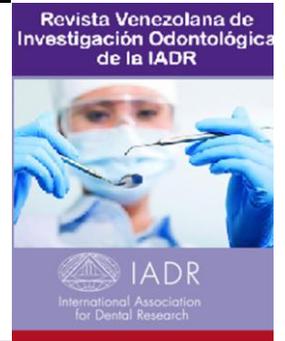




Depósito Legal: ppi201302ME4323
ISSN: 2343-595X

Revista Venezolana de Investigación Odontológica de la IADR

<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio>



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Análogo de mucosa oral basado en el co-cultivo de fibroblastos gingivales y queratinocitos¹

Elsy Lorena Jerez ^{a2}, Lorena Dávila ^b, Karla Padrón ^b, Luis González ^b, Siham Salmen ^c, Susana Arteaga ^b, Leonel Castillo ^b

- Residente de Maestría de Periodoncia, Universidad de Panamá, Panamá.
- Profesor de la Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Instituto de inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

RESUMEN

Historial del artículo
Recibido: 16-02-2016
Aceptado: 01-10-16
Disponible en línea:
11-02-2017

Palabras clave:

Fibroblasto,
Queratinocito,
Co-cultivo,
Análogo de
mucosa oral.

Objetivo: la presente investigación tiene por objetivo describir el desarrollo del co-cultivo celular *in vitro* de un análogo de encía. **Materiales y métodos:** A partir de pequeñas biopsias de encía en ratas *Sprague Dawley*, se hicieron cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos, una vez alcanzada confluencia celular del 80% se procedió a sembrar los fibroblastos en la malla de colágeno, dos semanas más tarde se sembraron los queratinocitos. **Resultados:** Durante la sexta semana las células formaron monocapas con disposición ordenada y se diferenciaba claramente la morfología fusiforme, alargada y de núcleo redondeado en posición central característico de los fibroblastos gingivales. Los queratinocitos se observaron como células irregularmente poliédricas con núcleo central y citoplasma de aspecto hialino. Basado en los principios y técnicas de ingeniería tisular y haciendo uso de una membrana de colágeno bovino marca Mem-Lock® de la casa comercial *BioHorizons*®, fue posible obtener un co-cultivo celular utilizando dicha membrana como *scaffold* en un periodo de tiempo de 4 semanas de cultivo. **Conclusión:** En esta investigación fue posible aislar y cultivar exitosamente los dos principales tipos celulares que constituyen la mucosa bucal a partir de muestras tomadas de ratas *Sprague Dawley*.

1 Investigación financiada por el CDCHTA de la Universidad de Los Andes, bajo el código O-311-15-07-B.

2 Autora de correspondencia: Jerez Elsy Lorena. E-mail: lorenajerez@hotmail.com

Gum analogue based on co-culture of gingival fibroblasts and keratinocytes

ABSTRACT

Objective: This paper aims to describe the cellular *in vitro* co-culture for gum analogue. **Materials and methods:** derived from small gum biopsies samples from rats Sprague Dawley, primary cultures were grown from fibroblasts and keratinocytes. Once 80% cellular confluence was reached, the fibroblasts were implanted in the collagen mesh, two weeks later the keratinocytes were implanted as well. **Results:** During the sixth week the cells formed monolayers (single layers) with an arranged disposition, making clearly visible the fusiform morphology, elongated and with a round nucleus in a centered position, this is typical of gingival fibroblasts. The keratinocytes, on the other hand, were irregular polyhedral cells with a central nucleus and hyaline aspect. Based on the principles of tissue engineering and using a Mem-Lock® bovine collagen membrane from BioHorizons®, it was possible to obtain a cellular co-culture, using said membrane as a scaffold in a 4 week incubation period. **Conclusion:** This research successfully isolated and cultured the two main cellular types that constitute the oral mucus coming from samples taken from Sprague Dawley rats.

Keywords: fibroblasts, keratinocytes, co-culture, gum analogue.

INTRODUCCIÓN

La demanda de tratamiento médico y odontológico ocasionado por la pérdida de tejidos o por el daño de órganos en el macizo craneofacial secundarios a trauma, defectos congénitos y enfermedades adquiridas, representan un grave problema de salud para la población. Aunque en términos generales los tejidos humanos tienen potenciales limitados de regeneración, los recientes hallazgos en la investigación con células madre e ingeniería tisular proveen nuevas técnicas para ser aplicados en los tejidos dentales y craneofaciales(1), lo cual aplicado en el área de Odontología permite atender gran variedad de patologías presentes en los pacientes a través de la utilización de biomateriales que proveen la estructura de andamiaje temporario y guía al nuevo tejido en crecimiento.

La reparación y regeneración de tejidos a través de andamios naturales y artificiales han sido analizadas desde el punto de vista bioquímico, porque contienen dentro de sus propiedades factores de crecimiento que proporcionan un ambiente conductivo para la angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular (2).

En la actualidad es posible cultivar *in vitro* los queratinocitos y fibroblastos de la mucosa bucal de un paciente sano, sembrarlos sobre un andamio y una vez generado el equivalente de mucosa bucal, reconstruir diversos defectos mucosos (2-7).

Esta investigación se planteó como objetivo describir el desarrollo del co-cultivo celular *in vitro* de un análogo de encía, considerando que la siembra de fibroblastos gingivales promueve el desarrollo de tejido conectivo (4-8) y la siembra de queratinocitos el de tejido epitelial (7-9).

Aún se mantiene la necesidad de encontrar sustitutos eficientes y biocompatibles para lograr el aumento de los tejidos blandos existentes o crear una nueva zona de mucosa bucal. Al respecto, la ingeniería de tejidos permite la obtención de una cantidad considerable de tejido, perfilándose como una alternativa en la restitución de los tejidos perdidos o lesionados.

Desde la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela se han llevado a cabo estudios en el desarrollo de cultivos celulares en monocapa a partir de tejidos dentales y paradentales con resultados favorables *in vitro*, el presente estudio representa un avance de esta línea de investigación, ya que el desarrollo del co-cultivo constituye el paso previo a la creación de sustitutos biológicos de mucosa bucal, en miras a disminuir las limitaciones de los procedimientos quirúrgicos tradicionales tales como: la morbilidad asociada a la obtención de tejidos de sitios donantes amplios del propio paciente, así como disminuir el tiempo operatorio y la necesidad de cirugías múltiples en caso de defectos mucosos extensos.

METODOLOGÍA

Por las características que presenta el estudio se circunscribe como una investigación de tipo descriptivo con un diseño de campo experimental, dado que los datos primarios son obtenidos bajo condiciones rigurosamente controladas (10). La investigación contó con la aprobación del comité de bioética del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes (BIOULA) bajo el código CEBIOULA/039.

Para la realización del presente trabajo de investigación, se utilizó como fuente de tejido cuatro muestras de mucosa oral normal de espesor total (epitelio y corion), obtenida de cuatro ratas *Sprague Dawley*. Los especímenes murinos empleados eran machos de 2 meses de edad, con un peso aproximado de 250 gramos, suministrados por el BIOULA.

La técnica de recolección de datos fue la observación asistida mediante el microscopio de fase invertida, el microscopio de fluorescencia y el microscopio óptico. Los datos obtenidos durante el cultivo de cada línea celular fueron registrados en un instrumento una vez por semana, el cual era contentivo de: forma de las células, tamaño, viabilidad celular, adhesión a la placa de cultivo, relación intercelular, confluencia y la respuesta al marcador en el caso de los fibroblastos.

El presente estudio forma parte de una línea de investigación, manteniendo los parámetros estandarizados en un estudio previo (4), donde se obtuvo la purificación de los fibroblastos

gingivales; sin embargo, para el cultivo de queratinocitos este protocolo fue modificado (específicamente en el porcentaje aplicado de Suero Fetal Bovino en el medio de cultivo). La metodología se desarrolló en dos fases, la primera consistió en el desarrollo de los cultivos celulares de fibroblastos y queratinocitos (en placas de cultivo separadas), y la segunda siembra y co-cultivo de ambos tipos celulares.

Fase I. Desarrollo del cultivo celular de fibroblastos y queratinocitos

Obtención de la muestra

Previa limpieza de la zona con clorhexidina, la muestra de tejido se obtuvo de la papila gingival correspondiente a cada uno de los incisivos centrales derechos de 4 ratas *Sprague Dawley*. El procedimiento se realizó bajo anestesia Ketamina (Ketamine®), en dosis de 50 mg/kg combinada con Xilacina (Sedazine®) 10 mg/Kg, vía intraperitoneal y se aplicó lidocaína infiltrativa al 2 % (Lidocaina New Stetic®) intrabucal, en el fondo del surco vestibular. La toma de la muestra se realizó en la encía adherida vestibular del maxilar superior, en la región ubicada entre los incisivos, utilizando bisturí de Bard Parker y hoja número 15 C, se realizó una incisión superficial en el tejido, continuando con una disección profunda hasta retirar los fragmentos de tejido mucoso de espesor total, dejando indemne el periostio. Los cuatro fragmentos de tejido (uno por cada espécimen) fueron del mismo tamaño (5mm x 5mm) y se manejaron con la misma técnica quirúrgica.

Las muestras fueron transportadas en una cava con bloques de refrigeración (EverCold®) para garantizar la cadena de temperatura a 4 °C hasta el Laboratorio de Cultivo del Instituto de Inmunología Clínica (IDIC) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes.

En el laboratorio bajo normas de bioseguridad, previa desinfección y preparación del área de trabajo en campana de seguridad biológica, el tejido epitelial fue separado del tejido conectivo, con la ayuda del bisturí sobre una cápsula de *Petri*, luego se lavó con solución fisiológica para remover restos de sangre, los fragmentos obtenidos de tejido conectivo y de tejido epitelial se almacenaron en cuatro tubos de 15 ml estériles contentivos de medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* completo (D-MEM) (D 5546 Sigma-Aldrich ®), al cual se le adicionó 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2,5 mg/mL de anfotericina B trihydrate: sc-227265 (Santa Cruz Biotechnology, CA), para su posterior procesamiento.

Cultivo de queratinocitos gingivales

El tejido epitelial fue cortado en fragmentos de aproximadamente 2mm x 2mm denominados explantes, los mismos se homogenizaron con el émbolo de una jeringa estéril para obtener fragmentos de tejidos más pequeños. Las muestras fueron suspendidas nuevamente en medio D-MEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich) al 10% en un tubo falcom, para eliminar las células mononucleares presentes en el tejido. Posteriormente se llevó a la centrifugación a 400 g en centrifuga refrigerada marca

Sorvall ® durante 30 minutos, se tomó el pellet ubicado en el fondo del tubo, se efectuaron 3 lavados y se sembró en una placa de cultivo con 1 ml de D-MEM completo. Para determinar la viabilidad celular de los queratinocitos se tomaron 2 µl de medio suplementado, el cual debía contener las células y se añadió 198 µl de azul trypan al 0.4%, se colocó en cámara de Newbauer y se observó en el microscopio óptico (MO). Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana, durante 10 semanas, con la intención de suministrarle a las células los nutrientes necesarios. Las placas de cultivo se incubaron en la estufa con humedad relativa al 5% de CO₂ a 37°C.

Cultivo de fibroblastos gingivales

Una vez separado el tejido conectivo del tejido epitelial, siguiendo el protocolo previamente descrito, el tejido conectivo fue cortado en explantes de aproximadamente 2mm x 2mm, que fueron homogenizados con el émbolo de una jeringa estéril para obtener fragmentos de tejidos más pequeños (Fig. 1).

Las muestras fueron suspendidas nuevamente en medio D-MEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich) al 20% en un tubo falcom, para eliminar las células mononucleares presentes en el tejido, la suspensión celular de los fibroblastos fue sometida a separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque densidad 1077 (Sigma-Aldrich). Posterior a la centrifugación a 400 g durante 30 minutos en centrifuga refrigerada marca Sorvall ®, se tomó el pellet ubicado en el fondo del tubo, se efectuaron 3 lavados y se sembró en una placa de cultivo con 1 ml de medio D-MEM completo. Para determinar la viabilidad celular de los fibroblastos se tomaron 2 µl de medio suplementado el cual debía contener las células y se añadió 198 µl de azul trypan al 0.4%, se colocó en cámara de Newbauer y se observó en el microscopio óptico (MO). Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana, durante 10 semanas.

El fenotipo de fibroblastos se observó mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia directa con el marcador específico de fibroblastos anticuerpo *ER-TR7 sc-73355 PE* (Santa Cruz Biotechnology, CA). Las placas de cultivo se incubaron en la estufa con humedad relativa al 5% de CO₂ a 37°C.

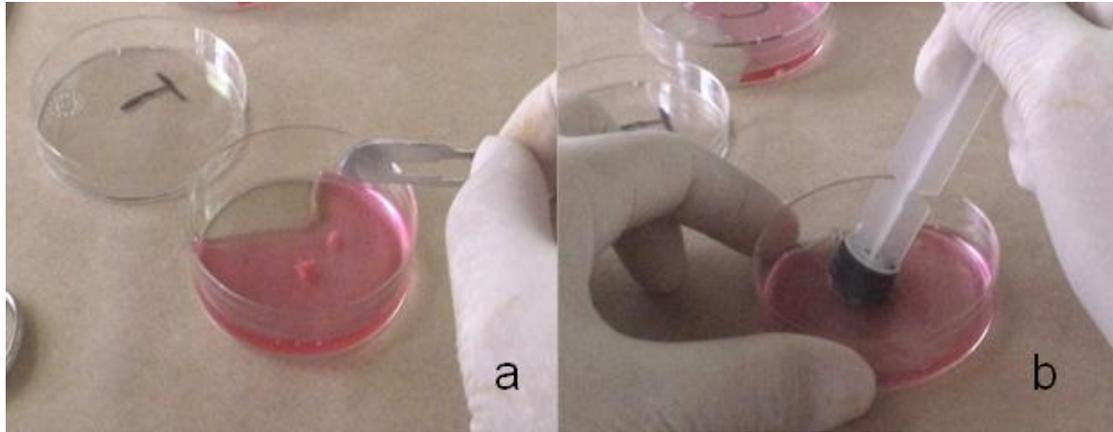


Fig. 1. Procesamiento de la muestra y separación celular. **a:** Obtención de explantes mediante el corte con hoja de bisturí. **b:** Homogenización de la muestra.

Fase II: Elaboración del co-cultivo celular

Siembra de fibroblastos gingivales en malla

A la sexta semana se alcanzó una confluencia celular del 80% del medio. Los fibroblastos cultivados fueron sembrados e incubados durante 2 semanas en atmósfera húmeda a 35°C y 5% de CO₂ en un fragmento de 20mm x 15 mm de malla de colágeno comercial de uso odontológico marca O-Mem-Lok® de 0,3 mm de espesor de la casa *BiHorizons* (Alabama, Estados Unidos).

Siembra de queratinocitos gingivales en malla con fibroblastos

Después de 8 semanas de cultivo de los queratinocitos bucales y dos semanas posteriores de la siembra de los fibroblastos en la malla de colágeno, se procedió a la siembra de los queratinocitos para generar el co-cultivo de encía de rata, esto por un periodo de dos semanas.

RESULTADOS

Las muestras de tejido oral fueron tomadas de ratas *Sprague Dawley*, a partir de dichas muestras se desencadenaron una serie de procedimientos con la finalidad de obtener el co-cultivo de tejido gingival murino. Los análisis celulares previos a la generación del co-cultivo celular, arrojaron lo siguiente:

La viabilidad celular para los fibroblastos fue de 100% y la de los queratinocitos fue de 97%, la evaluación de los queratinocitos se determinó mediante análisis morfológico, observando a través de microscopía invertida células aplanadas, irregularmente poliédricas, con núcleo único, central y citoplasma de aspecto hialino. En las periódicas observaciones

semanales de las placas de cultivo contentivas de queratinocitos no se evidenció la presencia de células con características morfológicas distintas.

La inmunofluorescencia evaluó la morfología e interrelación celular, corroborando así el enriquecimiento predominante de células fusiformes, de núcleo único central, ovalado proporcional al tamaño celular que respondió positivamente a la inmunotinción con el marcador específico para fibroblastos (Fig. 2)



Fig. 2. Fibroblastos gingivales observados a través del microscopio de inmunofluorescencia dando positivo al marcador *ER-TR7 sc-73355 PE*

Los resultados de la citometría de flujo permitieron observar el enriquecimiento de fibroblastos de la población de células adheridas en monocapa. (Fig. 3)

Quadrant Statistics							
File: 1225P.003				Log Data Units: Linear Values			
Sample ID: FIBROBLASTOS +				Patient ID:			
Tube: Untitled				Panel: Untitled Acquisition Tube List			
Acquisition Date: 31-Dec-69				Gate: G2			
Gated Events: 3185				Total Events: 5000			
X Parameter: ER-TR7 PE (Log)				Y Parameter: Forward Scatter (Linear)			
Quad Location: 10, 47							
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2455	77.08	49.10	2.80	2.09	291.35	228.86
UR	730	22.92	14.60	92.10	34.78	579.10	449.85
LL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Fig. 3 Resultados de la citometría de flujo para los fibroblastos gingivales.

En la primera semana del cultivo se observaron células en el fondo de la placa y de morfología redondeada, durante la segunda semana, de ambas líneas celulares se observaron células con morfología variada y de manera aislada. (Fig.4)

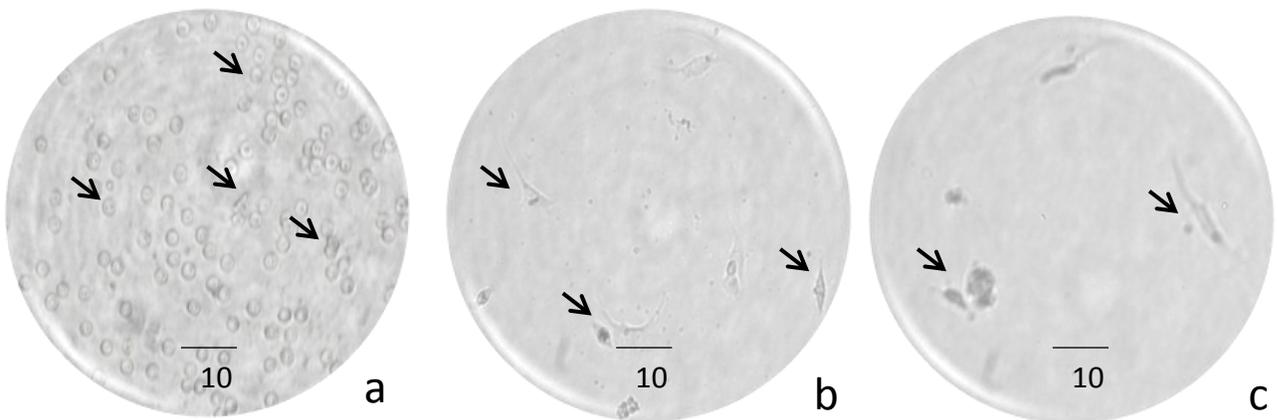


Fig. 4 Microfotografías de la cinética de crecimiento de los cultivos celulares **a:** Flechas indican elementos celulares redondeados. **b:** Segunda semana. Cultivo de queratinocitos, flechas indican células aisladas. **c:** Segunda semana. Cultivo de fibroblastos, flechas indican células aisladas.

A partir de la tercera semana, se observó una proliferación celular más uniforme, de un 20% de confluencia con respecto al medio y maduración, en ambos tipos celulares, agrupándose en colonias. En la cuarta y quinta semana la confluencia celular aumentó aproximándose a un 60%, los fibroblastos conformaron una clara y distinguida trama de células fusiformes con largas prolongaciones, los queratinocitos también se encontraron confluentes manifestando conexiones intracelulares (Fig. 5).

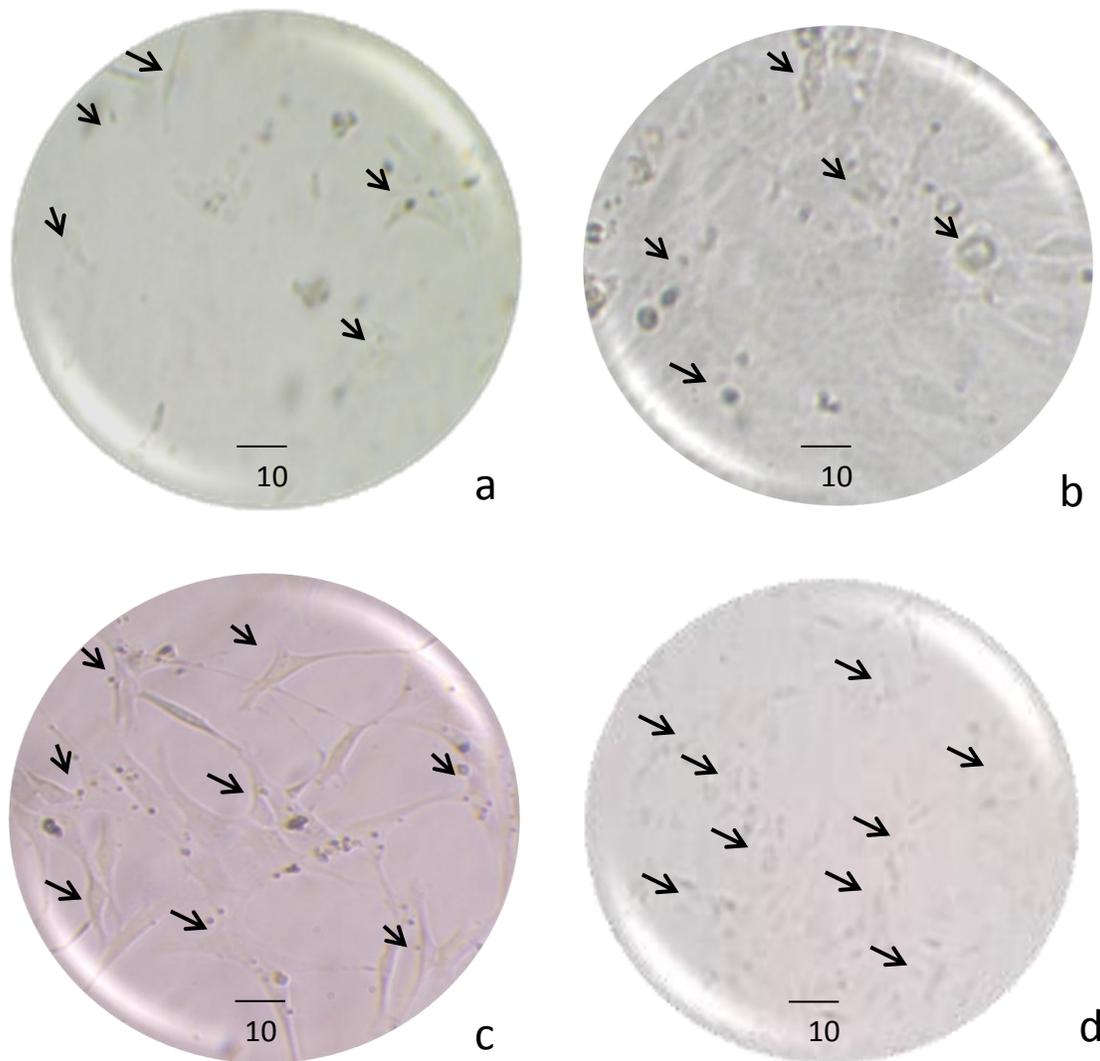


Fig. 5. Microfotografías de la cinética de crecimiento de los cultivos celulares. **a:** Cuarta semana. Flechas indican células con morfología fusiforme (fibroblastos). **b:** Cuarta semana. Las flechas señalan células con morfología poliédrica (queratinocitos). **c:** Quinta semana. Flechas indican células con morfología fusiforme (fibroblastos). **d:** Quinta semana. Las flechas señalan células con morfología poliédrica (queratinocitos).

Durante la sexta semana se alcanzó una confluencia celular del 80% del medio en ambos cultivos. Las células habían formado monocapas con disposición ordenada y se diferenciaba claramente la morfología fusiforme, alargada y de núcleo redondeado en posición central característico de los fibroblastos gingivales. Los queratinocitos se observaron como células irregularmente poliédricas con núcleo central y citoplasma de aspecto hialino (Fig. 6).

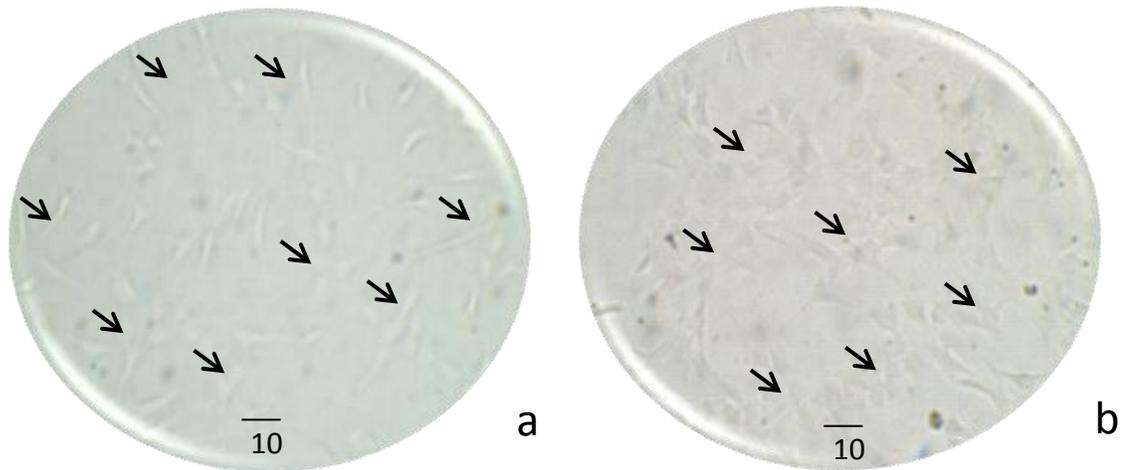


Fig. 6 Microfotografías de la cinética de crecimiento de los cultivos celulares. **a:** Sexta semana. Flechas indican células con morfología fusiforme y alargada (fibroblastos) **b:** Sexta semana. Flechas indican células poliédricas con núcleo central y citoplasma de aspecto hialino.

Basado en los principios y técnicas de ingeniería tisular y haciendo uso de una membrana de colágeno (Mem-Lock®, Alabama, Estados Unidos) fue posible obtener un co-cultivo celular utilizando dicha membrana como *scaffold* en un periodo de tiempo de 4 semanas en medio de cultivo. Durante la primera y segunda semana de co-cultivo, fue posible observar mediante microscopio óptico elementos celulares en estrecho contacto con la membrana, lo cual indicó que la adhesión celular y la unión intercelular se desarrollaron adecuadamente a través de la malla (Fig. 7)

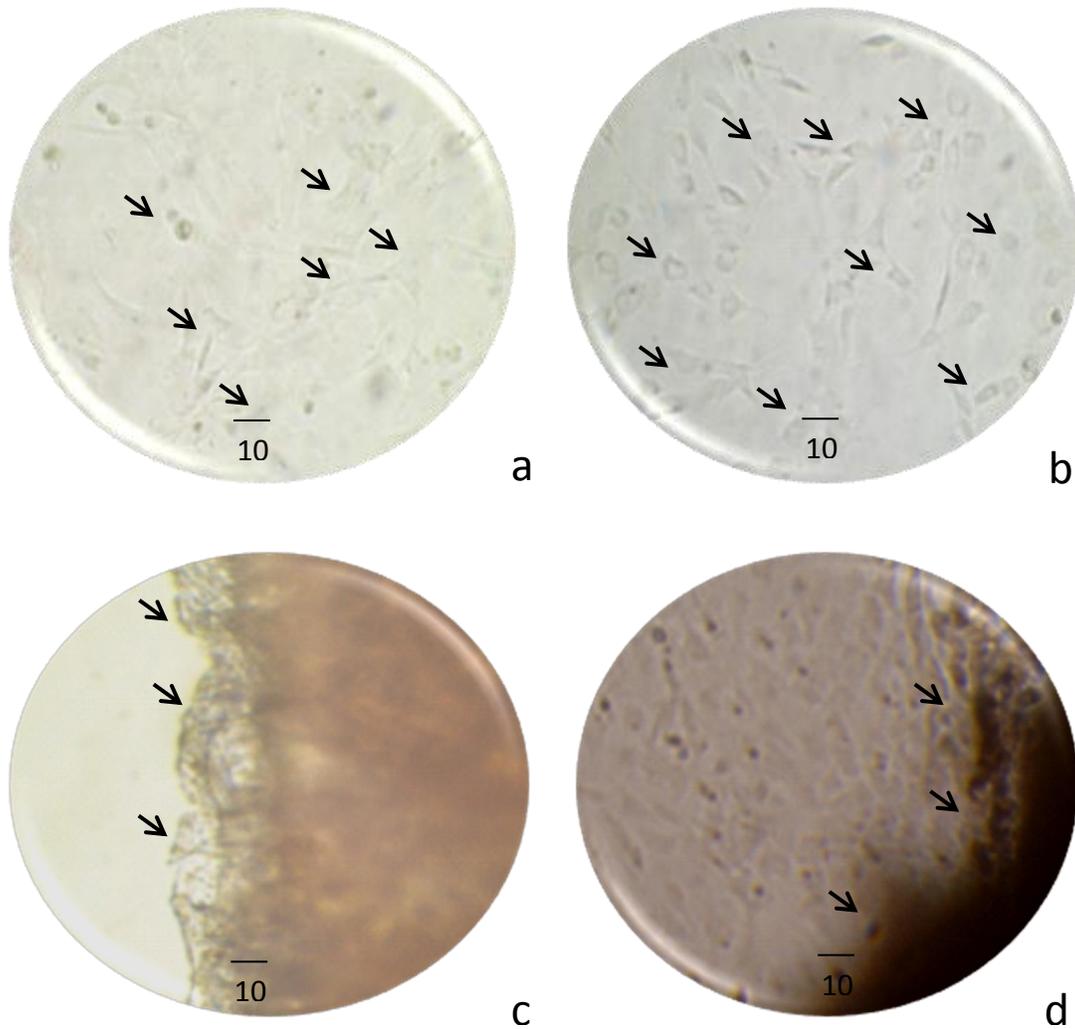


Fig. 7 Microfotografías de la cinética de crecimiento de los cultivos celulares **a:** Octava semana. Flechas indican fibroblastos gingivales. **b:** Octava semana. Flechas indican queratinocitos. **c:** Flechas indican aspecto de la membrana de colágeno Mem Lok ®. **d:** Flechas indican membrana de colágeno con relación a elementos celulares.

DISCUSIÓN

Una de las más comunes aplicaciones de las técnicas de cultivo se incluyen en tratamientos novedosos en dermatología; en estos casos el cultivo celular autólogo con el uso de acarreadores, membranas y matrices, ha incrementado el pronóstico favorable de lesiones con grandes exposiciones de tejido de granulación en heridas dermatológicas, para acelerar, obtener y favorecer regeneración del tejido dañado, en lugar de derivar en un proceso normalmente esperado de cicatrización. Tal es el caso de la investigación realizada por

Arango *et al.* 2009 (9) en la cual cultivaron fibroblastos y queratinocitos a fin de obtener un equivalente cutáneo, al igual que en este estudio, los investigadores lograron sembrar y mantener las características de tejido epitelial y conjuntivo normal. Éstos resultados coinciden con los revelados por González *et al.* 2009 (7) en el cual obtuvieron láminas de tejido oral mediante cultivo *in vitro* de fibroblastos y queratinocitos.

La constitución histológica de la mucosa bucal es similar a la cutánea, interactúan los mismos tipos celulares principales, logrando estandarizar mediante el presente estudio protocolos para la generación de un sustituto de mucosa bucal en el laboratorio lo que a futuro representa una indudable utilidad clínica, ya que a pesar de que existen múltiples opciones terapéuticas para el tratamiento de defectos de la mucosa bucal, aún se mantiene la necesidad de encontrar sustitutos funcionales, anatómicos y estéticamente similares al tejido a reemplazar, así como soluciones que reduzcan la morbilidad asociada a la obtención de tejido de zonas donantes.

Fue posible aislar y cultivar fibroblastos y queratinocitos de origen murino a partir de pequeñas biopsias. En este contexto, el cultivo de fibroblastos demostró una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en medios de cultivo y elevada eficiencia a la hora de generar confluencia, logrando la cobertura de hasta un 80% en su placa de cultivo a las 6 semanas de incubación, resultados similares se obtuvieron con el cultivo de queratinocitos, estos datos coinciden con los publicados por otros investigadores (11-13). La caracterización de las células cultivadas permitió determinar la presencia de fibroblastos y queratinocitos en las placas de cultivo, los primeros resultando positivos a las pruebas de citometría e inmunofluorescencia, mientras que los segundos sólo se caracterizaron mediante evaluación morfológica debido a que no fue posible contar con el marcador específico para queratinocitos.

Las células en cultivos tridimensionales o en 3D presentan un comportamiento similar como lo hacen en sus organismos de origen, la calidad y cantidad de información obtenida es mayor en aquellos ensayos en los cuales se utilizan técnicas de cultivo de células en 3D, porque hay una gran similitud con los organismos de origen (14). El diseño de cultivo realizado en la presente investigación es tridimensional, y de acuerdo al número de tipos celulares involucrados se denomina según Frasnay 1995 como Co-Cultivo, el mismo se describe entre los cultivos tridimensionales, al respecto García 2013 (14) lo clasifica como cultivo organotípico tridimensional secundario, estos tipos de cultivo se caracterizan porque constan de varios tipos celulares que interactúan entre sí, de tal manera de asemejar su comportamiento existente en su tejido de origen, este tipo de cultivos se enfoca en *in vitro* de tejidos u órganos completamente funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en transplantes.

Lograda una elevada tasa de proliferación de las células a utilizar en la construcción del sustituto de mucosa artificial, se procedió a la construcción de dicha mucosa utilizando un soporte estromal compuesto por una membrana de colágeno, durante la sexta semana de

cultivo se procedió a la siembra de los fibroblastos sobre una membrana de colágeno comercial (*Mem-Lock*®), y, dos semanas después fueron sembrados los queratinocitos constituyendo así un cultivo tridimensional. Ambos tipos celulares mantuvieron una adecuada proliferación y actividad biológica, lo cual se puso en evidencia al realizar el estudio histológico, que coincide con la investigación realizada por Hilmann *et al.* 1999 (15) en la cual demostraron que los fibroblastos expresan diferencias representativas en cuanto a proliferación biosíntesis en cultivos tridimensionales en comparación a cultivos en monocapa, asimismo, observaron una apariencia y distribución espacial similar a la de las células *in vivo*.

Al respecto de los soportes, diferentes autores han utilizado materiales para la construcción de tejidos en el laboratorio con resultados similares, mencionando algunos de ellos como los geles de quitosano fibrina y agarosa y colágeno. Cabe destacar que el uso de membranas como *scaffold* es una técnica ampliamente utilizada por investigadores los cuales además de hacer uso del colágeno, emplean diversos materiales para la construcción de tejidos, tal es el caso de los estudios reportados por Marañéz *et al.* 2011 (8) en el que utilizan un soporte de fibrina-agarosa; el de Monteagudo *et al.* 2009 (2) en el cual utilizó una membrana de submucosa intestinal de cerdo. En este estudio, la membrana utilizada fue de colágeno Tipo I Bovino, su uso permitió un adecuado desarrollo del análogo de encía, encontrándose apto para ser aplicado, ya que su constitución y características físicas representan una ventaja en la afinidad de las células a su superficie y en la manipulación si se compara con un elemento en gel.

CONCLUSIONES

La metodología desarrollada en la presente investigación permitió el aislamiento y cultivo de fibroblastos y queratinocitos gingivales a partir de biopsias de mucosa oral murina y su posterior utilización para generar el cultivo organotípico. La membrana de colágeno funcionó como un *scaffold* exitoso, ya que el tiempo que permaneció inmersa en el medio de cultivo no se observó disolución de la misma y permitió el desarrollo celular, así como adhesión intercelular y adhesión de las células a la propia malla.

La creación de un cultivo organotípico de mucosa bucal en nuestro laboratorio representa un paso inicial para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas. Se recomienda continuar con la línea de investigación, haciendo uso de una muestra de mayor tamaño, con la finalidad de obtener resultados que permitan realizar inferencias sobre la aplicación *in vivo* de estos tejidos creados artificialmente en la clínica humana.

De contarse con los recursos necesarios, se sugiere orientarla a la valoración *in vivo* del tiempo que sobreviven las células (fibroblastos y queratinocitos), lo cual podría realizarse por inmunotransferencia Western Blot, para corroborar que actúan como cubiertas biológicamente activas, favoreciendo la reepitelización y consecuente curación de heridas.

REFERENCIAS

- 1.- Krebsbach P, Kuznetsov S, Bianco P, Gerhon R. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Rev in oral BiolMed.* 1999; 10(2): 165-181.
- 2.- Monteagudo C, Marín M, Habit F, Acasuso I, Colín S. Caracterización clínica de injertos autólogos a partir de fibroblastos gingivales crecidos sobre una matriz biológica para el tratamiento de recesiones gingivales: Reporte de un caso clínico. *Revista Odontológica Mexicana.* 2009; 13: 115-121
- 3.- Martínez J, Muerie M, Garrido R, Domínguez M, Aguirre J. Revisión bibliográfica sobre las nuevas técnicas de ingeniería de tejidos aplicables a la Odontología. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid 2010. Disponible en: <http://biopat.cs.urjc.es/conganat>
- 4.- Padrón K, Dávila L, Salmen S, Berrueta L, Gonzáles E. Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal. *Avances en Biomedicina.* 2012; 1: 4-8
- 5.- González O, Pereira R, Osorio G, Gonzáles J. Obtención y caracterización de un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos. *Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.* 2012; 20(2): 32-41
- 6.- Saczko J, Dominan M, Kulbacka J, Chwilkowska A, Krawczykowska H. A simple and established method of tissue culture of human gingival fibroblasts for gingival augmentation. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2008; 1:117-119
- 7.- González S, Junquera M, Peña I, García V, Gallego L, García E, Meana A. Cultivo in vitro con colágeno y fibroblastos humanos de un equivalente de mucosa oral de espesor total. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial.* 2009; 31: 98-106
- 8.-Marañéz C, Licerias E, Alaminos M, Fernandez R. Generación de un sustituto de mucosa oral humana y comprobación de su viabilidad mediante ingeniería tisular. *CirPediater* 2011; 24: 13-18
- 9.- Arango M, Chamorro C, Restrepo R, Correa L, Henao J. Características Histológicas de piel cultivada in vitro. *Rev Argent Dermatol* 2009; 90: 190-200
- 10.- Tamayo M. *El Proceso de la Investigación Científica.* DF México: Limusa, 2003.
- 11.- Teixeira, A.; Nealey, P.; Murphy, C. Responses of human keratocytes to micronanostructured substrates. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 1;71(3):369-76
- 12.- Alaminos M.; Garzón I.; Sánchez Quevedo M.; Moreu G.; Gonzalez A.; Fernandez M.; Campos A.; Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(5):350-9
- 13.-Sánchez Q, Moreu G, Campos A, García J, González J. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular apithelium. *Histol Histopathol.* 1994; 9(1):149-53.
- 14.- García S. Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. *Cuadernos del Tomás.* 2013; 5: 215-232.
- 15.- Hilmann, G.; Gebert, A.; Geurtsen, W. Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J CellSci.* 1999; 112: 2823-32.