19 Confluencia uniforme de fibroblastos gingivales cultivados en frasco T-75, 50 x. Autoría propia.

5. Conteo celular

Se realizó el conteo de las células correspondientes al pasaje 3. Mediante la visualización en el microscopio invertido, se determinó la cantidad de células vivas y células muertas con el fin de calcular la viabilidad celular. El cálculo obtenido es un aproximado teniendo

en cuenta la cantidad masiva de células obtenidas en 10 μ l de solución, (**Fig 20**). La **TABLA VI** indica el recuento celular en cada cuadrante.

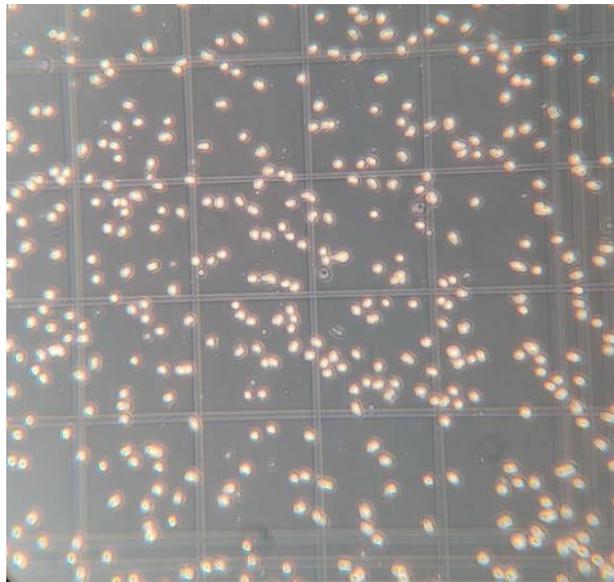


Fig. 20 Conteo de células en cuadrante I, 200 x. Autoría propia.

TABLA VI
Conteo celular

Cuadrante	N° de células vivas	N° de células muertas
I	252	16
II	264	6
III	294	8
VI	289	10
Promedio	274.75	10

Se obtuvo un total aproximado de células vivas totales de 5,495,000. La viabilidad celular fue del 96,6 %

6. Caracterización celular

Después de dos días se observaron fibroblastos gingivales adheridos en los 3 cubreobjetos, (**Fig. 21**). El uso del formol permitió la inmovilización de las células para su posterior uso en el ensayo.

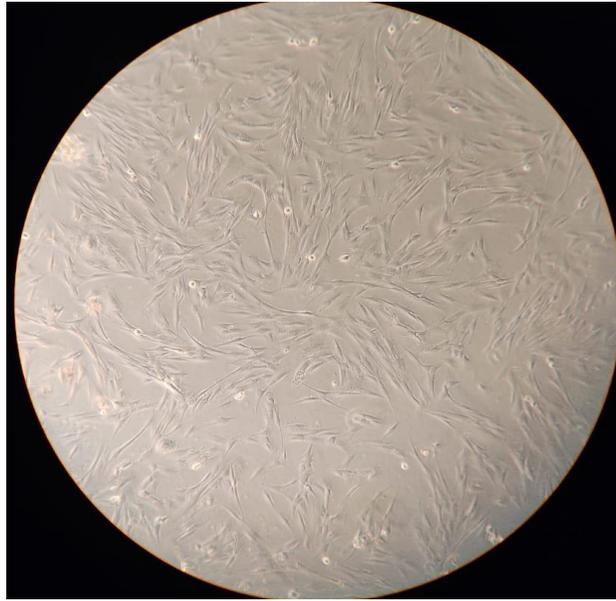


Fig. 21 Fibroblastos sembrados en cubreobjetos, 50 x. Autoría propia.

El método de tinción H&E permitió observar la estructura celular de los hGF [31]. Se observó el núcleo de las células teñidas con un color violeta azulado y el citoplasma con una coloración púrpura tenue, (**Fig. 22**).

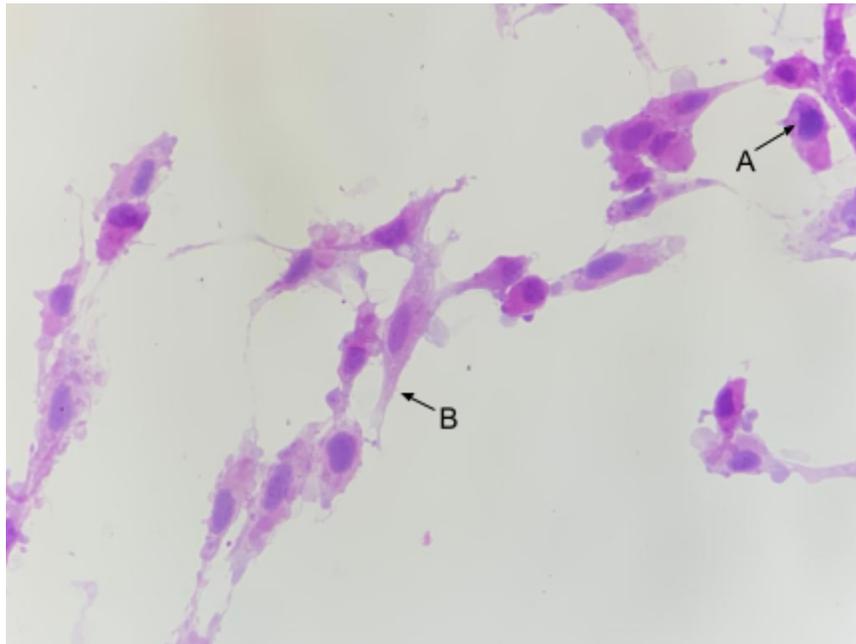


Fig. 22 Tinción de hGF por método H&E. A) Núcleo de las células, B) Citoplasma de las células. 1000 x.

Cortesía: L. Muñoz, J. Muñoz

7. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad dio cómo resultado los porcentajes de viabilidad celular de los hGF y las células de ratón L929 al estar inmersos en el extracto de un biomaterial utilizado en aplicaciones vasculares a diferentes concentraciones. Las **fig. 23** y **fig. 24** muestran los porcentajes de viabilidad celular promedio para los hGF y las células L929 respectivamente. Para el cálculo de la viabilidad celular en cada uno de los pocillos no fue necesaria la resta de la absorbancia promedio del blanco ya que al obtener este valor negativo fue considerado cómo cero. Para cada tipo de célula, se promedió la absorbancia resultante del control negativo del ensayo, es decir las células vivas. Este resultado corresponde a la absorbancia para una viabilidad celular del 100 %. A partir de este dato y mediante regla de 3 simple se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular para todos los pocillos utilizados en la placa de cultivo.

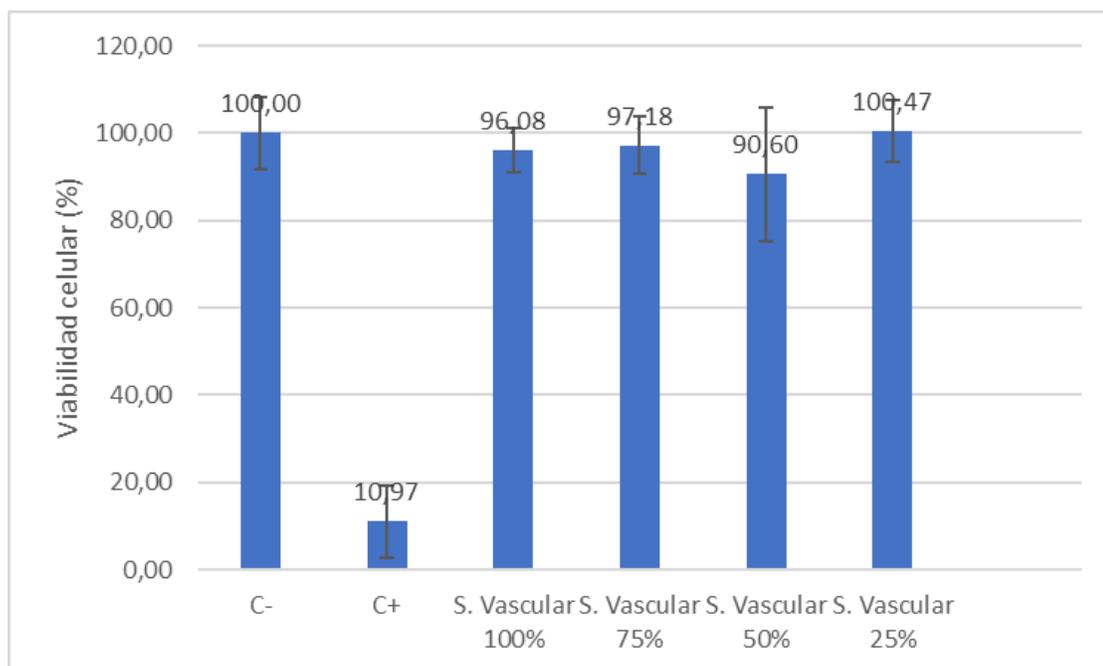


Fig. 23 Resultados de citotoxicidad para hGF. Autoría propia.

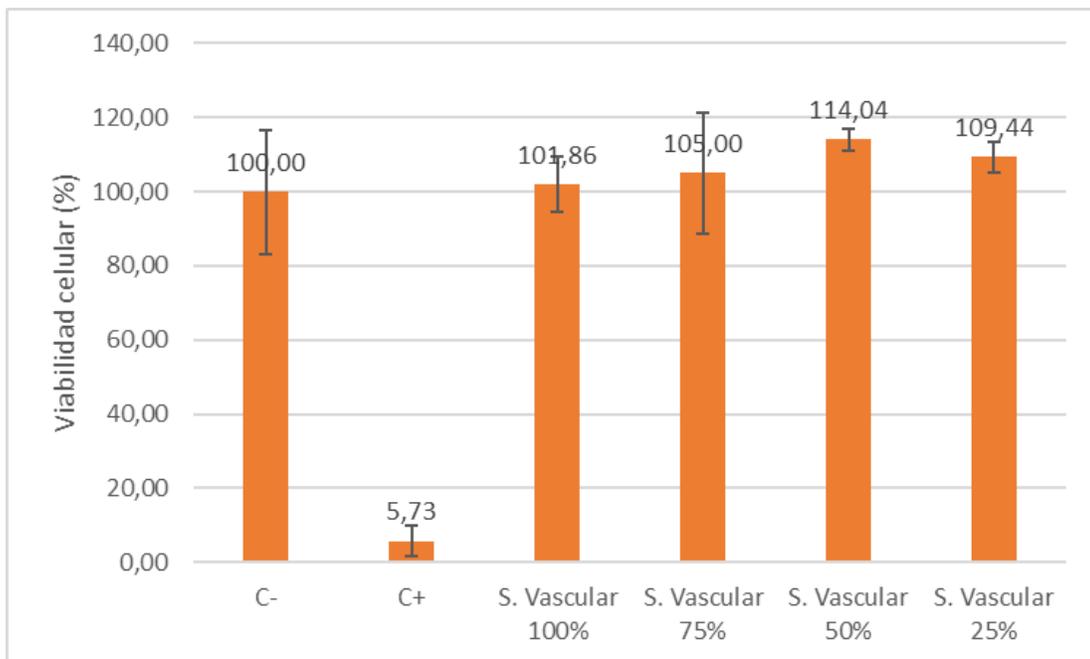


Fig. 24 Resultados de citotoxicidad para L929

La **TABLA VII** muestra la diferencia de los porcentajes de viabilidad celular entre las células hGF y L929 para las diferentes concentraciones del biomaterial.

TABLA VII
Diferencia de porcentaje de viabilidad celular entre hGF y L929

Concentración del biomaterial (%)	Diferencia de % viabilidad celular
100	5.78
75	7.82
50	23.44
25	8.97

VII. ANÁLISIS

Los hGF son las principales células del tejido conectivo de la mucosa oral. Este tipo de células poseen varias características que las convierten en candidatas óptimas para uso en la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Primeramente, existen distintos tipos de cirugías orales en donde el tejido gingival extraído no cumple una función y por lo tanto es desechado. Este aspecto permite obtener una fuente rica de hGF sin necesidad de realizar una intervención quirúrgica adicional con el objetivo de extraer células, cómo es el caso de los fibroblastos dérmicos [32].

Los hGF al estar inmersos en la mucosa oral poseen mayor riesgo de contaminación [33]. Los estudios han demostrado que los enjuagues con clorhexidina a bajas concentraciones son un antiséptico efectivo para el control de la placa bacteriana y poseen una citotoxicidad relativamente moderada lo que permite la tolerancia de los hGF ante estos [34]. En el presente estudio las dos muestras de las cuales se obtuvo un cultivo de hGF exitoso provenían de el único paciente que realizó rigurosamente los enjuagues con clorhexidina 2 días previos al procedimiento quirúrgico. Adicionalmente estudios anteriores han recomendado el uso de enjuagues de clorhexidina antes de la obtención de la muestra de tejido gingival [7]. Por tal motivo se propone que la clorhexidina juega un papel importante para mitigar riesgos asociados a la contaminación de cultivos primarios obtenidos de la cavidad oral.

La contaminación es uno de los aspectos más importantes a analizar al momento de realizar cultivos primarios provenientes de tejido bucal; la técnica aséptica y la esterilidad de todos los instrumentos y materias primas involucradas en el cultivo constituyen papeles cruciales para el establecimiento de hGFs libres de patógenos contaminantes [1]. Generalmente cualquier materia prima utilizada para la preparación de medios de cultivo posee el riesgo de contaminarse. Sin embargo, componentes cómo el SFB y la tripsina poseen un mayor riesgo de contaminación al provenir de origen animal [35].

Los antibióticos son componentes utilizados en medios de cultivo cuya función principal es mitigar los riesgos de contaminación. A pesar de ello, el uso excesivo de antibióticos puede desarrollar inconvenientes en el cultivo como ocultar la existencia de contaminantes de bajo nivel y promover el desarrollo de organismos con mayor resistencia a los antibióticos. Por otro lado, los instrumentos de laboratorio como: cajas petri, tubos falcon, puntas de micropipetas, etc, también pueden ser fuente de contaminación en el cultivo cuando existen inconvenientes en la esterilización de los mismos, como fallas técnicas en el autoclave, mal almacenamiento del material y errores en el sellado de los empaques. Generalmente la revisión de contaminación en el material estéril suele ser la actividad realizada en última instancia causando un retardo en la obtención de un cultivo libre de contagio [36].

La detección de agentes contaminantes se puede observar mediante un cambio en el pH del medio de cultivo, lo que conlleva a un cambio de coloración. Otra forma de detección es la observación del medio con un aspecto turbio y lechoso; por lo regular en este caso, el medio está acompañado de partículas blancas inmersas en el medio de cultivo [36].

En el presente estudio se desarrolló una serie de recomendaciones con el objetivo de mitigar los riesgos de contaminación asociados a la asepsia del personal del laboratorio y la limpieza y esterilización de equipos e instrumental usado en el laboratorio. Se realizó un test de esterilización a los instrumentos y materias primas involucradas en el cultivo de hGF. El test dio como resultado la contaminación de una de las cajas petri, observando turbidez en el medio de cultivo depositado en esta. La **Fig 18** indica que la contaminación en la caja petri fue originada por una bacteria [36].

Los hGF se pueden cultivar mediante el uso de dos técnicas: método de explante y método enzimático. No obstante, estudios han demostrado que la combinación de ambas técnicas genera un aislamiento celular más rápido. Las enzimas se encargan de descomponer la proteína mediante la inactivación de moléculas de adhesión, de esta manera permite la separación de las células del tejido. Comúnmente para aislar células de cultivos primarios se utiliza tripsina-EDTA, sin embargo, la tripsinización en altas concentraciones puede afectar drásticamente las propiedades de adherencia de la célula causando complicaciones en el establecimiento de células en los

frascos de cultivo [7]. Por otro lado, estudios han demostrado que el uso de colagenasa I no genera daños evidentes en la disociación celular [37].

El método de explante posee la ventaja de la no actuación de una enzima que pueda generar daño a las células, sin embargo, al no existir un factor que disocie fácilmente las células del tejido, la migración celular puede tardar mucho tiempo. En el presente estudio la separación de las células del tejido se dio en el sexto día después de haber realizado el cultivo primario. Autores han obtenido la migración celular en un menor tiempo con el uso de tripsina como agente enzimático del método compuesto [7].

De igual manera que en otros estudios, la morfología inicial de los hGF presentó una estructura fusiforme, con una cantidad mínima de células esféricas. La confluencia del 80 % se logró después de 5 días de la migración celular. En esta etapa hubo predominancia de células con forma de huso mediante la formación de una monocapa uniforme alrededor del tejido. Se sugiere que las células en forma esférica corresponden a queratinocitos; esto debido a la componente endotelial de la lámina propia. Asimismo el número de células con forma esférica disminuyó a partir del tercer pasaje, esto debido a que los queratinocitos no se encontraban en un medio adecuado para su supervivencia [38].

Por otro lado, antes del tercer pasaje los hGF tuvieron una tasa de crecimiento baja en el subcultivo celular; esto se debe a que si bien hubo una confluencia del 80 % en el cultivo primario, las células se encontraban depositadas únicamente alrededor de los tejidos a causa de su rápida adherencia en las zonas del frasco cercanas a los explantes. El subcultivo celular permitió una acomodación uniforme de los hGF en todo el frasco de cultivo aumentando su proliferación y por consiguiente su tasa de crecimiento. A partir del pase 3 los hGF cultivados en frascos T-75 alcanzaron una confluencia del 90-100 % en un promedio de 3 días.

Los fibroblastos provenientes de la mucosa oral se generan a partir del "ectomesénquima" derivado de la cresta neural. Su origen embrionario confiere a este tipo de células características pluripotentes con un gran potencial de diferenciación [39]. Los hGF presentan una reepitelización rápida sin formación de cicatriz. En este proceso los hGF cuentan con el apoyo de citoquinas,

prostaglandinas e integrinas permitiendo la proliferación de las células y su diferenciación en miofibroblastos con el fin de ocasionar una contracción en la herida [40].

La tinción con H&E es considerada cómo la tinción de referencia para la evaluación histológica de tejidos humanos. Mediante esta tinción es posible identificar las estructuras de tejidos y células. Los componentes celulares se pueden diferenciar en la tinción cómo eosinófilos y basófilos. Un aspecto eosinofílico hace referencia a un componente celular básico que ha sido teñido con eosina y que generalmente presenta una coloración rosada. Por otro lado los basófilos son estructuras ácidas cómo los núcleos celulares y son teñidos en tonos azules y púrpuras [41].

Estudios han demostrado que el color del citoplasma es un indicador para conocer la naturaleza de las células. El citoplasma al ser una estructura basófila puede presentar una coloración que va desde un tono azul hasta un púrpura tenue. En la tinción H&E el citoplasma de los fibroblastos presenta una coloración azul, esto debido a que estas células poseen una cantidad abundante de retículo endoplasmático. Por otra parte los miofibroblastos presentan una combinación de retículo endoplasmático y miofilamentos, lo cual permite que su citoplasma sea detectado mediante una coloración púrpura en este tipo de tinción [42].

En el presente estudio se detectó la presencia del núcleo celular y del citoplasma de hGFS, (**Fig. 25**). La estructura del núcleo celular se observó mediante una coloración azul-púrpura en las células. El citoplasma presenta una coloración púrpura tenue haciendo alusión a la posible aparición de miofibroblastos. Sin embargo, estudios también han sugerido que los miofibroblastos están relacionados con fibroblastos en proceso de apoptosis [43]. La inmersión de hGF en formol para la prueba de tinción H&E podría ser una causa de la similitud histológica del citoplasma de las células con fibroblastos en proceso de apoptosis.

A pesar de que tanto los hGF cómo las células L929 tuvieron una viabilidad celular mayor al 70 % en el test de citotoxicidad, al estar inmersas en el biomaterial a diferentes concentraciones; el objetivo principal de este estudio no fue la evaluación de la biocompatibilidad del material si no, las diferencias en el comportamiento y la viabilidad de los dos tipos de células. Los controles negativos se asumen como la referencia del 100 % de viabilidad celular, esta característica

permite una mayor fiabilidad al momento de realizar comparaciones entre los resultados obtenidos para los dos tipos de células. Pese a que la diferencia entre los porcentajes de viabilidad celular entre los hGF y L929 no fue demasiado alta; esta diferencia puede ser un factor clave al momento de determinar la toxicidad de un material, es decir, si un material que al ser evaluada su citotoxicidad conforme a lo establecido en la norma ISO 10993 presenta una viabilidad igual o ligeramente superior a 70 %, probablemente presente valores inferiores al 70 % para los hGF generando una clasificación de toxicidad del material. Por otra parte, pese a que los hGF presentaron una menor viabilidad en las diferentes concentraciones del biomaterial, hubo un aumento aproximado del 50% en la viabilidad del control positivo con respecto a las células L929. Para el control positivo del ensayo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es utilizado en el protocolo estándar de crioconservación de las líneas celulares [44].

El uso de DMSO representa una alternativa eficaz para la protección intracelular de las células a ser sometidas a proceso de crioconservación. Sin embargo, el DMSO está asociado a daño y muerte celular debido a su alta toxicidad [45]. Los resultados encontrados en el presente estudio sugieren una mayor viabilidad celular de hGF con respecto a las células L929 al estar en presencia de DMSO. Este aspecto resulta importante en el proceso de congelación y supervivencia de los hGF permitiendo su uso en estudios futuros y una posible mayor igualdad en la viabilidad de las células después de haber sido congeladas en comparación con las células L929.

VIII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló e implementó un protocolo de extracción de fibroblastos de tejido humano en el laboratorio de ensayos biológicos del programa de bioingeniería de la Universidad de Antioquia, el cual posibilitó el cultivo primario exitoso de hGF provenientes de dos muestras de tejido gingival.
- Se ejecutó un protocolo de descontaminación, el cual permitió de manera efectiva mitigar los riesgos de contaminación asociados a técnicas asépticas y esterilización de instrumentos y materias primas utilizadas en el cultivo primario.
- La combinación del método enzimático y explante logró la migración y disociación de las células del tejido en un periodo de 6 días. Se evidenció una proliferación celular abundante de los hGF después del tercer pasaje, alcanzando una confluencia del 90 % a 100 % en un periodo de 3 días.
- Se caracterizó morfológicamente los hGF mediante la tinción con H&E permitiendo la detección de estructuras celulares como el núcleo y el citoplasma; y la identificación del tipo de células mediante la coloración de las estructuras mencionadas. Se encontró que el citoplasma de los hGF coloreó de púrpura tenue, lo que significa que los fibroblastos se diferenciaron en miofibroblastos como si respondieran a un proceso de cicatrización o estaban en un proceso apoptótico debido al uso de formol en la fijación celular.
- La caracterización cuantitativa de las células mediante la cámara de Neubauer permitió detallar el rápido crecimiento de las células en pasajes posteriores al pasaje 0.
- Los hGF demostraron una menor viabilidad que la línea celular L929 al estar inmersos en un biomaterial específico a diferentes concentraciones; esta diferencia podría considerarse estadísticamente despreciable ya que las barras de error en cada experimento se solapan.

El uso de hGF en pruebas de citotoxicidad para la evaluación de biomateriales representa una alternativa con mayor fiabilidad.

- Los hGF indicaron una mayor viabilidad celular que la línea L929 a estar inmersos en DMSO. La viabilidad celular de los hGF podría ser mayor comparada con las células L929 después de ser sometidas a un proceso de crioconservación.

IX. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta la diferencia entre la viabilidad celular de los hGF y las células L929, se recomienda la implementación de hGF en ensayos de citotoxicidad con biomateriales cuyo rango de viabilidad celular determinado a partir del uso de la línea celular L929 se encuentra entre 70 % y 80 %. Adicionalmente se recomienda la caracterización y comparación cuantitativa de hGF y células L929 después de haber sido sometidas a un proceso de crioconservación con el fin de evaluar la respuesta de las células ante el DMSO.

REFERENCIAS

- [1] J. Villegas and M. McPhaul, "Establishment and culture of human skin fibroblasts," *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, vol. Chapter 28, 2005, doi: 10.1002/0471142727.mb2803s71.
- [2] Akira Takashima, "Establishment of Fibroblast Cultures Preparation and Isolation of Cells," 1998. Accessed: Apr. 30, 2001. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0201s00>
- [3] T. Wong, J. A. McGrath, and H. Navsaria, "The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration," *British Journal of Dermatology*, vol. 156, no. 6. 2007. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07914.x.
- [4] A. Villar Hernández et al., "Abordaje interdisciplinar en el tratamiento de las heridas en epidermólisis bullosa," *Enfermería Dermatológica*, vol. 10, no. 29, 2016.
- [5] I. O. for S. ISO, "Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity 10993.," 61010-1 © Iec:2001. 2017.
- [6] B. Thonemann, G. Schmalz, K. A. Hiller, and H. Schweikl, "Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components," *Dental Materials*, vol. 18, no. 4, 2002, doi: 10.1016/S0109-5641(01)00056-2.
- [7] R. Patil, A. Kale, D. Mane, and D. Patil, "Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique," *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 24, no. 1, 2020, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_282_19.
- [8] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromolecular Bioscience*, vol. 2, no. 2. 2002. doi: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
- [9] T. A. Fortunato, D. Bank, and P. Pula, "Vascular Regenerative Surgery: Promised Land for Tissue Engineers?," *Int J Stem Cell Res Transplant*, vol. 5, no. 2, pp. 268–276, 2017, doi: 10.19070/2328-3548-1700041.
- [10] M. Omar García Reyes y A. C. Escobar Á Alfredo von Marttens, "AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE GINGIVALES DE ZONA RETROMOLAR," Santiago, Chile.
- [11] Y. Ikada, "Challenges in tissue engineering," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, no. 10. 2006. doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [12] J. Lindhe and N. P. Lang, "Periodontologia Clinica e Implantologia Odontologica," in *Editorial panamericana*, vol. 7, no. 1, 2017.

-
- [13] A. Nanci, "Ten Cate's Oral Histology - EBook: Development, Structure and Function," Structure of the Oral Tissues, 2018.
- [14] T. E. Ichim, P. O'Heeron, and S. Kesari, "Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells," *Journal of Translational Medicine*, vol. 16, no. 1. 2018. doi: 10.1186/s12967-018-1536-1.
- [15] M. R. Homicz and D. Watson, "Review of Injectable Materials for Soft Tissue Augmentation," *Facial Plastic Surgery*, vol. 20, no. 1. 2004. doi: 10.1055/s-2004-822955.
- [16] I. R. Fernandes et al., "Fibroblast sources: Where can we get them?," *Cytotechnology*, vol. 68, no. 2, 2016, doi: 10.1007/s10616-014-9771-7.
- [17] P. Ahangar, S. J. Mills, L. E. Smith, S. Gronthos, and A. J. Cowin, "Human gingival fibroblast secretome accelerates wound healing through anti-inflammatory and pro-angiogenic mechanisms," *NPJ Regen Med*, vol. 5, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41536-020-00109-9.
- [18] M. Aimetti, F. Romano, D. C. Peccolo, and C. Debernardi, "Non-Surgical Periodontal Therapy of Shallow Gingival Recession Defects: Evaluation of the Restorative Capacity of Marginal Gingiva After 12 Months," *J Periodontol*, vol. 76, no. 2, 2005, doi: 10.1902/jop.2005.76.2.256.
- [19] "Hiperplasia gingival por medicamentos," *SEMERGEN - Medicina de Familia*, vol. 33, no. 5, 2007, doi: 10.1016/s1138-3593(07)73892-3.
- [20] R. A. Kolte, A. P. Kolte, and P. Rathi, "Association of the gingival line angle with the gingival and interdental smile line: A gender based evaluation," *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, vol. 31, no. 6, 2019, doi: 10.1111/jerd.12517.
- [21] Evidence-Based Periodontal and Peri-Implant Plastic Surgery. 2015. doi: 10.1007/978-3-319-13975-3.
- [22] R. M. Khashaba, N. B. Chutkan, and J. L. Borke, "Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingiva and a mouse L929 cell line," *Int Endod J*, vol. 42, no. 8, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01572.x.
- [23] G. Auburger et al., "Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease," *Mol Neurobiol*, vol. 46, no. 1, 2012, doi: 10.1007/s12035-012-8245-1.
- [24] G. N. Stacey, "Cell culture contamination," *Methods in Molecular Biology*, vol. 731, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-80-5_7.
- [25] U. Jammalamadaka and K. Tappa, "Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering," *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 9, no. 1. 2018. doi: 10.3390/jfb9010022.
- [26] L. Kong, Y. Gao, G. Lu, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang, "A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Eur Polym J*, vol. 42, no. 12, 2006, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.08.009.
- [27] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized*

Applications: Sixth Edition. 2011. doi: 10.1002/9780470649367.

[28] A. Bascones and S. Morante, “Antisépticos orales: Revisión de la literatura y perspectiva actual,” *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, vol. 18, no. 1, 2006, doi: 10.4321/s1699-65852006000100004.

[29] José Luis Guerrero Gironés, “Efectos Biológicos de Cuatro Cementos Definitivos Usados en Implantología sobre los Fibroblastos Gingivales Humanos,” Murcia, 2020.

[30] V. Padrón et al., “Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal,” vol. 1, no. 1, pp. 4–8, 2012, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331328086003>

[31] J. M. Lopez-Alcorocho Sanchez et al., “Estudio piloto para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior (LCA) con cultivos de fibroblastos autólogos sobre membranas de colágeno I/III,” *Trauma (Spain)*, vol. 24, no. 1, 2013.

[32] Y. Matsuda, K. Takahashi, H. Kamioka, and K. Naruse, “Human gingival fibroblast feeder cells promote maturation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 503, no. 3, 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.116.

[33] S. B. Lee, C. González-Cabezas, K. M. Kim, K. N. Kim, and K. Kuroda, “Catechol-Functionalized Synthetic Polymer as a Dental Adhesive to Contaminated Dentin Surface for a Composite Restoration,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 8, 2015, doi: 10.1021/acs.biomac.5b00451.

[34] G. Brunello, K. Becker, L. Scotti, D. Drescher, J. Becker, and G. John, “Effect of Three Chlorhexidine-Based Mouthwashes on Human Gingival Fibroblasts: An In Vitro Study,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 5, 2022, doi: 10.3390/app12052417.

[35] O. W. Merten, “Virus contaminations of cell cultures - A biotechnological view,” in *Cytotechnology*, 2002, vol. 39, no. 2. doi: 10.1023/A:1022969101804.

[36] Atcc, “Animal Cell Culture Guide,” Atcc, vol. 39, no. 6, 2014.

[37] M. Masson-Pévet, H. J. Jongsma, and J. de Bruijne, “Collagenase- and trypsin-dissociated heart cells: A comparative ultrastructural study,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 8, no. 10, 1976, doi: 10.1016/0022-2828(76)90082-1.

[38] S. Wanichpakorn and U. Kedjarune-Laggat, “Primary cell culture from human oral tissue: Gingival keratinocytes, gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts,” *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 32, no. 4, 2010.

[39] S. L. Alfonso García, M. T. Parada-Sanchez, and D. Arboleda Toro, “The phenotype of gingival fibroblasts and their potential use in advanced therapies,” *European Journal of Cell Biology*, vol. 99, no. 7. 2020. doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151123.

[40] S.-E. Víctor y D.-C. Antonio, “Fisiología y usos terapéuticos de los fibroblastos gingivales Physiology and therapeutic uses of gingival fibroblasts,” Cartagena, Colombia, Jan. 2019.

[41] L. Salazar y F. Moreno, “Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en

secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar,” *Salutem Scientia Spiritus*, vol. 2, no. 2, 2016.

[42] J. K. C. Chan, “The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology,” *International Journal of Surgical Pathology*, vol. 22, no. 1. 2014. doi: 10.1177/1066896913517939.

[43] I. García-Alonso, “Reparación de heridas,” *Proceso de reparación de heridas*, 2007.

[44] L. M. Ávila-Portillo et al., “Fundamentos de criopreservación,” *Rev Colomb Obstet Ginecol*, vol. 57, no. 4, 2006, doi: 10.18597/rcog.468.

[45] X. Yao and S. Matosevic, “Cryopreservation of NK and T Cells Without DMSO for Adoptive Cell-Based Immunotherapy,” *BioDrugs*, vol. 35, no. 5. 2021. doi: 10.1007/s40259-021-00494-7.

[46] Y. Liu, N. E. Vrana, P. A. Cahill, and G. B. McGuinness, “Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 90 B, no. 2, 2009, doi: 10.1002/jbm.b.31310.

ANEXOS

Anexo I. Aprobación del Comité de Bioética en Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria (CBE-SIU)

Anexo II. Consentimiento informado entregado a los pacientes antes de la intervención quirúrgica para la obtención de la muestra de tejido gingival.