

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

***Biocompatibilidad de células mesenquimales gingivales humanas con una matriz colágena de origen porcino: estudio experimental piloto in vitro***

Alumna: Alejandra P. Chaparro Padilla

Tutor: Mariano Sanz Alonso

***Máster en Ciencias Odontológicas***

***2011/2012***

## TABLA DE CONTENIDOS

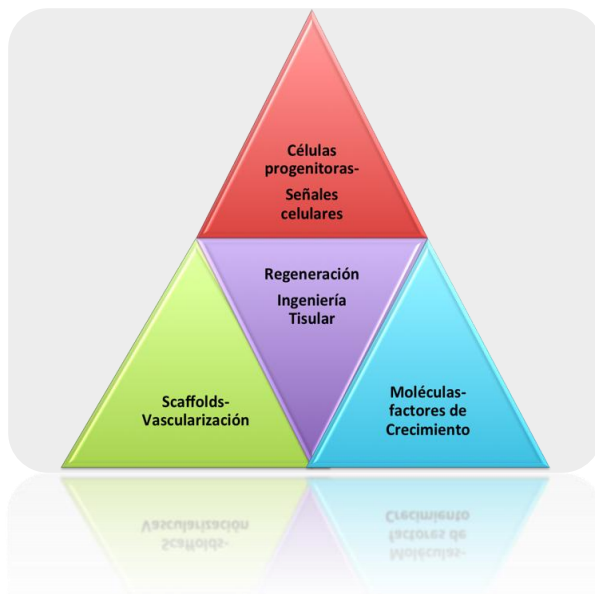
Introducción.....	3
I.tisular/MedicinaRegenerativa.....	6
Problema.....	18
Objetivos	
1. Objetivo general.....	17
2. Objetivo específicos.....	17
Justificación del estudio.....	18
Material y Método.....	19
Resultados.....	35
Discusión.....	41
Conclusión.....	48
Bibliografía.....	49

## INTRODUCCIÓN

El ser humano está constantemente expuesto a agresiones que inducen el daño y/o muerte celular que involucran la destrucción tisular, frente a esto el organismo posee diferentes formas de reparar una lesión y así permitir la preservación de la vida, conservando la integridad anatómica y la eficiencia funcional del órgano o de la estructura dañada.

Dependiendo del órgano afectado y del tipo de lesión, el cuerpo humano responde mediante dos mecanismos mayores: la regeneración tisular que corresponde a la restitución de los tejidos dañados o perdidos *ad integrum*, y la reparación tisular que corresponde a la cicatrización de los tejidos a través del reemplazo del tejido por otro que no restaura totalmente la arquitectura ni la función del tejido original<sup>1,2</sup>. Para que esto ocurra los tejidos requieren fundamentalmente de un adecuado nivel de señales moleculares, una cantidad de células progenitoras que respondan a señales específicas, una apropiada matriz de andamiaje y un correcto aporte sanguíneo<sup>3,4</sup> (Esquema 1).

Esquema 1: Requisitos para lograr regeneración tisular mediante ingeniería tisular



Actualmente, mediante el desarrollo de la ingeniería tisular, se persigue disminuir los inconvenientes y limitaciones asociados al uso de injertos autógenos. La ingeniería tisular ha centrado su investigación en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas previsibles como lo son distintos biomateriales de origen alógeno, xenogénico o sintéticos que estimulen la regeneración y/o la reparación tisular utilizadas como injerto, denominadas matrices<sup>5,6</sup>.

Una matriz con propiedades óptimas debería imitar las características de la matriz extracelular, es decir, constituir un andamiaje tridimensional, que permita que las células viables puedan proliferar sin diseminarse hacia otros sitios y lograr así la regeneración de los tejidos<sup>4</sup>. Idealmente, las matrices debería ser reabsorbibles, pero permanecer integras el tiempo requerido para promover la colonización y proliferación celular así como también adecuadas propiedades mecánicas que otorguen resistencia sin perder su forma y no generar reacción inflamatoria ni alérgicas en el hospedero receptor con el fin de permitir la migración celular, angiogénesis y regeneración tisular<sup>7</sup>.

Las matrices utilizadas en la actualidad pueden ser de origen alogénicas, como son la matriz dérmica acelular y las matrices derivadas de membrana amniótica; otras matrices derivadas de cultivos de fibroblastos en forma de monocapa celular o de componentes proteicos y/o componentes de la matriz extracelular como: colágeno, fibrina o ácido hialurónico. Otra opción son las matrices desarrolladas en forma sintética como: gelatina, polímeros y matrices híbridas, que son combinaciones de productos naturales con sintéticas<sup>6,8,9,10</sup>.

Las matrices se utilizan en el tratamiento de pérdida de sustancia en la piel producidas por traumatismos o quemaduras y también en procedimientos regenerativos del tejido óseo a nivel del periodonto, rebordes óseos atróficos, terapias de cubrimiento radicular y ganancia de encía queratinizada. Su finalidad es acelerar y optimizar la epitelización de las lesiones y con este objetivo se han desarrollado protocolos de investigación que introducen cultivos celulares de queratinocitos o fibroblastos sembrados sobre matrices, permitiendo la obtención de substitutos de piel útiles en la reparación y disminución de la contracción de la lesión, mejorando el pronóstico del tratamiento en forma significativa<sup>11</sup>.

Un elemento importante para la ingeniería tisular es la selección de una adecuada matriz de andamiaje, cuyo objetivo es el transporte y soporte de las células sembradas sobre ella. Una adecuada matriz de andamiaje debe ser biocompatible con las células sembradas como con el área en que será injertada, debe poseer un adecuado tamaño del poro, ser estable y poseer buenas propiedades mecánicas.

Sin embargo, las matrices utilizadas actualmente en terapias regenerativas, presentan el inconveniente de carecer del componente celular-vascular y los resultados clínicos obtenidos en la regeneración tisular son poco predecibles, y con un mayor período de cicatrización en comparación con la utilización de injertos autógenos.

La investigación en terapias regenerativas esta centrada en el estudio de la utilización de diferentes matrices enriquecidas con células estromales mesenquimales multipotenciales, las cuales, poseen un enorme y atractivo potencial terapéutico para lograr la regeneración tisular de los tejidos perdidos o dañados.

La racionalidad de incorporar células mesénquimales estromales multipotenciales se basa en sus características de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular a distintos linajes celulares<sup>12,13</sup>, como también a la síntesis y secreción de moléculas que favorecen la renovación tisular tales como: factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>14,15</sup>. Promoviendo una reparación de alta calidad con regeneración de los tejidos dañados sin formación de tejido fibroso con una mínima morbilidad del sitio donante respuesta inflamatoria y rechazo inmunológico<sup>16,17,18</sup>.

Diversos estudios han demostrado que las células madres mesenquimales pueden ser obtenidas a partir de diferentes tejidos humanos adultos<sup>19</sup>. Recientemente, se publicó un estudio en el cual se logró aislar y caracterizar MSCs a partir de tejido conectivo gingival humano<sup>20</sup>, comprobado su presencia mediante los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), los cuales señalan que las MSCs deben cumplir con lo siguientes parámetros: morfología fibroblastoide, adherencia al plástico (placa) y diferenciación a tres linajes celulares: adiposo, osteogénico y condrogénico y expresión de antígenos específicos de superficie como:

marcaje positivo para los anticuerpos CD13, CD75, CD90 y CD105, y negativo para CD34, CD38 y CD45<sup>21</sup>.

## **Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa**

El termino de ingeniería tisular, fue creado por Fung en 1987, y se refiere a un área interdisciplinaria que se fundamenta en los conocimientos básicos de la histología, biología molecular, bioquímica y la ingeniería de los biomateriales, y que tiene por objetivo la construcción de tejidos nuevos que permitan regenerar, reparar o sustituir el tejido perdido a partir de células procedentes de cultivos y de biomateriales que sirven como soporte<sup>22, 23</sup>.

Esta nueva disciplina nos ofrece la posibilidad de fabricar constructos celulares que podrían servir para el reemplazo de células dañadas o perdidas, y como vehiculo en el tratamiento de lesiones y enfermedades congénitas, traumáticas y crónico-degenerativas<sup>24</sup>.

La evidencia científica establece que la terapia celular y la medicina regenerativa investigan nuevas estrategias terapéuticas en la reparación y el trasplante de órganos y tejidos, y es una línea de investigación que puede proporcionar soluciones terapéuticas a diversas enfermedades que hoy no tienen tratamiento<sup>24</sup>.

Por lo tanto la ingeniería tisular requiere del aporte de otras disciplinas fundamentales que ayudan al logro final del objetivo propuesto, el cual corresponde a la construcción de un nuevo tejido vivo funcional capaz de sustituir con eficacia original dañado<sup>22</sup>.

En la actualidad la ingeniería tisular se puede llevar a cabo utilizando tres tipos de estrategias diferentes:

- **Ingeniería tisular por transferencia celular (terapia celular):** las células son aisladas, mantenidas y tratadas in vitro. Posteriormente se inyectan en la circulación sanguínea o se implantan en determinadas localizaciones del organismo para poder suplir la deficiencia estructural o funcional que en ese tipo de células se hubiera podido producir.
- **Ingeniería tisular por inducción:** consiste en la construcción de un nuevo tejido, por medio de la inducción del tejido dentro de nuestro propio organismo. Para ello, existen diversas posibilidades de actuación. En primer lugar, la acción mas elemental de todas consiste en la utilización de aquellas señales moleculares fundamentalmente, los factores de crecimiento, que son capaces de estimular a las células madre pluripotenciales o células madres progenitoras existentes en la zona en la que deseamos crear el nuevo tejido, con el objeto de potenciar su proliferación, diferenciación y distribución en el espacio y en el tiempo. La incorporación de las señales moleculares a la región puede realizarse directamente o mediante la transferencia de células capaces de sintetizar dichos factores. La matriz extracelular, como producto natural o biomaterial elaborado de modo artificial, posee la propiedad de inducir la formación de nuevos tejidos. Finalmente, en algunos casos se utilizan biomateriales y señales moleculares para inducir la construcción de algunos tejidos. En estos casos, el biomaterial actúa como barrera creando espacio para facilitar el posterior crecimiento expansivo del nuevo tejido. Este mecanismo de ingeniería tisular es denominado Regeneración Tisular



Guiada que se practica como tratamiento de las secuelas de la enfermedad periodontal<sup>24</sup>.

- **Ingeniería tisular por elaboración de constructos:** consiste en la formación de un constructo formado en un dispositivo denominado birreactor, de tres elementos básicos: la célula, el biomaterial y los factores de crecimiento, que suelen utilizarse para construir un tejido artificial. Con el fin de elaborar un constructo es necesario aislar las células del organismo y situarlas, junto a los factores de crecimiento, sobre o dentro del biomaterial más adecuado en relación con el tejido u órgano que se desee construir. Para la elaboración de constructos se utilizan modelos con un solo tipo celular y un tipo de biomaterial. El diseño y la elaboración de constructos por ingeniería tisular para uso clínico debe intentar conseguir: la naturaleza estructural y funcional de los tejidos perdidos, obtener tamaños y las formas deseadas, posibilidad de continuar su desarrollo una vez implantado in vivo y la posibilidad de integrarse en el huésped<sup>24</sup>.

Por lo tanto, crear estructuras tridimensionales que deben funcionar como sustituto biológico, al imitar y repetir la estructura y función del tejido perdido<sup>23</sup>.

La construcción de tejidos buco dentales artificiales gracias a la ingeniería tisular ha sido objeto de especial interés en los últimos años, con el fin de su utilización en la terapéutica odontológica. En este sentido se ha aplicado la ingeniería tisular por inducción para la regeneración del periodonto y la ingeniería tisular por elaboración de constructos para crear sustitutos de mucosa bucal<sup>24</sup>.

Los resultados clínicos de la ingeniería tisular en la mucosa bucal han sido satisfactorios<sup>25,26</sup>. Se ha demostrado que el uso de células sembradas en matrices mejoraría la adherencia del injerto, maduración, reduciendo al mínimo la contracción de la herida y formación de cicatrices<sup>27</sup>.

Para alcanzar una reparación tisular estable y exitosa deben ocurrir<sup>28</sup>:

- Generar un número adecuado de células para llenar el defecto a reparar.
- Diferenciación celular hacia el fenotipo adecuado.
- Que las células adopten una organización tridimensional.
- Que las células sean estructuralmente y mecánicamente compatibles con las exigencias del tejido nativo.
- Lograr la integración con el tejido local y vascularización.
- Superar el riesgo de rechazo inmunológico.

La habilidad de algunos tejidos en el adulto para repararse indicaría la presencia de células madres progenitoras<sup>29</sup>, como la capacidad que posee la mucosa oral para reparar en ausencia de cicatriz, reflejado en una respuesta inflamatoria reducida. Por lo tanto surge la modalidad de aislar células madres mesenquimales de distintos tejidos adultos, como medula ósea, tejido pulpar y a partir de tejido conjuntivo gingival.

## **Células Madres**

Las células madres son la base celular de todos los órganos y tejidos del cuerpo. Son células indiferenciadas que presentan la capacidad de auto renovarse generando copias idénticas de ellas mismas a través de división mitótica debido a su alto potencial proliferativo, y la capacidad de diferenciarse en tipos celulares específicos con el fin de cumplir cierta función en el organismo<sup>22</sup>. El potencial de autorrenovación y diferenciación que poseen las células madres, esta gobernado por señales extracelulares en conjunto con cascadas de señales intracelulares<sup>30,31</sup>.

### *Clasificación de las Células Madres*

Las células madres pueden clasificarse dependiendo de su capacidad de proliferación y potencial de diferenciación en: totipotenciales que corresponden a células que tienen el potencial de dar origen a un organismo completo incluyendo el tejido germinal; pluripotenciales que corresponden a células que pueden dar origen a células de las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo; y multipotenciales que son células comprometidas en una línea celular específica y dan origen a células de un órgano o tejido particular<sup>32</sup>.

Las Células Madres pueden también clasificarse de acuerdo con su origen en Células Madres Embrionarias, que se obtienen de la masa celular interna del embrión, Células Madres Germinales Embrionarias, que se obtienen de la cresta gonadal del feto y Células Madres Adultas, que se originan de tejidos adultos maduros. Cada uno de estos tipos celulares tiene características

diferentes y por lo tanto dependiendo de las circunstancias, ventajas o desventajas, frente a las demás<sup>33</sup>.

Las células madres Adultas denominadas Celulas Madres Mesenquimales (MSCs) se consideran órgano-específicas y se localizan en tejidos embrionarios y fetales además se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos adultos, y derivan de tejidos que se encuentran en constante renovación como la dermis<sup>34</sup>, sangre periférica y epitelio gastrointestinal entre otros. Es así como son las encargadas de mantener los tejidos o repararlos mediante el reemplazo de células que se han perdido o se encuentran dañadas<sup>30</sup>.

Las células madres mesenquimales son fácilmente accesibles siendo las de elección para estudios de regeneración, ya que no poseen problemas éticos para su obtención<sup>22</sup>.

#### *Células Madres Mesenquimales*

Las células madres mesenquimales son definidas como células multipotenciales que deben cumplir según Dominici et al.<sup>19</sup> tres criterios: Adherencia al plástico, diferenciación in Vitro a tejido adiposo, osteogénico, condrogénico, y expresión específica a ciertos marcadores donde debe ser positivo a CD73, CD90, CD105 y negativas a CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR.

Son una población de células que proliferan *in vitro* adheridas a una superficie plástica<sup>22</sup>. Morfológicamente presenta una forma fusiforme, fibroblastoide, con un núcleo alargado central<sup>19</sup>.

Las células madres mesenquimales sufren una división asimétrica, una diferenciación hacia una célula en estado terminal y la formación de una réplica de la célula mesenquimal.

Las MSCs son generalmente definidas como células clonogénicas capaces de autorenovarse como también de diferenciarse en múltiples linajes celulares como a tejido osteogénico, condrogénica, y adipogénico bajo medios específicos de diferenciación<sup>32,33</sup>.

Las MSCs poseen características importantes que permiten distinguirlas de las células ya diferenciadas, tales como:

- Capacidad de auto renovación, definida como la capacidad de dar origen a células con las mismas características que la célula de origen y manteniéndola indiferenciada.
- Lenta actividad del ciclo celular, permitiendo conservar el potencial proliferativo celular y minimizando errores en la replicación del DNA<sup>33</sup>.
- Las MSCs provenientes de la médula ósea, pueden diferenciarse en condrocitos, osteocitos y adipocitos. También hay evidencia que estas células derivadas del estroma de la médula ósea pueden diferenciarse en células derivadas del endodermo y/o del ectodermo incluyendo células hepáticas y astrositos<sup>34,35,36</sup>.
- Las MSCs poseen la capacidad de autorenovarse, proceso denominado como plasticidad celular. Además poseen la capacidad de diferenciarse *in vivo* en células del tejido de origen y de otros tejidos distintos a éste<sup>37</sup>.

Las células madres mesenquimales residuales una vez terminada la morfogénesis, permanecen en varios tejidos craneofaciales, y conservan su

condición de células madres<sup>38</sup>. En tejidos maduros estas MSCs poseen una gran capacidad de desarrollo y juegan un rol importante en la homeostasis y reparación de los tejidos frente a una lesión o enfermedad<sup>38</sup>.

Además se ha descrito que en la mucosa bucal las células de estrato basal poseen la capacidad de dividirse, mediante mitosis lo que permitiría el proceso de renovación epitelial a partir de células madres<sup>21</sup>. Por lo tanto este estrato se renueva y se lo puede considerar el compartimento de células progenitoras del epitelio<sup>39</sup>.

Las MSCs obtenidas a partir de tejido gingival humano son una población de tipo heterogénea, esto se refiere a que además de poseer células madres mesenquimales podrían encontrarse otros tipos celulares, como son los fibroblastos. Con el fin de realizar una caracterización específica Simmons et al.<sup>40</sup> reportaron la caracterización de una subpoblación de células madres provenientes de médula ósea con un marcador de superficie denominado STRO-1, exclusivo para MSCs<sup>42</sup>.

Con el objetivo de lograr la recuperación de los tejidos blandos gingivales perdidos, se utilizan las técnicas de cirugía plástica periodontal o mucogingival, ampliamente utilizadas con una variedad de indicaciones<sup>43,44</sup>. Para ello, las técnicas más comúnmente empleadas incluyen la utilización de injertos autógenos gingivales libres o de tejido conjuntivo sub-epitelial en forma combinada con colgajos de espesor parcial o total, con o sin desplazamiento de los colgajos y están indicados en situaciones clínicas en las que se requiere lograr cobertura radicular, aumento de encía queratinizada, volumen de rebordes óseos colapsados y manejo de rebordes post-extracción<sup>45</sup>.

Si bien estos procedimientos son predecibles, dado que las células provienen de la misma persona, y por tanto no existe rechazo, presentan varios inconvenientes, entre los que destaca el hecho que el paciente es sometido a un procedimiento quirúrgico adicional, aumentando los tiempos quirúrgicos, morbilidad del sitio donante y un postoperatorio doloroso<sup>46-49</sup>.

Además, el injerto se toma de la zona del área del paladar, que implica riesgos adicionales debido a la localización de vasos sanguíneos y nervios que limitan el tamaño del potencial injerto<sup>49,50</sup> y por lo tanto no son capaces de cubrir las demandas en aquellas situaciones clínicas que se requieren cubrir recesiones gingivales múltiples<sup>51</sup>.

El colágeno es un componente de la matriz extracelular y ha sido investigado como un constituyente de las matrices con estructura tridimensional que puedan permitir la incorporación de células en cultivo al interior de la matriz. El colágeno se encuentra en cada tejido conectivo y es responsable de la resistencia y estabilidad de los tejidos. Los productos de colágeno han sido utilizados como membranas en regeneración ósea guiada, en regeneración tisular guiada, en el manejo de alveolos post extracción y recientemente para el aumento de encía queratinizada<sup>52-58</sup>.

La principal ventaja de las matrices es la conformación del andamio, con una organización similar al tejido dérmico nativo y que conservan parte de su membrana basal. Sin embargo, presentan algunas desventajas importantes, una de ellas es la posibilidad de generar rechazo debido a su origen alogénico,

xenogénico, o a la presencia de restos celulares que a menudo son difíciles de eliminar.

Recientemente, una nueva matriz colágena de origen porcino (Mucograft®) ha sido producida por Geistlich Pharma AG (Wolhusen, Switzerland) y los fabricantes indican que es un producto seguro según la normativa ISO 14971- ISO 10993-1, con buenas propiedades de estabilidad mecánica, comportamiento biológico favorable y tratada químicamente con un proceso de entrecruzamiento del colágeno que disminuiría su tasa de degradación al interior del tejido hospedero.

El Mucograft® es un producto reabsorbible de características tridimensionales y su estructura consiste en dos capas funcionales distintas; una capa oclusiva celular consistente en fibras colágenas de disposición compacta y otra capa porosa y esponjosa gruesa que tiene el objetivo de crear un espacio de espesor adecuado para una mayor formación de tejido queratinizado y para la formación y estabilización del coagulo sanguíneo que permitan la colonización de fibroblastos, vasos sanguíneos y del epitelio de los tejidos circundantes, que eventualmente se transformarán en tejido queratinizado.

Esta matriz tridimensional está siendo investigada en la actualidad para las terapias de aumento de encía adherida y en el cubrimiento radicular de recesiones gingivales como alternativa al injerto conectivo autógeno. Los resultados tanto en animales como en estudios clínicos en humanos son promisorios<sup>58,59,60</sup>. Sin embargo, esta matriz, no ha sido investigada como un andamio biocompatible para células mesénquimales estromales multipotenciales.



El grupo de Sanz. M y cols, han publicado 3 estudios clínicos que demuestran la efectividad de la matriz Mucograft® en las terapias de aumento de encía queratinizada en relación a piezas dentarias e implantes, como también su utilidad para la terapia mucogingival de cubrimiento de recesiones combinado con la técnica de colgajo desplazado a coronario al compararlo con las técnicas combinadas con injerto conectivo palatino<sup>58,60</sup>.

Nevins y cols<sup>73</sup>. evaluaron la seguridad y eficacia de MG como alternativa a un injerto gingival autógeno para incrementar encía queratinizada. Se realizó un estudio piloto de diseño boca partida con pacientes periodontalmente sanos, con un ancho de encía queratinizada <2mm bilateralmente en la cara vestibular de piezas dentarias postero-inferiores. Se realizaron biopsias de la zona intervenidas a las 13 semanas. El cambio de la EQ postoperatoria fue de 3.1mm para injerto gingival libre y de 2.3mm para MG. El contorno del tejido, color y textura en la terapia con MG fue optima, mientras que para el injerto gingival, se observaron bordes demarcando el área tratada. El estudio sugiere al Mucograft® como una alternativa viable al injerto gingival libre para el aumento de encía queratinizada.

El objetivo de este estudio es analizar la biocompatibilidad de una matriz colágena porcina (Mucograft®) como andamio para el transporte de células madre mesénquimales aisladas de tejido gingival humano conformando un scaffold híbrido in vitro, evaluando la viabilidad y proliferación de las células progenitoras al interior de la matriz tridimensional.

**PROBLEMA:**

¿Es el Mucograft® un andamiaje biocompatible para células mesénquimales gingivales humanas?

**OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la biocompatibilidad de una matriz colágena de origen porcino (Mucograft®) como andamio de células mesénquimales humanas de origen gingival para su utilización en terapias de regeneración tisular de los tejidos gingivales.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Aislar y caracterizar células mesénquimales de origen gingival humano mediante técnica de cultivo celular.
- Evaluar in vitro la viabilidad, proliferación y potencial de diferenciación de las células madres mesénquimales de origen gingival humano sembradas en Mucograft® en cultivo.

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En la actualidad lograr la regeneración de los tejidos blandos mediante el uso de células madres mesenquimales (MSCs) e Ingeniería Tisular es un desafío para la ciencia odontológica. En este contexto, estudiar las propiedades de las MSCs obtenidas a partir de tejido conectivo gingival humano sembradas en distintos andamios es imprescindible para determinar la eficacia que posee este tipo de terapia celular en la regeneración tisular. Dentro de las ventajas que poseen las células mesenquimales se incluyen: permite una reparación de alta calidad con regeneración de tejidos dañados sin formación de tejido fibroso, la morbilidad del sitio donante es mínima comparado con el injerto autógeno (proveniente del mismo individuo), dado que se requiere de un número reducido de células para su subsecuente expansión ex vivo, el riesgo de rechazo por una respuesta inmune así como la transmisión de enfermedades parece ser mínima. Además las células madres mesenquimales tienen alto potencial proliferativo y pueden ser manipuladas permitiendo su diferenciación previa a su trasplante.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Protocolo de aislamiento y caracterización de células mesénquimales estromales multipotenciales de origen gingival:**

Se obtuvieron muestras de tejido gingival de donantes voluntarios con indicación de técnicas resectivas de tejido gingival sano previa firma de consentimiento informado. Un periodoncista calificado realizó el procedimiento quirúrgico para lo cual el paciente fue anestesiado con anestesia tópica por 1 minuto y luego con anestesia local al 2% mediante técnica infiltrativa, previa desinfección con colutorio de Clorhexidina al 0,12%. El tejido gingival obtenido de dimensiones aproximadas a 3 x 1 x 1 mm. En los casos que así lo requirieron se realizó sutura en el sitio donante y se entregaron por escrito las indicaciones de cuidados post operatorios al paciente para el manejo de las posibles molestias.

El explante de tejido gingival fue introducido en forma inmediata en un tubo Eppendorf® con 2 ml de Medio de transporte, consistente en una solución estéril de 15 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) de GIBCO® 1x, con 1 ml de Pen Strep (Penicilina/Estreptomicina) de GIBCO® y trasladado al laboratorio de investigación en un rango de tiempo menor a 2 horas para iniciar la fase de cultivo celular.

### **Protocolo de obtención y cultivo de células mesenquimales gingivales:**

- Preparación de una solución de 2ml que contenga 3mg/ml de colagenasa tipo I( # CO130-100 mg) y 200 ul de Dispasa 4mg/ml en DMEM F12 (2ml volumen total).
- Lavar el tejido gingival con PBS 1x
- Introducir el explante de tejido gingival por 30 minutos en esta solución en agitación constante y a 37°C a 400rpm el agitador.
- Una vez disuelto el tejido, filtrar en un tubo Falcon de 50ml con un filtro de 70um la solución con el tejido.
- Centrifugar esto en un tubo Falcon de 10ml 5 minutos a 1200 rpm
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1ml de medio DMEM F12
- Cambiar el medio de cultivo cada 4 días

### Protocolo de expansión celular

Una vez que se observó mediante Microscopía Óptica un 80% de confluencia celular de las MSCs, se realizó el protocolo de tripsinización bajo campana de flujo cuyo objetivo es despegar las MSCs del plástico (placa) para permitir el lavado y el conteo celular. Este procedimiento consiste en eliminar el Medio de Cultivo, introducir 400 µl de Tripsina 1x TripleSec GIBCO®, agitar suavemente la placa y dejar incubar en estufa cultivo SANYO® a 37°C y 5% de CO2 por 5 minutos aproximadamente.

Se debe observar en el microscopio óptico que las MSCs se encuentren con una morfología redondeada, en suspensión en el medio de cultivo, lo que demuestra que las células se desprenden del plástico y que al cultivarlas deben adoptar su morfología fibroblastoide original. Una vez que se ha comprobado que las MSCs se despegan del plástico (placa), se procede a inactivar la Tripsina 1x TripleSec de GIBCO® con 400 µl de Medio Completo.

#### Caracterización Inmunofenotípica

Las MSCs gingivales humanas en pasaje celular 4, fueron caracterizadas mediante Citometría de flujo (Coulter ® Epics®, XL<sup>tm</sup>, Beckmann Coulter) utilizando marcadores con fluorescein isothiocyanate-(FITC), phycoerytrin- (PE) y peridinin chlorophyll protein (PerCP) que presentaron mayor porcentaje de positividad y con anticuerpos conjugados contra CD 13 (Caltag), CD 34(Beckmann Coulter), CD38 (Immunotech), CD 44(Caltag), CD 45(Beckmann Coulter), CD 54(Caltag), CD 73 (BD Pharmingen), CD 90(BD Pharmingen), CD 105 (Caltag). Se tripsinizaron las MSCs y centrifugaron a 1700 r.p.m. durante 7 minutos.

- 1) Una vez obtenido el pellet se procedió al conteo celular para su tipificación.
- 2) Se incubaron 200.000 cel/tubo a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>
- 3) Se lavan las células con 3 ml de PBS 1x y se volvió a centrifugar a 1700 r.p.m. por 6 minutos.

- 4) Se eliminó el sobrenadante y se agregaron los anticuerpos según la siguiente tabla:

Tabla N°1: Cantidad de Anticuerpos

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
<b>1</b>	IgG1 → 8 µl	IgG2 → 8 µl	CD 13 → 3 µl
<b>2</b>	CD 90 → 3 µl	CD 73 → 10 µl	CD 13 → 3 µl
<b>3</b>	CD 45 → 10 µl	CD 34 → 10 µl	CD 13 → 3 µl
<b>4</b>	CD 38 → 10 µl	CD 105 → 3 µl	CD 13 → 3 µl

- 5) Se resuspende el tubo y se deja incubar por 30 minutos a 4° C y oscuridad.
- 6) Las células se lavan dos veces con PBS 1x de GIBCO®.
- 7) Mediante centrifugación a 1680 r.p.m. durante 6 minutos se obtiene un pellet, se elimina el sobrenadante, se resuspende y se agrega 500 µl de PBS paraformaldehído 1%.
- 8) Se resuspenden nuevamente y se analizan las subpoblaciones utilizando el programa Coulter® Epics® XL<sup>tm</sup>. 10.000 células por muestra, registrándose tanto los porcentajes así como las intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador.
- 9) Cada marcador fue contrarrestado con su isotipo correspondiente.

### Potencial de Diferenciación

Las células madres mesenquimales debido a su plasticidad son capaces de diferenciarse en tres linajes que corresponden a tejido adiposo, osteogénico y condrogénico. Por lo tanto una vez obtenidas las MSCs en pasaje 4 con un 80% de confluencia fueron sembradas en 3 placas diferentes con sus respectivos controles negativos y se indujeron a diferenciación a tejido adiposo, condrogénico y osteogénico durante un periodo de 3 semanas aproximadamente. Durante el proceso de diferenciación se renovó el medio de diferenciación y control cada 3 días.

#### **Diferenciación Adipogénica:**

Bajo campana de flujo se sembraron en 2 pocillos de una placa de 4 NUNC® (1.9cm<sup>2</sup>), una densidad 25.000 células/cm<sup>2</sup> con 500 µl de medio completo y se incubo en estufa SANYO® a 37°C Y 5% CO<sub>2</sub>. Al alcanzar un 100% de confluencia se eliminó suavemente el contenido de ambos pocillos. Al pocillo de diferenciación se le agregará 500 µl de Medio Diferenciación Adipogénica que contiene 10 ml de Medio Completo (44 ml α-MEM GIBCO®, 6 ml de Suero Fetal Bovino 10% y 1 ml Pen Strep 1% de GIBCO®), 0,1 µm de Dexametasona, 10 µg/ml de Insulina y 0,02mg/ml Indometacina. Al pocillo control se le agregó 500 µl Medio Completo. Se mantendrán incubadas en estufa SANYO® a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Se renovará el medio cada 3 días. donde se eliminará el contenido por la orilla del pocillo mediante pipeta, para luego agregar suavemente por la orilla del pocillo de diferenciación 500 µl de Medio de Diferenciación y al pocillo control 500 µl de Medio Completo.



### **Diferenciación Osteogénica:**

Bajo campana de flujo se sembraron en 2 pocillos de una placa de 4 NUNC® (Vol. 1.9cm<sup>2</sup>), una densidad 35.000 células/cm<sup>2</sup> con 500 µl de medio completo y se incubo en estufa SANYO® a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Al alcanzar el 100% de confluencia, se eliminó suavemente el contenido de ambos pocillos. Al pocillo de diferenciación se le agregará 500 µl de Medio Diferenciación constituido por: 5 ml de Medio Completo (44 ml α-MEM GIBCO®, 6 ml de Suero Fetal Bovino 10% y 1 ml Pen Strep 1% de GIBCO®), 0,1 µm de Dexametasona y 10 mM b-glicerofosfato. Durante todo el proceso de diferenciación se agregará día por medio al pocillo de diferenciación 0,5 µL de Ascorbato 2- fosfato. Al pocillo control se le agregarán 500 µl Medio Completo. Se mantuvieron incubadas en estufa SANYO® a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Se renovará el medio cada 3 días. donde se eliminará el contenido por la orilla del pocillo mediante pipeta BIODETTE®, para luego agregar suavemente por la orilla del pocillo de diferenciación 500 µl de Medio de Diferenciación y al pocillo control 500 µl de Medio Completo.

### **Diferenciación Condrogénica:**

Bajo campana de flujo se sembraron en 2 pocillos de una placa de 4 NUNC® (Vol. 1.9cm<sup>2</sup>), una densidad 30.000 células/cm<sup>2</sup> en forma de microgota con 500 µl de medio completo y se incubará en estufa SANYO® a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Al alcanzar el 100% de confluencia, se eliminará suavemente por la orilla, el contenido de ambos pocillos. Al pocillo de diferenciación se le agregarán, suavemente por la orilla del pocillo, 500 µl de Medio Diferenciación constituido por: 10 ml de Medio Completo (44 ml α-MEM GIBCO®, 6 ml de Suero Fetal Bovino 10% y 1 ml Pen Strep 1% de GIBCO®), 0,1 µM

Dexametasona y 5 ug/ml de Insulina. Durante todo el proceso de diferenciación se agregará día por medio al pocillo de diferenciación 0,5 µL de Ascorbato 2-fosfato y 0,1 µL TGF-B1. Al pocillo control se le agregará 500 µl Medio Completo. Se mantendrán incubadas en estufa SANYO® a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Se renovará el medio cada 3 días. donde se eliminará el contenido por la orilla del pocillo mediante pipeta BIODETTE®, para luego agregar suavemente por la orilla del pocillo de diferenciación 500 µl de Medio de Diferenciación y al pocillo control 500 µl de Medio Completo.

#### Protocolo de Tinción de Diferenciación

Cada linaje Adipogénico, Condrogénico y Osteogénico por separado se teñirán con Oil Red, Safranina O y Alizarin Red respectivamente. Este procedimiento se debe realizar fuera de campana con guantes y delantal.

#### Tinción de Diferenciación Adipogénica con Oil Red:

Para preparar la tinción de Oil Red se agregó una solución de Isopropanol 60% v/v hasta generar una solución saturada. Luego se debe remover mediante pipeta el medio de cultivo de diferenciación y control, sin tocar el centro del pocillo. Luego se lavaron dos veces los pocillos agregando suavemente por la orilla 500 µl PBS 1x de GIBCO® y se eliminó el sobrenadante de PBS, ya que éste no permite teñir la muestra. Para teñir se debe primero fijar la muestra, pero en este caso la tinción de Oil Red trae incluido el fijador. Por lo tanto se agregan 250 µl de Oil Red a ambos pocillos (Control y Diferenciación) y se debe esperar una hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavó 2 veces con PBS 1x GIBCO®.

#### Tinción de Diferenciación Osteogénica con Alizarin Red:

La Tinción de Alizarin Red está constituida por una solución de Alizarin Red 40 Nm disueltos en 0,1 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> con un pH 4,3. Luego se debe descartar el medio de cultivo de diferenciación y control, sin tocar el centro del pocillo. Luego se lavan 2 veces los pocillos agregando suavemente por la orilla 500 µl PBS 1x de GIBCO® y eliminando el sobrenadante. Luego la muestra se fijó agregando 250 µl de Etanol al 70%, a ambos pocillos, durante 30 minutos. Una vez fijadas las muestras se procedió a lavarlas 2 veces con 250 µl PBS 1x de GIBCO® y luego las muestra fueron teñidas agregando 250 µl de Alizarin Red, a ambos pocillos, durante 10 minutos. Finalmente, se lava 5 veces con 250 µl de agua Bidestilada.

#### Tinción de Diferenciación Condrogénica con Safranina O:

La tinción de Safranina O se prepara al 0,1% pp. Se debe aspirar el medio de cultivo por la orilla del pocillo de diferenciación y control, sin tocar el centro del pocillo. Luego lavar una vez los pocillos agregando suavemente por la orilla 500 µl PBS 1x de GIBCO® y eliminar el sobrenadante. Luego fijar la muestra agregando 250 µl de Etanol al 70%, a ambos pocillos, durante 10 minutos. Una vez fijadas las muestras se procede a lavarlas una vez con 250 µl PBS 1x de GIBCO® y luego teñir las muestras agregando 300 µl de Safranina O, a ambos pocillos, durante 5 minutos. Finalmente se lavará una vez con 250 µl de agua Destilada, luego 5 veces con 250 µl de Etanol al 70% y una vez con 250 µl de Etanol al 100%.

Una vez caracterizadas las células mesénquimales estromales multipotenciales, con una apropiada densidad y confluencia celular entre un 80-100% se realizarán estudios de viabilidad y proliferación celular de las GMSCs al interior de la matriz de Mucograft® mediante el ensayo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por François Denizot y Rita Lang. Con el objetivo de determinar el porcentaje de células que son retenidas por la matriz y su viabilidad.

#### **Protocolo MTT:**

##### **ETAPA A.**

- En una placa de 96 pocillos, cargar las tres primeras filas de la placa con 100ul de medio de cultivo DMEM F12.
- Bajo condiciones de esterilidad en la campana se abre el paquete con la matriz de Mucograft® y con una hoja de bisturí estéril número 11 se parte en 2 trozos iguales.
- El mucograft se introduce en un pocillo de una placa de 24 pocillos con 1ml de medio de cultivo. Los pocillos circundantes se les agrega 1ml de

PBS 1x, para evitar la deshidratación del pocillo que contiene el Mucograft® y medio de cultivo.

- Al pocillo con Mucograft y medio se le agregan 100ul de MTT y se incuban por una hora a 37°C y CO<sub>2</sub>. (no tiene células, es el control negativo del próximo experimento).
- Se fabrica una curva patrón en las primeras filas de la placa de 96 pocillos a la cual al primer pocillo se le agregan 1.000.000 de células en 200ul de medio de cultivo, re suspendo 10 veces, de estos tomo 100ul y los paso al segundo pocillo re suspendiendo 10 veces nuevamente y así sucesivamente hasta terminar con los pocillos de cada una de las dos primeras filas. ( se genera una curva que va entre 500.000 células en el primer pocillo, 250.000 en el segundo, 125.000 en el tercero, 62.500 en el cuarto, 31.250, 15.620, 7.810, 3.900, 1.950, 970, 480 sucesivamente hasta llegar a 240 células en el pocillo número 12).
- Se agregan 100ul de medio de cultivo DMEM F12 a cada pocillo.
- La tercera fila sólo tiene medio de cultivo como control negativo.
- A cada pocillo se agregan 20ul de MTT y la placa se deja incubando una hora a 37°C y CO<sub>2</sub>.
- Tomamos 200ul del medio de cultivo con Mucograft y MTT y se colocan en un pocillo vacío de la placa de 96 pocillos.
- Se lee la placa en un espectrofotómetro a 540nm.

## ETAPA B.

- Se cuentan con 4.500.000 células resuspendidas en 50ul de medio de cultivo.
- Bajo condiciones de esterilidad en la campana se abre el paquete con la matriz de Mucograft® y con una hoja de bisturí estéril número 11 se parte en 2 trozos iguales.
- Con 1 jeringa de tuberculina se aspiran los 50ul de medio con células y se inyectan en la matriz de mucograft en un pocillo de una placa de 24 pocillos.
- El otro trozo se inyecta con medio de cultivo como control negativo en otro pocillo de la placa de 24 pocillos.
- Se incuban 1 hora a 37°C y CO<sub>2</sub>.
- A los 60 minutos, se cambia el Mucograft a un nuevo pocillo y se agregan 1ml de medio de cultivo DMEM F12 al pocillo original donde se incubó el Mucograft y 1ml de medio al nuevo pocillo que contiene la matriz. Se realizó exactamente el mismo procedimiento para el pocillo que con tiene la matriz de Mucograft con medio de cultivo como control negativo.
- Se agregan 100ul de MTT, se incuba la placa durante una hora a 37°C y CO<sub>2</sub>.
- Tomamos 200ul de cada pocillo y condición estudiada y se traspasan a una placa de 96 pocillos y se lee a 540nm en un espectrofotómetro.

## **PROTOCOLO CULTIVO GMSCs EN LA MATRIZ MUCOGRAFT®:**

- Se cuentan con 4.500.000 de células resuspendidos en 50ul de medio de cultivo DMEM F12.
- Bajo condiciones de esterilidad en la campana se abre el paquete con la matriz de Mucograft® y con una hoja de bisturí estéril número 11 se parte en 2 trozos iguales.
- Con 1 jeringa de tuberculina se aspiran los 50ul de medio con células y se inyectan en la matriz de mucograft en un pocillo de una placa de 24 pocillos.
- Se dejan en cultivo en un pocillo con 2ml de medio DMEM F12 en incubadora a 37°C por una semana y se cambia el medio de cultivo cada tres días.

Con las células obtenidas del cultivo celular con la matriz de Mucograft se realizaron las pruebas de diferenciación hacia los linajes osteoblasto, condrocito y adipogénico con el objetivo de comprobar que mantienen intactas sus propiedades de células mesénquimales estromales multipotenciales.

Adicionalmente se analizó la presencia de las GMSCs al interior de la matriz tridimensional de Mucograft® mediante técnicas de microscopía e inmuno-fluorescencia con células mesénquimales gingivales marcadas con tinción de DAPI que es un agente intercalante del ADN que se une a los núcleos celulares resultando en una fluorescencia azul .

### **Protocolo de fijación de la matriz:**

La matriz con células en su interior fue fijada formalina al 10% durante 24 horas la muestra fue enviada a un laboratorio de histología para su inclusión en parafina, cortas y tinción con hemotosilina-eosina.

### **Desparafinización e hidratación de la muestra:**

Se realizaron los siguientes lavados

- 1.- Xilol 2 x 10 min
- 2.- Etanol 100 % 2 x 5 min
- 3.- Etanol 96 % 2 x 5 min
- 4.- Etanol 80 % 2 x 5 min
- 5.- Etanol 70 % 2 x 5 min
- 6.- PBS - 1 x 5 min

Las muestras fueron Desparafinadas en xileno (2 x 5 min) y rehidratadas en serie de distintas concentraciones de etanol (absoluto, 95% durante 5 min, 70%, 30% de etanol, d H 2O durante 3 min), La muestra fue lavada con una solución tampón McIlvaine (5 min). Se escurren los portaobjetos en una toalla de papel y se aplica la solución de tinción DAPI en portaobjetos (200 l), se incuba por 15 minutos en la oscuridad (cubrir con una caja).

### DAPI de archivo de la solución (5mg/ml o mM 14,3):

DAPI (Molecular Probes, Cat # D-1306) ----- 10 mg

Dimetilformamida (DMF) ----- 2 ml

Se mezcla para disolver. Se alícuota y almacena a -20 ° C.



DAPI de Trabajo de la solución (100ng/ml o 300 nM en PBS):

DAPI solución madre ----- 2 ul

PBS ----- 100 ml

La solución se almacena a 4°C en una botella de color marrón o envuelto con papel de aluminio para protegerlo de la luz (para lograr una mayor tinción, utilice 4 ul de solución madre o reducir la cantidad de PBS a 50 ml). Se debe observar con fluorescencia (excitación: 340-380 nm, la supresión de: 430 nm) y se tomaron fotografías como para otras técnicas fluorescentes con la cámara y software incorporados al microscopio.

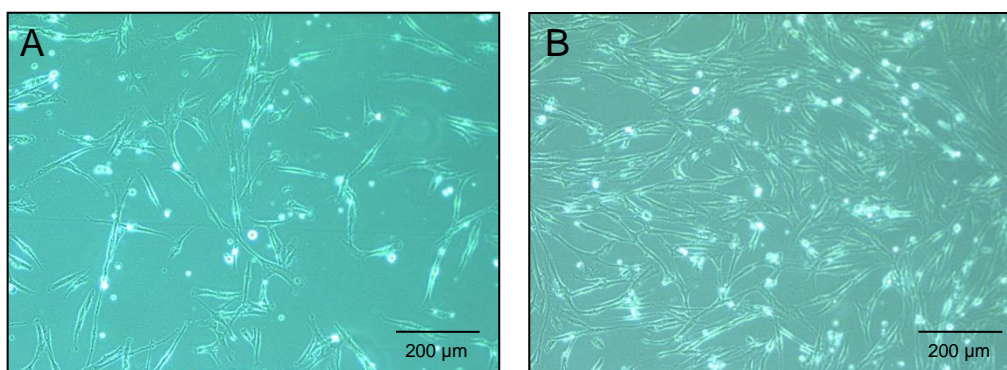
**ANALISIS ESTADÍSTICO:**

Se describió la variable absorbancia del MTT (continua) para el ensayo de proliferación y viabilidad de las GMSCs con medidas de tendencia central, dispersión y posición por concentración de células, según grupo al que pertenecía (Control/Mucograft), se compararon dos grupos a iguales concentraciones celulares: grupo a: sólo GMSCs en medio para concentración y grupo B: consistente en idénticas concentraciones celulares pero cultivadas con la matriz de Mucograft. Por otra parte, se describió la absorbancia del MTT en ambos grupos, independiente de la concentración de células, presentándose ambas comparaciones con gráficos de caja.

Se evaluó a través de un modelo de regresión lineal de efectos mixtos las diferencias de las medias de absorbancia del MTT entre grupo control y Mucograft ya que las mediciones se encuentran anidadas por las replicaciones, pero no se confirmó el supuesto de normalidad de los errores posterior a la regresión. Se evaluó la mejor transformación de la variable absorbancia, que resultó ser la raíz cuadrada de esta, pero tampoco se logró confirmar la normalidad de los errores, por lo que no se utilizó el pvalue asociado a esa diferencia y se decidió trabajar con la estadística descriptiva únicamente.

## RESULTADOS :

Se logró aislar y cultivar exitosamente células madres mesenquimales a partir de muestras de tejido conectivo de origen gingival humano. A los 14 días de cultivo del explante se observó la presencia y proliferación de GMSCs y el día 28 las células gingivales se observaron con una confluencia de 70-80%, luego fueron tripsinizadas y expandidas en un nuevo cultivo. Se utilizaron GMSCs entre los pasajes 4 y 6 para la realización de los distintos experimentos y con una viabilidad mayor al 95%. El cultivo inicial exhibió morfología fibroblastoide y adherencia a la superficie plástica de la placa de cultivo (Imagen 1).



**Imagen N°1: GMSCs de origen gingival durante el cultivo inicial mediante Microscopía Óptica sin contraste de fase.**

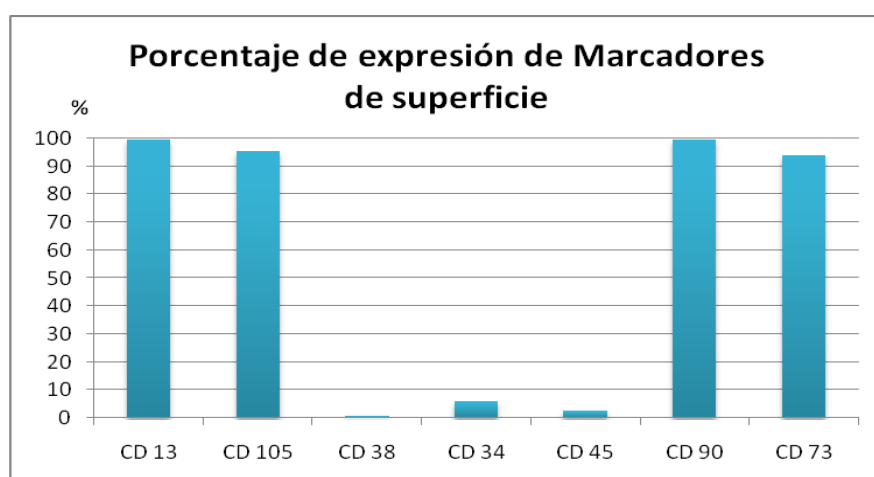
**A:** MSCs exhiben morfología fibroblastoide y adherencia a la superficie plástica de la placa de cultivo con una magnificación 10x.

**B:** MSCs alcanzando un 70% de confluencia con una magnificación 10x.

## Caracterización Inmunofenotípica

La caracterización inmunofenotípica de las células gingivales madres mesenquimales mediante citometría de flujo, demostraron marcaje positivo para los marcadores de superficie CD13, CD75, CD90 y CD105, y negativo para CD34, CD38 y CD45 como se observa en el gráfico 1:

Gráfico N°1: Porcentaje de expresión de Marcadores de superficie de las GMSCs Gingivales.



## Proliferación de la MSCs gingivales cultivadas con Mucograft®

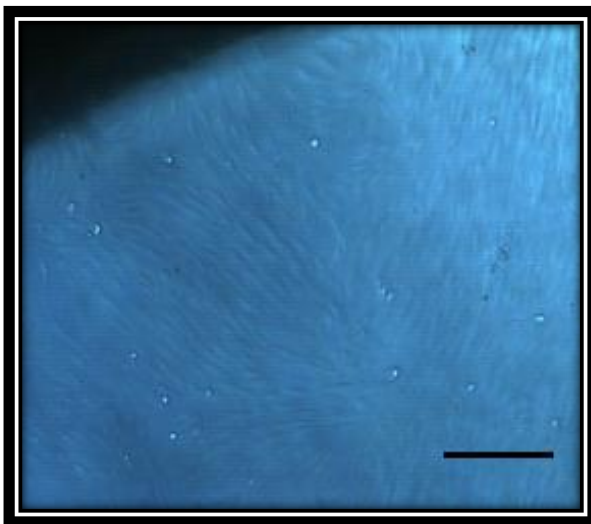
Una vez que se comprobó la presencia de MSCs de origen gingival humano mediante las pruebas realizadas según los criterios de la ISCT, se realizaron los experimentos de biocompatibilidad de las células en pasaje 4 con las matrices Mucograft®.

Bajo campana del flujo se sembraron 100.000 MSCs en pasaje 4 con medio completo. Al cabo de una hora se incorporó la matriz a la placa y se dejó incubando en la estufa de cultivo 37°C y 5%CO<sub>2</sub> (Imagen 2).

Aproximadamente al 4° día todos los pocillos al alcanzaron un 100% de confluencia, por lo tanto se procedió a realizar el lavado de la matriz y su recultivo en medio fresco y nueva placa. Las MSCs obtenidas del medio fueron tripsinizadas y contadas. La cantidad de células presentes fue de 570.000 células.

Un día posterior al recultivo de la matriz se observó la proliferación celular proveniente de células del interior de las matriz, lo cual demostró que existieron MSCs en la matriz y que al realizar un nuevo cultivo comenzaron a proliferar.

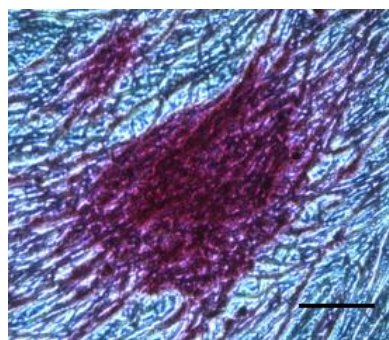
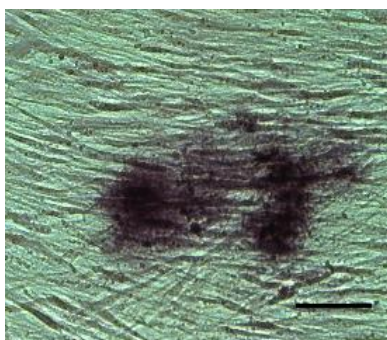
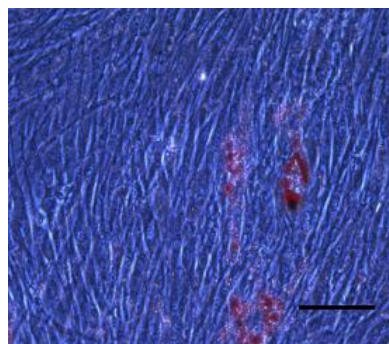
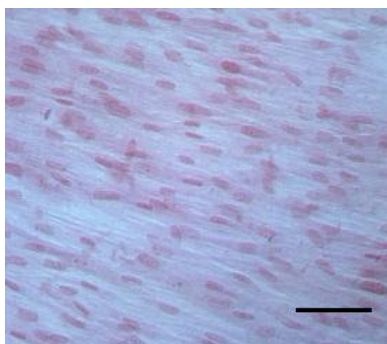
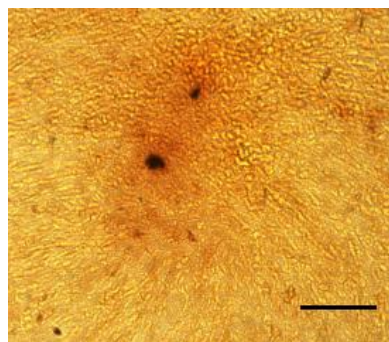
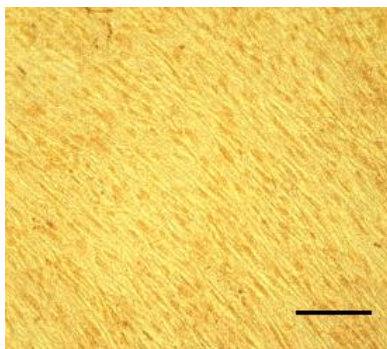
Imagen 2: GMSc en cultivo con Mucograft



#### Diferenciación a los linajes osteoblástico, condroblástico y adipogenico:

Las GMSCs fueron sometidas a la inducción y diferenciación hacia los tres linajes celulares característicos de una célula estromal multipotencial (Imagen 3A) según el protocolo de diferenciación establecido previamente en el material y método. De igual forma y como un método indirecto de corroboración de las propiedades de las GMSCs, una vez cultivadas las células con la matriz de Mucograft, a los 7 días las matrices fueron sacadas de la placa de cultivo, lavadas con PBS y puestas en una nueva placa con medio de cultivo, las

GMSc obtenidas a partir de este cultivo (células obtenidas del interior de la matriz de Mucograft) fueron cultivadas y amplificadas y sometidas a los protocolos con los medios de inducción de diferenciación y las células preservaron en forma integra sus propiedades de diferenciación hacia los linajes osteoblásticos, condrogénico y adipocito (Imagen 3B), resultado que ratifica que las células preservan su potencial de diferenciación característico de un GMSCs.



3A

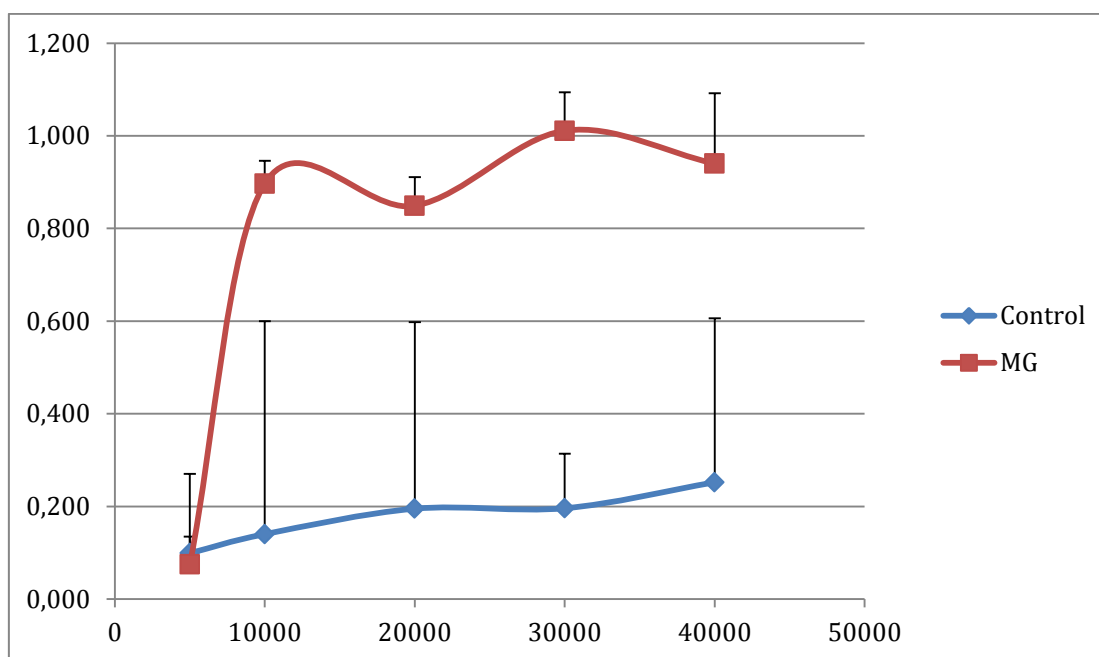
3B

Imagen 3: Diferenciación a linaje osteoblástico, adipogénico y condrogénico A: control (diferenciación sin la matriz) B: Diferenciación de GMSC + Mucograft

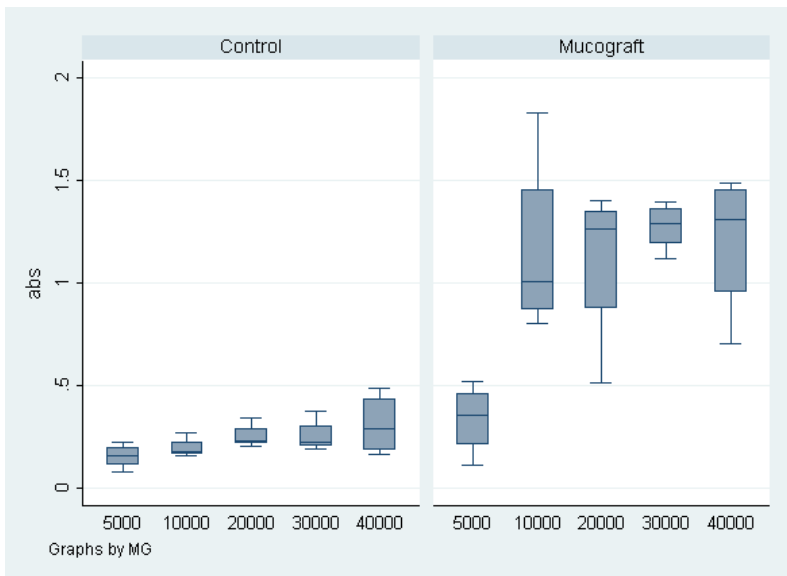
### Viabilidad y Proliferación con MTT:

Este método se utiliza para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y el color es leído con un lector de ELISA. Nuestros resultados muestran que la proliferación y la viabilidad de las GMSC no se ven alteradas en presencia de Mucograft® al compararlas con la proliferación y viabilidad de las MSCg solas (control), es más, la proliferación celular se ve favorecida por la presencia de la matriz como se puede apreciar en los Gráficos 2 -3 y 4.

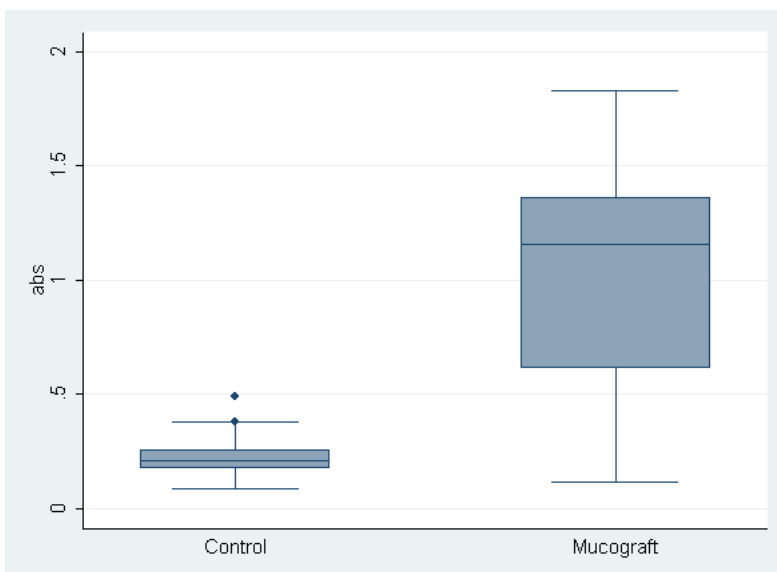
**Gráfico 2: Proliferación de GMCs en cultivo con Mucograft y control**



**Gráfico 3: Viabilidad de las GMCs en presencia de Mucograft**



**Gráfico 4: Descripción de la absorbancia según grupo (Control/Mucograft)**





### Histología e Inmunofluorescencia con DAPI:

La tinción de DAPI se utiliza para teñir los núcleos celulares de color azul fluorescente cuando se encuentra unido al ADN. El DAPI se une a las regiones de alta repetición A=T en los cromosomas. Además no es visible cuando se utiliza con un microscopio de transmisión corriente. Puede ser utilizado en células vivas o fijadas. Como podemos apreciar en las muestras analizadas (Imágenes 4A-B y 5A-B) la matriz de Mucograft demuestra ser biocompatible con las GMSC ya que posee abundante cantidad de núcleos celulares teñidos en el interior de la matriz.

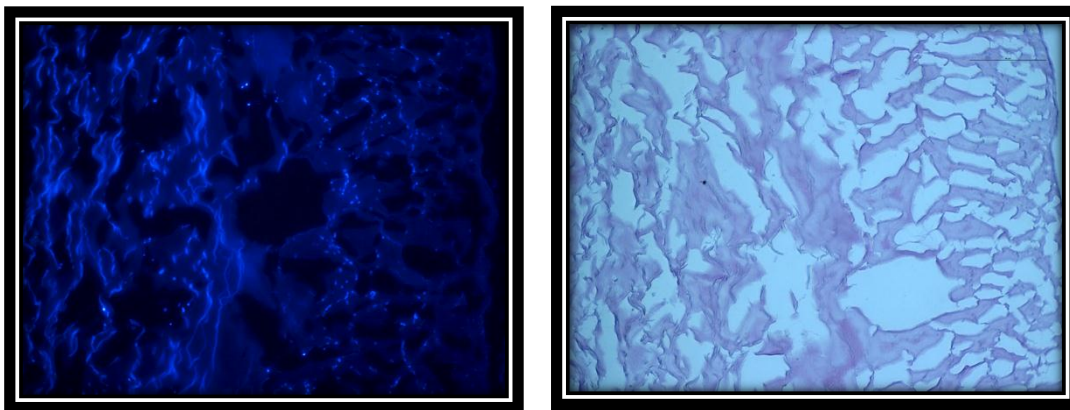


Imagen 4: tinción de DAPI (A) e histología H-E de Mucograft(B) con GMSc (20X)

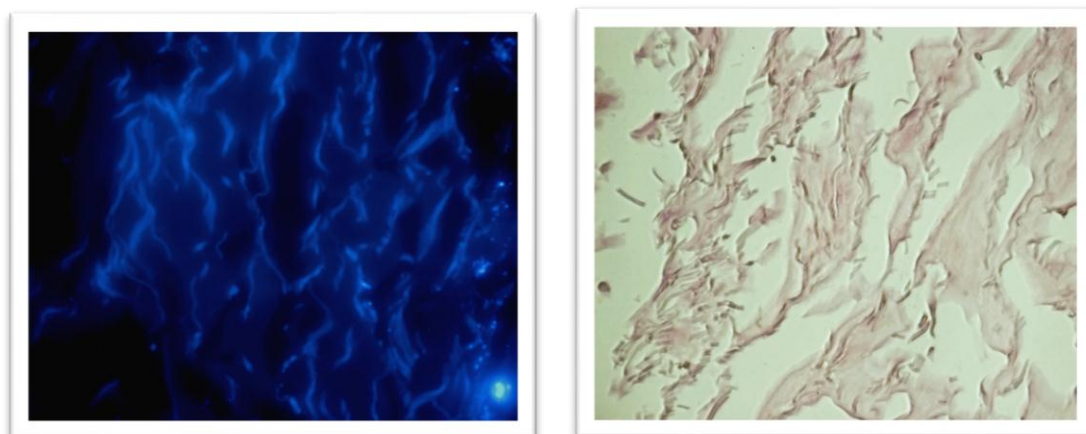


Imagen 5: Tinción de DAPI (5A) e histología H-E Mucograft con MSCc (5B) (40X)

## DISCUSIÓN

La ingeniería tisular representa uno de los avances más exitantes en la medicina regenerativa y especialmente para el manejo de la recesiones gingivales y el aumento de los tejidos blandos en relación a dientes e implantes. Tanto los acercamientos terapeuticos que buscan el reclutamiento celulas de células progenitoras como el transplante celular con células madres mesenquimales son alternativas promisorias para lograr la completa restitución de los tejidos dañados producto de la enfermedad periodontal y la investigación de este siglo se debería orientar en esta dirección.

El desplazamiento del margen gingival en forma apical al límite amelo cementario resulta en una exposición radicular a la cavidad oral, que puede causar problemas estéticos, sensibilidad dentinaria radicular y progresión en la pérdida de inserción de los tejidos periodontales.

En la actualidad el gold estándar para reparar el tejido blando perdido es la utilización de injertos autógenos, comunmente se utiliza el tejido conjuntivo del paladar, pero su utilización no se encuentra exenta de desventajas como lo son: morbilidad del sitio donante, infección, dolor, inflamación, rechazo inmunológico y además el paladar no es una buena zona donante ya que la biodisponibilidad de tejido conectivo es limitada y no cubriría las demandas en el caso de multiples recesiones gingivales<sup>37</sup>. En este sentido, la ingeniería tisular y la odontología regenerativa han centrado sus investigaciones en determinar nuevos métodos más previsibles sin causar morbilidad del sitio donante.

Así surge la investigación en células madres mesenquimales, las cuales pueden ser fácilmente obtenidas de distintos tejidos de nuestro organismo, son de alta calidad, autorenovables, proliferantes y con potencialidad de diferenciación hacia distintos linajes celulares bajo los estímulos apropiados y no presentan las preocupaciones éticas y controversias en relación a la terapia con células madre embrionarias<sup>51</sup>.

La investigación en ingeniería tisular ha sugerido que las MSCs son prometedores candidatos para reparar, regenerar o reemplazar importantes tejidos dañados<sup>69</sup> como: regeneración cardíaca posterior a un infarto agudo al miocardio<sup>70</sup>, y lesiones de la columna vertebral y el sistema nervioso central<sup>71</sup>.

Un estudio realizado el año 2008 por Mikako et al.<sup>72</sup> demostró que las MSCs expresan marcadores de queratina *in vitro*, y se demostró en heridas que las MSCs preservan la capacidad de diferenciarse en múltiples poblaciones celulares componentes de la piel como: queratinocitos, células endoteliales, pericitos y monocitos.

La fuente de células madres mesenquimales utilizadas en este proyecto de investigación fue el tejido conjuntivo gingival humano. Estas células aisladas cumplieron con todos los criterios de una célula mesenquimal estromal multipotencial estipulados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT).

Una vez comprobada su caracterización morfológica, inmunofenotípica y su multipotencialidad hacia distintos linajes celulares, fueron amplificadas y utilizadas para nuestros experimentos *in vitro* entre los pasajes celulares 4 y 6, y con una viabilidad mayor al 95%.

Con el objetivo de regenerar el tejido blando perdido se han investigando múltiples biomateriales que actúen como matriz de andamiaje que permitan el transporte de las células madres mesenquimales, la proliferación de células viables y diferenciación específica para lograr así la regeneración de los tejidos perdidos.

Los materiales biológicos naturales consisten en tejido de cadáver de origen alogénico (humano) o xenogénico (porcino) que reciben distintos tratamientos con el objetivo de producir un andamio (scaffold) acelular y avascular. La mayor ventaja de estos materiales biológicos es que su composición y organización es muy similar a la dermis nativa y que parte de su membrana basal se encuentra conservada. Varios estudios demuestran que la presencia de una membrana basal aumenta las propiedades de adherencia, crecimiento, extensión y diferenciación de los queratinocitos y este efecto es asociado a la presencia de laminina y colágeno tipo IV que posee la membrana basal.

El uso de dispositivos xenogénicos colágenos ha sido ampliamente investigado en el área de la periodoncia, principalmente como membranas para los procedimientos de regeneración ósea guiada (ROG)(Hammerle & Jung, 2003) y regeneración tisular guiada (RTG)(Sculean et Al. 2008).

El andamio (scaffold) colágeno debe ser reabsorbible y otorgar un medio adecuado para la migración y colonización celular y óptimas propiedades físico mecánicas que no permitan la deformación de la membrana para proveer del espacio y tiempo necesario para estabilizar al coagulo y favorecer los mecanismos celulares implicados en la regeneración de los tejidos.

En general este tipo de dispositivos deberían proteger a la herida frente a la infección y la pérdida de fluidos, proveer de un substrato estable y biodegradable para la síntesis de nuevos tejidos, permitir la afluencia de células que participan en la regeneración y ser fáciles de manipular con una adecuada resistencia al desgarro.

Recientemente se ha desarrollado una nueva membrana colágena xenogénica (Mucograft®), indicada para la regeneración y aumento de tejidos blandos periodontales y periimplantares (Sanz et Al. 2009, Nevins et Al. 2010, Lorenzo et Al. 2011) como para el cubrimiento de recesiones gingivales (Mc Guire & Scheyer 2010). Esta matriz ha demostrado presentar resultados comparables al uso de tejido conectivo autógeno cuando es utilizada en forma combinada con el colgajo desplazado a coronario para lograr el cubrimiento radicular como así también en técnicas quirúrgicas combinadas indicadas para el aumento de encía queratinizada(ref).

El objetivo de la presente investigación fue establecer si el Mucograft es un scaffold biocompatible con las células mesenquimales gingivales humanas.

El Mucograft® es una matriz tridimensional de origen porcino que posee dos estructuras funcionales: una capa de fibras colágenas dispuestas en forma compacta y un grueso andamio de características porosas. Este andamio poroso provee de un espacio que favorece la formación y estabilización del coágulo sanguíneo y su integración a los tejidos conjuntivos adyacentes.

Sin embargo, las matrices y su utilidad en ingeniería tisular no están exentas de inconvenientes ya que ellas carecen de vasos sanguíneos y del componente celular, por lo tanto, su incorporación es lenta y depende

exclusivamente de la infiltración de células y vasos sanguíneos desde el periostio y el corion gingival que lo cubre y rodea.

Un estudio que analizó la biocompatibilidad del Mucograft® con fibroblastos in vitro, demostró el crecimiento de fibroblastos humanos en el interior de la matriz, reflejándose en un aumento de la expresión de proteínas de la matriz como colágeno tipo I y fibronectina (Mathes et Al. 2010).

Estudios de Erdaj, Sheridan y Novaes en donde comparan la utilización de una matriz dermica acelular para el cubrimiento de recesiones radiculares con y sin la adición de fibroblastos humanos demuestran que la matriz dermica acelular con fibroblastos resultan en una temprana vascularización, menor contracción y una reparación más favorable en un menor tiempo con menos inflamación y una apropiada incorporación del tejido, aunque, este estudio, no observó diferencias en relación al cubrimiento radicular logrado.

Entonces la producción de scaffolds híbridos in vitro capaces de reducir los tiempos de cicatrización y favorecer los fenómenos regenerativos in vivo, mejorando la reorganización tisular y neoangiogénesis es un acercamiento terapéutico que nos permitirá evolucionar hacia una terapéutica regenerativa de los tejidos periodontales más eficiente y biológica. Las interacciones que ocurran entre la matriz con las células serán determinantes para la migración, crecimiento y diferenciación de ellas. Así como también para la supervivencia del tejido, remodelación de la matriz e integración tisular.

El presente trabajo demuestra que la matriz xenogénica tridimensional de origen porcino: Mucograft® es un scaffold biocompatible para las células mesenquimales gingivales humanas en cultivos in vitro, determinado en términos de proliferación y viabilidad celular del cultivo en presencia de la matriz comparado con cultivos puros de las GMSCs y corroborado mediante las técnicas de histología y tinción fluorescente de los núcleos celulares de las GMSCs (DAPI) al interior de la matriz porcina colágena.

El scaffold Mucograft® presenta una afinidad celular apropiada que promueve la adhesión y proliferación celular in vitro en su interior como así lo corrobora la presencia de células al interior de la matriz. Al parecer la zona funcional del Mucograft porosa y gruesa permitiría una apropiada migración celular, ya que matrices con un componente fibrilar densamente compactado retardarían el fenómeno de afluencia celular (ref).

Otro objetivo planteado en esta investigación fue el determinar si las células cultivadas en la matriz alteran o modifican su potencial de diferenciación característico de las células estromales mesenquimales.

Un método indirecto para comprobar este objetivo, es obtener las células de la matriz, y sometelas a un cultivo celular con los medios de diferenciación específicos para cada linaje celular y observando si las células mantienen su potencialidad de diferenciación a distintos linajes celulares. En el presente estudio las células mesenquimales gingivales obtenidas de la matriz Mucograft® fueron cultivadas y diferenciadas optimamente a los linajes: adipogénico, condrocítico y osteoblástico. Lo que demuestra que las células provenientes del interior de la matriz mantienen sus características de célula estromal mesenquimal multipotencial.

Aunque varios estudios han demostrado cierta eficacia de las MSCs en terapias regenerativas de tejidos, sigue siendo controvertido si las MSCs pueden contribuir significativamente a regenerar el tejido dañado a través de su transdiferenciación o plasticidad<sup>71</sup> en otros linajes celulares y tejidos. Ya que su efecto benéfico en los tejidos transplantados también podría ser el resultado asociado a la capacidad que poseen las MSCs para secretar factores angiogénicos, tales como factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que favorecen el medio ambiente circundante a las MSCs con señales estimulantes que promueven a la proliferación celular y regeneración tisular.

Se requieren de estudios adicionales que analicen los marcadores celulares que expresan estas células al interior del scaffold, sus curvas de proliferación y viabilidad celular en el tiempo como también su potencial de diferenciación a otros linajes celulares y cómo se ven afectados por el scaffold. Se debe determinar cuál es el rol de las células mesenquimales gingivales humanas y cómo podrían participar estas células en la generación de señales celulares y síntesis de factores de crecimiento que promuevan la regeneración tisular.



## **CONCLUSION:**

El mucograft® fue utilizado como un sustrato de cultivo celular para expandir las células mesenquimales gingivales humanas y como un potencial vehículo para el trasplante de GMSCs para la regeneración del tejido gingival. Esta matriz tridimensional es biocompatible con las células mesenquimales humanas promoviendo su proliferación sin afectar su viabilidad y sus propiedades de multidiferenciación a los linajes: osteoblástico, condrogénico y adipogénico in vitro. Por lo tanto poseería un potencial para promover el aumento del tejido blando y acelerar la regeneración y/o cicatrización del tejido blando gingival, lo que debe ser comprobado en un modelo animal con la matriz como medio de transporte para GMSCs marcadas para poder analizar su comportamiento al interior del scaffold.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Wang H-L, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, et al. Periodontal regeneration. *J. Periodontol.* 2005 Sep;76(9):1601–22.
2. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UME. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000.* 2006 Jun;41(1):30–47.
3. Patrick Jr CW. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *The Anatomical Record.* 2001 Ago 1;263(4):361–6.
4. Slavkin HC, Bartold PM. Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontology 2000.* 2006 Jun 1;41(1):9–15.
5. Buckley MJ, Agarwal S, Gassner R. Tissue engineering and dentistry. *Clinics in Plastic Surgery.* 1999;26:657–62.
6. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered Oral Mucosa: a Review of the Scientific Literature. *Journal of Dental Research.* 2007 Feb 1;86(2):115–24.
7. Dennis JE, Carillet J-P, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1&plus; Marrow Cell Population Is Multipotential. *Cells Tissues Organs.* 2002;170(2-3):73–82.
8. Prato GPP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F. An Autologous Cell Hyaluronic Acid Graft Technique for Gingival Augmentation: A Case Series. *Journal of Periodontology.* 2003 Feb;74:262–7.
9. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials.* 2002 Mar;23(6):1461–9.
10. Kaihara S.; Vacanti J. P. Tissue engineering : Toward new solutions for transplantation and reconstructive surgery. 1999;134(11):1222–47.

11. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller PD. Acellular Dermal Matrix Seeded With Autologous Gingival Fibroblasts for the Treatment of Gingival Recession: A Proof-of-Concept Study. *Journal of Periodontology*. 2010 Abr;81:616–25.
12. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis P. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007 Sep;38:S23–33.
13. Krebsbach P, Robey P. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ*. 2002 Jun 1;66(6):766–73.
14. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of Chronic Wounds With Bone Marrow-Derived Cells. *Arch Dermatol*. 2003 Abr 1;139(4):510–6.
15. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, et al. Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Skin: Collagen Deposition and Wound Repair. *STEM CELLS*. 2004 Sep 1;22(5):812–22.
16. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2006;40:164–72.
17. Stephens P, Genever P. Non - epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Diseases*. 2007 Ene 1;13(1):1–10.
18. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J. Periodontol*. 2010 Jun;81(6):917–25.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
20. González DA. *Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular: del laboratorio a la Clínica*. México: Alfil; 2009.

21. Gomez M, Campos A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 3o ed. Editorial Medica Panamericana; 2009. 137-176 p.
22. Lauer G. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: A clinical and immunohistologic study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2001 Feb;59(2):169–75.
23. Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003 Abr;32(2):188–97.
24. Cooper ML, Andree C, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Spielvogel RL. Direct Comparison of a Cultured Composite Skin Substitute Containing Human Keratinocytes and Fibroblasts to an Epidermal Sheet Graft Containing Human Keratinocytes on Athymic Mice. *J Invest Dermatol*. 1993 Dic;101(6):811–9.
25. Vats A, Tolley NS, Buttery LDK, Polak JM. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 2004 Mar;86(2):159–64.
26. Vats A, Tolley NS, Bishop AE, Polak JM. Embryonic stem cells and tissue engineering: delivering stem cells to the clinic. *J R Soc Med*. 2005 Ago;98(8):346–50.
27. Lin N, Gronthos S, Mark Bartold P. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2009 Oct 1;51(1):239–51.
28. Watt FM, Hogan and BLM. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427–30.
29. Chaparro O. Las Celulas Stem: sueño y realidad. *Revistas Latinoamericana de Bioética*. 2005;9:22–39.
30. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):778–84.
31. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726–36.

32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999 Abr 2;284(5411):143–7.
33. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone - derived cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 2002 Sep 1;20(5):1060–9.
34. Lavker RM, Sun T-T. Epidermal stem cells: Properties, markers, and location. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Dic 5;97(25):13473–5.
35. Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C. Compactin Enhances Osteogenesis in Murine Embryonic Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001 Jun 8;284(2):478–84.
36. Buttery LDK, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SPF, et al. Differentiation of Osteoblasts and *in Vitro* Bone Formation from Murine Embryonic Stem Cells. *Tissue Engineering*. 2001;7:89–99.
37. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*. 2002 Nov 1;12(11):502–8.
38. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells. *Journal of Dental Research*. 2006 Nov 1;85(11):966–79.
39. Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Madrid : Médica Panamericana; 2000.
40. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991 Jul 1;78(1):55–62.
41. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*. 1991 Dic 1;78(11):2848–53.

42. Langer, B. & Calagna, L. (1980) The subepithelial connective tissue graft. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 44, 363–367.
43. Allen, E. P., Gainza, C. S., Farthing, G. G. & Newbold, D. A. (1985) Improved technique for localized ridge augmentation. A report of 21 cases. *Journal of Periodontology* 56, 195–199.
44. Thoma, D. S., Benic, G. I., Zwahlen, M., Hammerle, C. H. & Jung, R. E. (2009) A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clinical Oral Implants Research* 20 (Suppl.), 146–165.
45. Rocuzzo, M., Bunino, M., Needleman, I. & Sanz, M. (2002) Periodontal plastic surgery for treatment of localized gingival recessions: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* 29 (Suppl. 3), 178–194.
46. Farnoush, A. (1978) Techniques for the protection and coverage of the donor sites in free soft tissue grafts. *Journal of Periodontology* 49, 403–405.
47. Griffin, T. J., Cheung, W. S., Zavras, A. I. & Damoulis, P. D. (2006) Postoperative complications following gingival augmentation procedures. *Journal of Periodontology* 77, 2070–2079.
48. Del Pizzo, M., Modica, F., Bethaz, N., Priotto, P. & Romagnoli, R. (2002) The connective tissue graft: a comparative clinical evaluation of wound healing at the palatal donor site. A preliminary study. *Journal of Clinical Periodontology* 29, 848–854.
49. Soileau, K. M. & Brannon, R. B. (2006) A histologic evaluation of various stages of palatal healing following subepithelial connective tissue grafting procedures: a comparison of eight cases. *Journal of Periodontology* 77, 1267–1273.
50. Reiser, G. M., Bruno, J. F., Mahan, P. E. & Larkin, L. H. (1996) The subepithelial connective tissue graft palatal donor site: anatomic considerations for surgeons. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 16, 130–137.

51. Alpiste Illueca FM, Buitrago Vera P, de Grado Cabanilles P, Fuenmayor Fernandez V, Gil Loscos FJ. Periodontal regeneration in clinical practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Jul;11(4):E382–92.
52. Hammerle, C. H. & Karring, T. (1998) Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology* 2000 17, 151–175.
53. Jung, R. E., Siegenthaler, D. W. & Hammerle, C. H. (2004) Postextraction tissue management: a soft tissue punch technique. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 24, 545–553.
54. Kimble, K. M., Eber, R. M., Soehren, S., Shyr, Y. & Wang, H. L. (2004) Treatment of gingival recession using a collagen membrane with or without the use of demineralized freeze-dried bone allograft for space maintenance. *Journal of Periodontology* 75, 210–220.
55. Jesty, J., Wieland, M. & Niemiec, J. (2009) Assessment in vitro of the active hemostatic properties of wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 89B, 536–542.
56. Hämmerle, C. H., Jung, R. E. & Feloutzis, A. (2002) A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *Journal of Clinical Periodontology* 29 (Suppl. 3), 226–231
57. Wallace, S. S. & Froum, S. J. (2003) Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Annals of Periodontology* 8, 328– 343.
58. Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucografts prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 868–876.
59. Thoma DS, Jung RE, Schneider D, Cochran DL, Ender A, Jones AA, Goßlach C, Uebersax L, Graf-Hausner U, Hammerle CHF. Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices: a volumetric analysis. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 659–666.

60. Vignoletti F, Nunez J, Discepoli N, De Sanctis F, Caffesse R, Muñoz F, Lopez M, Sanz M: Clinical and histological healing of a new collagen matrix in combination with the coronally advanced flap for the treatment of Miller class-I recession defects: an experimental study in the minipig. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 847–855.
61. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal Stem Cells and the Treatment of Cardiac Disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2006 Ene 1;231(1):39–49.
62. Chernykh ER, Shevela EY, Leplina OY, Tikhonova MA, Ostanin AA, Kulagin AD, et al. Characteristics of bone marrow cells under conditions of impaired innervation in patients with spinal trauma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2006 Ene;141(1):117–20.
63. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *The Journal of Immunology*. 2008 Feb 15;180(4):2581–7.
64. Piña-Barba MC, Tejeda-Cruz A, Regalado-Hernández MÁ, Arenas-Reyes MI, Martín-Mandujano S, Montalvo C. Cerámicas mexicanas para cicatrización de piel. *Gaceta médica de México*. 2004 Feb;140(1):7–14.
65. Kinnaird T, Stabile E, Burnett M s., Lee C w., Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circulation Research*. 2004 Mar 19;94(5):678–85.
66. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of Chronic Wounds With Bone Marrow-Derived Cells. *Arch Dermatol*. 2003 Abr 1;139(4):510–6.
67. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, et al. Contribution of Bone Marrow–Derived Cells to Skin: Collagen Deposition and Wound Repair. *STEM CELLS*. 2004 Sep 1;22(5):812–22.



68. Boutonnat J, Faussat A-M, Marie J-P, Bignon J, Wdzieczak-Bakala J, Barbier M, et al. Usefulness of PKH fluorescent labelling to study leukemic cell proliferation with various cytostatic drugs or acetyl tetrapeptide – AcSDKP. *BMC Cancer*. 2005 Sep 20;5:120.
69. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal Stem Cells and the Treatment of Cardiac Disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2006 Ene 1;231(1):39–49.
70. Chernykh ER, Shevela EY, Leplina OY, Tikhonova MA, Ostanin AA, Kulagin AD, et al. Characteristics of bone marrow cells under conditions of impaired innervation in patients with spinal trauma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2006 Ene;141(1):117–20.
71. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *The Journal of Immunology*. 2008 Feb 15;180(4):2581–7.
- 72.





