

**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA**

Cátedra de Histología “B”



**UNIVERSIDAD DE
GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA
Y FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA**

Departamento de Histología



**“Evaluación de los efectos de la criopreservación sobre corion de
mucosa oral artificial generado por ingeniería tisular”**

Tesis que presenta el licenciado D. Mario Aníbal Rodríguez para optar al grado de Doctor.

Esta tesis Doctoral ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria, Proyecto FIS 11/2668).

La Tesis doctoral ha sido realizada en el marco del programa de doctorado “Biomedicina” y del Máster de Ingeniería Tisular al amparo del Convenio de Colaboración existente entre la Universidad de Granada de España y la Universidad Nacional de Córdoba de Argentina de fecha 29 de Julio de 1999.

Fdo:

Granada, 1 de Abril de 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mario Aníbal Rodríguez
D.L.: GR 3103-2012
ISBN: 978-84-9028-238-0

D. Antonio CAMPOS MUÑOZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Granada, España.

Dña. Carmen CARDA BATALLA, Catedrática de Universidad del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, España.

D. Ismael Ángel RODRIGUEZ, Profesor Asistente de la Cátedra de Histología "B" de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

CERTIFICAN:

Que D. Mario Aníbal Rodríguez, Odontólogo, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral **“Evaluación de los efectos de la criopreservación sobre corion de mucosa oral artificial generado por ingeniería tisular”**, y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Prof. D. A. Campos Muñoz

Prof. Dña. C. Carda Batalla

Prof. D. I. A. Rodriguez

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2012

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral representa un logro muy importante en mi carrera y por supuesto en mi vida, por lo cual quisiera expresar mis sentimientos hacia aquellas personas en las que he confiado y me han ayudado a crecer en forma personal y profesionalmente.

Comenzaré por mis Directores de Tesis:

A mi hermano y amigo por el que siento una profunda admiración, **Ismael Rodriguez**, agradecerle no solo por haberme guiado en la investigación científica de esta tesis doctoral sino también por su apoyo y protección incondicional en todos mis años de vida.

Al **Dr. Antonio Campos**, una de las personas que en estos últimos años ha sido muy importante en mi formación académica y que además me ha sabido transmitir esa cuota de fuerza y confianza que por momentos uno pierde para poder dar el paso fundamental en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Carmen Carda**, por su profesionalidad, amistad y seriedad en el trabajo.

A todo el Departamento de Histología de Granada por su trato tan cordial durante todas mis estadías y por su colaboración, al Prof. Vicente Crespo Ferrer, Prof. José Manuel García López, Prof. Carmen Sánchez Quevedo, Prof. Eduardo Fernández Segura, Prof. Javier Cañizares, Prof. María Angustias Cubero, Prof. Francisco Arrebola y a María Ángeles Robles. También al Prof. Miguel Alaminos, por transmitir ese ejemplo de humildad y por dedicar su tiempo a la orientación en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Destacar también aquellas personas con las que he compartido gran cantidad de horas dentro del departamento como: Ingrid, Celeste, Miguel, Camilo, Giuseppe, Renato y Sebastián, a ellos, gracias por su enseñanza y colaboración en el desarrollo de las técnicas utilizadas y en el uso de los distintos aparatos del laboratorio.

A todas personas que forman parte de la Universidad de Granada por darme la posibilidad de estudiar en esta prestigiosa institución.

A la Decana de mi Facultad en la Universidad Nacional de Córdoba en Argentina, Prof. Carmen Visvisian, por su apoyo institucional.

A mi maestra y hoy Vicedecana de mi Facultad la Prof. María Elsa Ferraris, por su atención y preocupación constante para que yo pueda seguir creciendo en el ámbito académico, científico y personal.

A mis compañeros y amigos de la Cátedra de Histología de Argentina, Liliana, Adriana, Miriam, Cecilia, Karina, Graciela, Lucas y Gerardo quienes me han hecho sentir siempre parte de este grupo sin egoísmos, muchas gracias.

A dos grandes personas como Carmen y Gonzalo por transmitirme su afecto y cariño que uno tanto necesita cuando se encuentra lejos de la familia.

A una hermosa mujer a la que amo y de la que he tenido su apoyo incondicional, para vos María.

A vos Sole, que a pesar que la vida no me permitió compartir este hermoso momento con vos, se que estarías orgullosa de este logro.

Y por último, para quiénes jamás me alcanzaría la vida para agradecerles, a Mamá y Papá. A vos Mamá por transmitirme ese amor único y esa alegría incansable que jamás se te ha borrado. Y vos Papá, por todo tu esfuerzo de guiarme con tus consejos día tras día por el camino correcto.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Ingeniería tisular	4
1.2. Herramientas de la ingeniería tisular	4
1.2.1. <i>Células</i>	5
1.2.2. <i>Matriz extracelular</i>	7
1.2.3. <i>Factores de crecimiento</i>	8
1.3. Desarrollo y perspectivas de la ingeniería tisular	9
1.4. Estructura y funciones de la mucosa oral humana ortotípica	11
1.5. Histología de la mucosa oral	11
1.5.1. <i>Epitelio de la mucosa oral</i>	11
1.5.2. <i>Membrana basal de la mucosa oral</i>	13
1.5.3. <i>Lámina propia o corion de la mucosa oral</i>	14
1.5.3.1. <i>Células</i>	14
1.5.3.2. <i>Sustancia fundamental</i>	15
1.5.3.3. <i>Fibras</i>	16
1.6. Criopreservación	17
1.6.1. <i>Fundamentos biológicos</i>	17
1.6.2. <i>Crioprotectores</i>	20
1.6.3. <i>Métodos de criopreservación</i>	21
1.6.4. <i>La criopreservación en la ingeniería tisular</i>	22
1.7. Control de calidad de los tejidos generados por ingeniería tisular	23
1.7.1. <i>Análisis macroestructural</i>	23
1.7.2. <i>Análisis histológico</i>	24

1.7.3. Viabilidad celular.....	24
1.7.4. Propiedades biomecánicas.....	26
2. Objetivos.....	30
3. Materiales y Métodos.....	32
3.1. Obtención de muestras de mucosa oral humana.....	33
3.2. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos.....	33
3.3. Sub-cultivos de fibroblastos procedentes de cultivos primarios de mucosa oral.....	34
3.4. Desarrollo de la matriz extracelular: Elaboración de un sustituto de corion de mucosa oral.....	35
3.5. Proceso de criopreservación de los sustitutos de corion de la mucosa oral.....	36
3.5.1. Soluciones crioprotectoras.....	36
3.5.2. Protocolo de congelación.....	37
3.5.3. Protocolo de descongelación.....	38
3.6. Control de calidad de los tejidos generados por ingeniería tisular.....	39
3.6.1. Análisis macroestructural de los sustitutos de corion de mucosa oral.....	39
3.6.2. Análisis histológico mediante microscopía óptica de los sustitutos de corion de mucosa oral.....	39
3.6.2.1. Áreas interfibrilares.....	39
3.6.2.2. Cuantificación de células.....	40
3.6.3. Viabilidad celular mediante el estudio inmunohistoquímico de proliferación celular (PCNA).....	40
3.6.4. Viabilidad celular mediante el método de recultivación .	41
3.6.4.1. Técnica de Live & Dead.....	42
3.6.4.2. Técnica de exclusión vital de Azul Tripán.....	42

3.6.5. <i>Análisis de las propiedades biomécanicas de los sustitutos de corion de mucosa oral</i>	43
3.7. Tratamiento estadístico	46
4. Resultados	47
4.1. Análisis macroestructural de los sustitutos de corion de mucosa oral	48
4.2. Análisis histológico mediante microscopía óptica de los sustitutos de corion de mucosa oral	51
4.2.1. <i>Áreas interfibrilares</i>	51
4.2.2. <i>Cuantificación de células</i>	56
4.3. Viabilidad celular mediante el estudio inmunohistoquímico de proliferación celular (PCNA)	60
4.3.1. <i>Análisis inmediato a la descongelación</i>	60
4.3.2. <i>Análisis 24 horas después a la descongelación</i>	64
4.3.3. <i>Comparación estadística entre los análisis de PCNA inmediatos y 24 horas después a la descongelación</i>	68
4.4. Viabilidad celular mediante el método de recultivación	70
4.4.1. <i>Técnica de Live & Dead</i>	70
4.4.1.1. <i>Cuantificación de células</i>	70
4.4.1.2. <i>Evaluación de la viabilidad celular</i>	78
4.4.2. <i>Técnica de exclusión vital Azul Tripán</i>	79
4.5. Análisis de las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral	80
4.5.1. <i>Viscosimetría</i>	80
4.5.2. <i>Oscilometría</i>	81

4.5.2.1. <i>Barrido de amplitud de esfuerzo. Módulo elástico</i>	81
4.5.2.2. <i>Barrido de amplitud de esfuerzo. Módulo viscoso</i>	82
4.5.2.3. <i>Barrido de frecuencia de esfuerzo. Módulo elástico y módulo viscoso</i>	83
5. Discusión	85
6. Conclusiones	97
7. Resumen	101
8. Summary	103
9. Bibliografía	105

1-INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Diversas situaciones clínicas que se presentan en nuestra actividad odontológica, como la extirpación de tumores, traumatismos de distinta índole, recesiones gingivales, y distintas técnicas en el ámbito de la implantología oral, exigen en muchas ocasiones la regeneración o la sustitución de la mucosa oral.

En la actualidad, la terapia sustitutiva de la mucosa oral necesita de una buena técnica para reparar los defectos de la misma, y en este sentido se han propuesto diversas soluciones con diferentes grados de complejidad, entre ellas se presentan la cicatrización-granulación de zonas cruentas por segunda intención (Clark y Singer, 2000), el uso de injertos cutáneos autólogos de espesor parcial o completo (Petruzelli et al., 1992), el empleo de colgajos regionales y locoregionales (Urken et al., 1995), la utilización de técnicas para la reconstrucción microquirúrgicas con empleo de colgajos libres para la reparación de grandes defectos (Rosenthal et al., 2004) y la interposición de materiales biocompatibles (Paolantonio et al., 2002). Sin embargo, ninguno de estos procedimientos está libre de la posibilidad de problemas asociados y complicaciones a nivel local y general (Shah y Patel, 2004) y es por ello que el material de elección para la realización de una terapia sustitutiva de mucosa oral es la utilización como injerto de la propia mucosa oral. En este sentido, las recesiones gingivales vestibulares, que son un hallazgo frecuente en la consulta odontológica, y la necesidad de mejorar los requerimientos estéticos en el contorno gingival y papilar de los tratamientos de implantes dentales, tienen distintas soluciones quirúrgicas (Miller, 1992; Pini Patro et al., 1992; Sallum et al., 2003; Tal et al., 2002) entre las que destacan los injertos de conectivo autólogo (Langer y Langer, 1985). Esta técnica consiste básicamente en la toma del tejido conectivo de la mucosa palatina y posteriormente su utilización como injerto en la zona de la recesión gingival (Figura 1). Pero esta solución presenta dos desventajas, por un lado requiere de una intervención más sobre el paciente, y por otro lado, la herida de la mucosa palatina cicatriza por segunda intención y se contrae, produciendo una disminución de la mucosa disponible para futuras intervenciones (Fujioka et al., 1997).

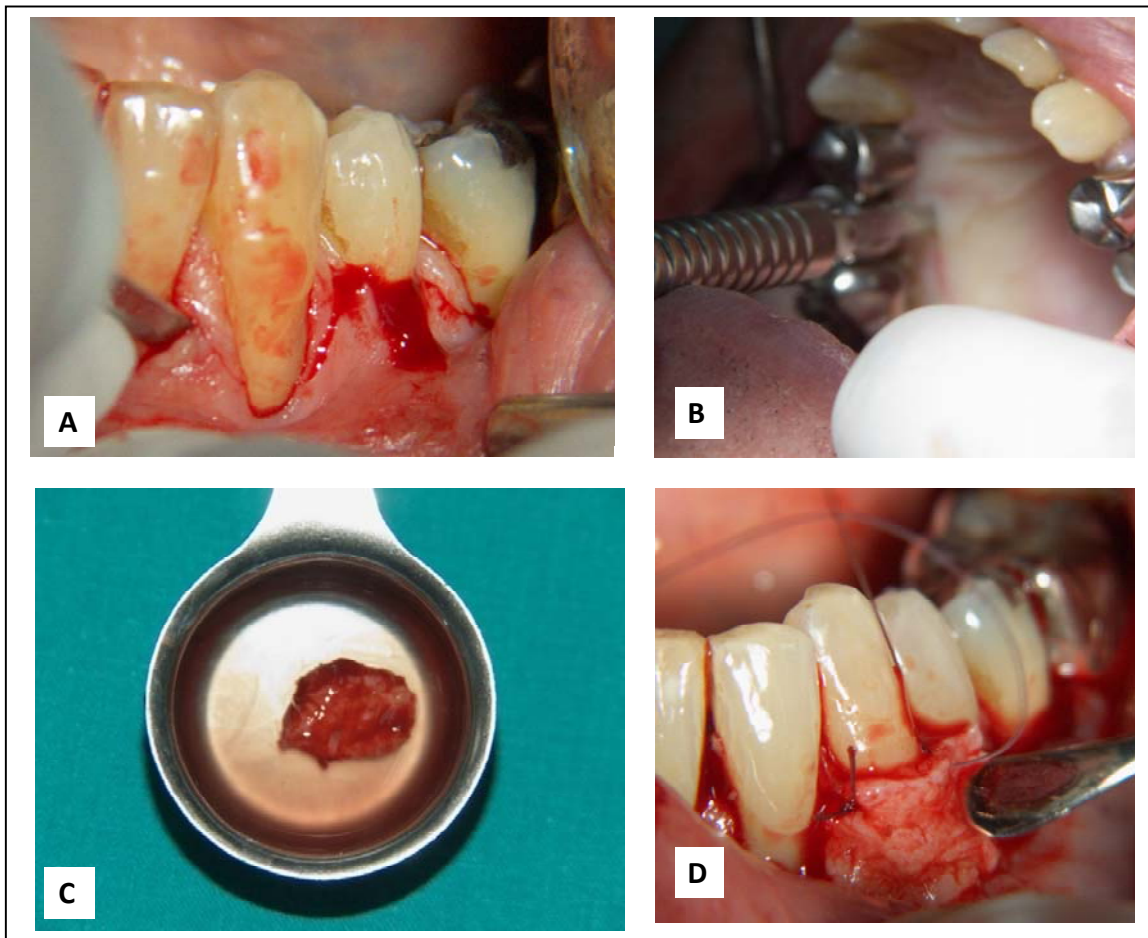


Figura 1. Se muestra la técnica de injerto de tejido conectivo autólogo para solucionar recesiones gingivales vestibulares. **A-** Levantamiento de colgajo en zona de recesión gingival. **B-** Obtención de tejido conectivo autólogo del paladar. **C-** Tejido conectivo autólogo listo para injertar. **D-** Posicionamiento del injerto en la zona de la recesión gingival vestibular. Caso clínico desarrollado por el grupo de docentes del Máster de Periodoncia e Implantes de la Universidad de Granada.

Es por ello que, añadido a las limitaciones en la cantidad de tejido disponible para injertos, justifican la exploración de nuevas fuentes de tejido oral. En este contexto, la elaboración in vitro de mucosa oral o de sustitutos de corion de mucosa oral, empleando las técnicas desarrolladas por la ingeniería tisular se ha convertido en una alternativa.

En la presente introducción describiremos el concepto de ingeniería tisular, su desarrollo y perspectivas, la histología de la mucosa oral, la criopreservación de los tejidos artificiales y los métodos que permiten realizar un control de calidad de los tejidos generados por ingeniería tisular destacando las técnicas de viabilidad

celular, y las que permiten evaluar las propiedades biomecánicas de un tejido para el ejercicio de sus funciones.

1.1. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular constituye un área en expansión que, asentada en los conocimientos básicos de la histología, tiene por objetivo construir tejidos nuevos, funcionalmente activos, a partir de células procedentes de cultivos desarrollados previamente y de biomateriales de distinta naturaleza que sirven como soporte o andamiaje, con la finalidad de reemplazar o sustituir tejidos u órganos perdidos o dañados por distintas causas (Langer y Vacanti, 1993; Campos, 2004a; Vacanti, 2006).

La indudable capacidad de la ingeniería tisular para regenerar tejidos del propio paciente a partir de células extraídas del mismo, convierte a esta disciplina en una de las de mayor potencialidad dentro del campo de la medicina regenerativa.

Su carácter multidisciplinario permite además de la histología, recibir aportaciones desde otras áreas como la biología celular, la biología del desarrollo, la inmunología, las técnicas quirúrgicas y las ciencias de los biomateriales.

De esta manera, la ingeniería tisular se nos presenta como un campo en rápido crecimiento que posiblemente representa el prototipo de los futuros desarrollos científicos. Esta disciplina emergente y en franco desarrollo empieza a configurarse, no sólo como línea de investigación fundamental y prioritaria en las universidades, en los hospitales sino también en las agendas de los gobiernos (Campos, 2004b).

1.2. Herramientas de la Ingeniería Tisular

Para generar nuevos tejidos la ingeniería tisular utiliza tres herramientas básicas: **a) Células** con capacidad de proliferación, **b) Matrices extracelulares o andamiajes** naturales o sintéticas y **c) Factores de crecimiento**. Las células

sintetizan proteínas necesarias para el desarrollo de la matriz extracelular, mientras que el andamiaje proporciona un ambiente adecuado para la proliferación de las células. Finalmente, la función de los factores de crecimiento es facilitar y promover la regeneración del nuevo tejido.

1.2.1. Células

Las células que se utilizan en ingeniería tisular son, preferentemente, células madre. Estas son células indiferenciadas ya que no poseen ninguna estructura o morfología diferencial o especializada que le permita realizar funciones biológicas reservadas a las células maduras. La función de toda célula madre es la misma en todos los tejidos, y es la de replicarse para mantener su población, y la de dar lugar a células hijas que posean cualidades específicas (Weissman et al., 2001).

La fuente a partir de la cual se obtienen las células tiene una gran influencia en el éxito del tejido a reparar. De acuerdo con esto, es posible clasificar las células de la siguiente manera:

- Autogénicas o autólogas: procedentes del mismo individuo.
- Singénicas: procedentes de un individuo genéticamente idéntico.
- Alogénicas: procedentes de la misma especie.
- Xenogénicas: procedentes de otras especies.

La utilización de células autólogas son consideradas el “gold standard” y por lo tanto son las más apropiadas para llevar a cabo protocolos de ingeniería tisular, ya que ofrecen la posibilidad de manipulación con mínimos riesgos en relación con la respuesta del huésped y la transmisión de enfermedades. Sin embargo, las células de origen alogénico y xenogénico ofrecen un mayor riesgo tanto en relación con la respuesta del huésped como con la transmisión de ciertas enfermedades, debido a que retienen su carácter inmunogénico, motivo por el cual requieren una terapia de inmunosupresión cuando un nuevo tejido es desarrollado a partir de estas células. (Campos, 2004a; Ikada, 2006).

Las células madre también pueden ser clasificadas según su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares y según su origen (Montalvo, 2008):

- Totipotenciales: son aquéllas capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: sistema nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anexos placentarios). En sentido estricto, solamente los estadios iniciales del desarrollo (cigoto, blastómeras y células de la mórula) constituirían células totipotenciales.
- Pluripotenciales: son aquéllas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Estas células son las del polo embrionario del blastocisto.
- Multipotenciales: serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo. Se localizan en el organismo adulto y en el feto, destacando las de la médula ósea, que pueden diferenciarse a eritrocitos, leucocitos o plaquetas.
- Unipotenciales: tienen la capacidad para formar un único linaje celular. Por ejemplo: células madre epiteliales de la capa basal de la epidermis.

Según su origen, las células madre clásicamente se han dividido en:

- Embrionarias: existen únicamente en embriones humanos. Tienen una proliferación ilimitada y son pluripotenciales, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo. Se pueden obtener a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998), o bien, de la cresta gonadal (Matsui et al., 1991; Resnick et al., 1992; Shambloott et al., 1998).
- Adultas: existen en casi todos los tejidos humanos del organismo y permiten la reparación y regeneración de los mismos. Tienen una capacidad proliferativa enorme, pero no infinita: pueden producir un gran número de células hijas pero acaban muriendo, y un potencial de

diferenciación menores que las células embrionarias. Son células multipotenciales y unipotenciales (Prósper y Verfaillie, 2004; Raff, 2003).

Dentro de las células madre adultas, nos encontramos con las células madre mesenquimales, también llamadas células madre estromales, las cuales se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos como son la médula ósea (Friedenstein et al., 1974), la sangre periférica (Zvaifler et al., 2000), el cordón umbilical (Troyer y Weiss, 2008), el tejido adiposo (Pittenger *et al.*, 1999), en los dientes deciduales (Miura et al., 2003) y en el músculo esquelético (Jankowski et al., 2002) y han sido utilizadas recientemente en ingeniería tisular con resultados exitosos.

1.2.2. Matrices Extracelulares

Los tejidos y órganos del cuerpo humano requieren de una estructura tridimensional fundamentalmente de soporte en la cual estén inmersas las células llamada matriz extracelular. En el caso de los tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular, la matriz extracelular está constituida por un material de soporte llamado biomaterial, andamiaje, soporte, o armazones, los cuales deben tener como función primaria la viabilidad del tejido, y por tanto, promover la adhesión, proliferación, diferenciación y migración celular tanto dentro como en superficie de su arquitectura tridimensional. El andamiaje debe también facilitar el desarrollo de un ambiente en el que las células puedan mantener su fenotipo y su actividad de síntesis de proteínas. Es por ello que uno de los requerimientos de los andamiajes para que las células cumplan sus funciones es que sean biocompatibles, porosos y permitan el transporte efectivo de nutrientes, oxígeno y desechos. Los andamiajes además deben ser biodegradables y deben poseer adecuadas propiedades físicas y mecánicas, para ser reemplazado por tejido regenerado mientras mantiene la forma de la estructura final que se quiere obtener. Otras de los requisitos que se necesitan es que posean ausencia de potencial carcinogénico y tolerancia a la esterilización previamente a su uso clínico (Campos, 2004b; Palson, 2004).

Normalmente, los andamiajes para la generación de tejidos mediante ingeniería tisular están compuestos por diferentes tipos de biomateriales:

- Naturales o biológicos: son compuestos procedentes de matrices extracelulares naturales como el colágeno, los glicosaminoglicanos, los alginatos, el quitosan o polipéptidos de distinta naturaleza.
- Sintéticos: son fundamentalmente los polímeros y los vidrios bioactivos. Entre los polímeros más importantes hay que mencionar a poliésteres, polianhídridos, poliortoésteres, policaprolactonas, policarbonatos y polifumaratos. El más utilizado son los poliésteres y estos son concretamente el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y el copolímero ácido poli-co-glicólico-láctico (PLGA). Estos poliésteres son biodegradables. Entre los polímeros no biodegradables destaca el politetrafluoroetileno (PTFE). Por su parte los vidrios bioactivos están basados en una estructura reticular de sílice con iones como el calcio, sodio y fósforo y se han aplicado a la ingeniería tisular ósea por su capacidad osteoinductiva (Vats, 2003; Campos, 2004b).
- Semisintéticos: son la combinación de naturales y sintéticos (Chen, 2002).

1.2.3. Factores de Crecimiento

Múltiples proteínas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células. Estas proteínas, que se denominan factores de crecimiento, son secretadas de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales parácrinas con células vecinas.

Los factores de crecimiento que han sido frecuentemente usados en ingeniería tisular son, fundamentalmente, la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF ó FGF-2), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Lavik y Langer, 2004; Knight y Evans, 2004). Por otra parte, la adición de los factores de crecimiento adecuados a las células y a la matriz extracelular artificial, promueve la regeneración de los tejidos en comparación con aquéllos en los que

no existen estos factores de crecimiento (Lavik y Langer, 2004; Knight y Evans, 2004).

1.3. Desarrollo y perspectivas de la ingeniería tisular

Uno de los primeros avances de la Ingeniería Tisular se produjo cuando Rheinwald y Green en 1979 lograron cultivar con éxito fibroblastos y queratinocitos humanos en el laboratorio a partir de pequeñas biopsias de piel. Posteriormente, otros investigadores desarrollaron tejido periodontal y hueso alveolar en combinación con el uso de membranas como barrera frente a la invasión de fibroblastos, lo que se ha denominado regeneración tisular guiada. Importantes trabajos desarrollados por Vacanti (Vacanti, 2006) permitieron un estudio más profundo acerca del transplante de células utilizando polímeros sintéticos reabsorbibles como matrices extracelulares. Al mismo tiempo Wakitami et al. (1989) desarrollo una técnica para la reparación de superficies articulares de conejo con condrocitos inmersos en geles de colágeno. Por otro lado, recientemente el continuo desarrollo de técnicas de obtención de materiales hísticos biocompatibles, liderada por los sustitutos dermo-epidérmicos (Bannasch et al., 2003), han supuesto una revolución en la búsqueda de material autólogo capaz de sustituir el tejido primario dañado.

Desde el punto de vista de la odontología clínica, son cuatro los principales factores que justifican el rápido y necesario desarrollo de la Ingeniería Tisular:

1. La posibilidad de obtener en laboratorio una fuente teóricamente inagotable de tejido útil para la reparación de estructuras orales.

2. La necesidad de encontrar sustitutos orgánicos adecuados que permitan disminuir traumas posoperatorios que suponen cirugías para la obtención de tejidos que son utilizados posteriormente como injertos.

3. La eliminación del riesgo de rechazo del injerto, así como a la necesidad del empleo de inmunosupresores tras su implante.

4. La eliminación del riesgo de transmisión de enfermedades desde el donante hasta el receptor (por ejemplo: VIH, VHB, VHC).

Como toda ciencia en fase de expansión, existen numerosos problemas aún no solventados, entre los que sobresale la obtención de cultivos celulares viables, la generación de un biomaterial de soporte adecuado que permita su empleo en la clínica y el reto de obtener constructos viables con aporte vascular intrínseco (Langer y Vacanti, 1993; Campos, 2004b). A pesar de esto, y remitiéndonos al punto de partida, los resultados alcanzados en la obtención de mucosa oral artificial mediante técnicas de ingeniería tisular parecen esperanzadores en relación a su aplicación clínica estandarizada (Lauer et al., 2001; Izumi et al., 2003; Izumi et al., 2004; Luitaud et al., 2007). En este sentido es importante destacar que en nuestro grupo de trabajo se ha generado una mucosa oral de espesor completo y sustitutos de corion de mucosa oral en forma eficaz (Figura 2) (Capitán Cañadas, 2006; Sanchez-Quevedo et al., 2007; Alaminos et al., 2007).

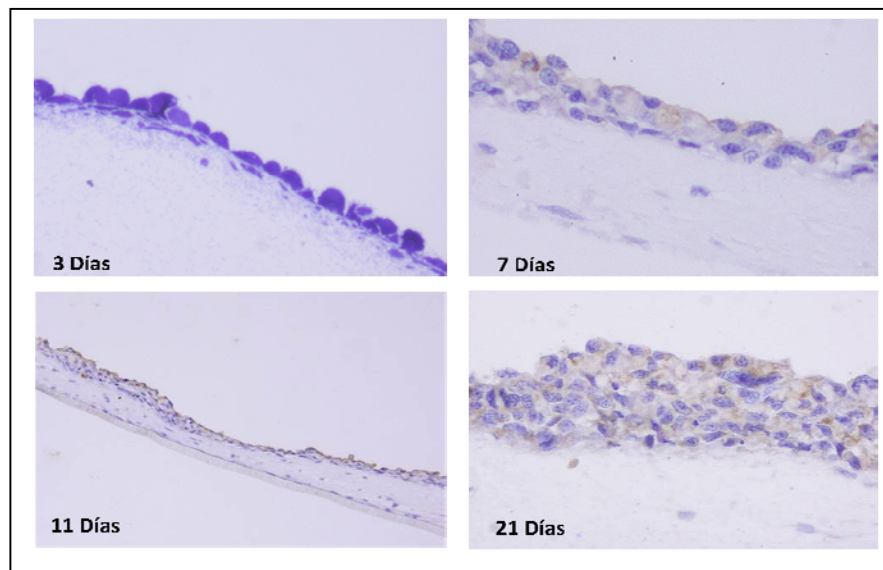


Figura 2. Se observa un modelo *in vitro* de mucosa oral de espesor completo generado por ingeniería tisular, que se compone de un epitelio que se estratifica con el paso de los días y que asienta sobre un sustituto de corion donde se encuentran fibroblastos inmersos en un andamiaje a base de fibrina y agarosa. Tomado de Capitán Cañadas, 2006.

1.4. Estructura y funciones de la mucosa oral humana

La mucosa oral está integrada por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes:

1. Tejido epitelial, de origen ectodérmico.
2. Tejido conectivo (también llamado lámina propia, corion o estroma), de origen mesenquimatoso.

Las dos capas están conectadas por una membrana basal, en una relación ondulada y no lisa. Esto es debido a que el tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio, denominadas papilas coriales, que son invaginaciones, mientras que el epitelio emite proyecciones hacia la lámina propia, en forma de evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales. Esta disposición en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio avascular a partir del tejido conectivo que es de carácter vascular (Figura 3) (Ferraris y Campos, 2009).

1.5. Histología de la mucosa oral

1.5.1. Epitelio de la mucosa oral

El epitelio de la mucosa oral está constituido fundamentalmente por dos poblaciones celulares:

A. Población intrínseca o propia del epitelio: esta población está formada por los queratinocitos, los cuales constituyen alrededor del 90% de la población celular total del epitelio de la mucosa oral. Los queratinocitos son las células del epitelio destinadas a queratinizarse en mayor o menor grado, ya que algunas permanecen en la capa basal tras dividirse y generar nuevos queratinocitos, pero el resto de elementos celulares migran hacia el exterior, madurando como células especializadas hasta convertirse en ocasiones en una escama queratinizada (anucleada) que más tarde se descama en superficie.

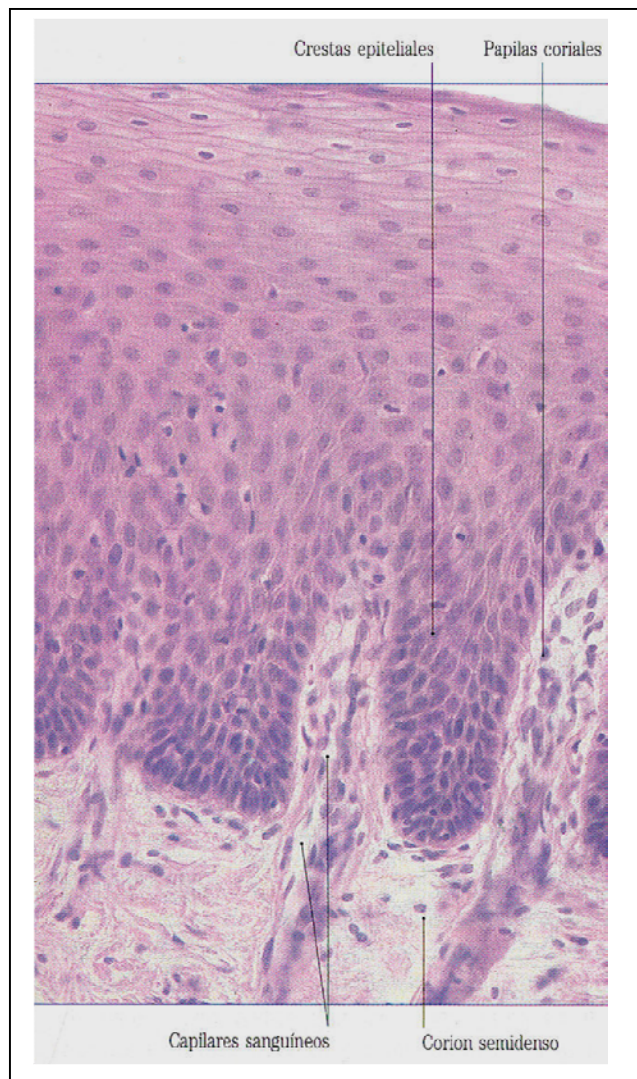


Figura 3. Mucosa bucal de revestimiento. Epitelio estratificado plano no queratinizado y corion (Mejilla o carrillo), HE, X 250. Tomado de Ferraris y Campos, 2009.

La población epitelial queratinocítica que reviste la mucosa oral se renueva constantemente. Este mecanismo de autorenovación, está controlado por un equilibrio de mitosis de las células de la capa basal y la descamación de células de la capa más superficial, en un ciclo que dura aproximadamente 14 días. Al igual que la piel, el epitelio de la mucosa oral está organizado en unidades epiteliales proliferativas (Ferraris y Campos, 2009).

B. Población extrínseca: esta población es de origen ajeno al epitelio, está formada por células permanentes y células transitorias, como se muestra a continuación:

- Población extrínseca permanente: representa el 9 % de la población celular del epitelio y está constituida por 3 tipos de células:

1. Melanocitos: son células claras, de núcleo pequeño, de aspecto dendrítico, con abundantes gránulos de melanina, los cuales hacen posible la pigmentación homogénea del epitelio.

2. Células de Merkel: se encuentran entre las células de la capa basal del epitelio, Se diferencian de los melanocitos porque carecen de prolongaciones de tipo dendrítico. Son células sensoriales para la percepción de la presión.

3. Células de Langerhans: estas células poseen prolongaciones de morfología dendrítica y son presentadoras de antígenos, de manera que son las iniciadoras de la respuesta inmunológica rápida. En la mayoría de los casos, aparecen en el estrato espinoso del epitelio.

- Población extrínseca transitoria: representan alrededor del 1 % de las células del epitelio y está constituida por granulocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos que pueden infiltrarse en el epitelio bucal (Ferraris y Campos, 2009).

1.5.2. Membrana basal de la mucosa oral

Entre el epitelio y el corion se establece la membrana basal. Esta posee dos regiones: la lámina basal, sintetizada por las células del tejido epitelio, y la lámina reticular, sintetizada por las células del tejido conectivo. La lámina basal esta

estructura está constituida por una lámina densa, rica en colágeno y una lámina lúcida que posee laminina y entactina. La lámina reticular por otra parte, está constituida por fibras de anclaje y reticulares inmersas de una matriz de glucosaminoglicanos y su espesor varía de acuerdo al grado de fricción con el epitelio suprayacente, siendo más gruesa en los epitelios queratinizados.

La membrana basal funciona como una estructura de fijación entre epitelio y conectivo y además sirve de guía para la migración celular en el proceso de reepitelización de heridas y como barrera defensiva (Ferraris y Campos, 2009).

1.5.3. Lámina propia o corion de la mucosa oral

El tejido conectivo se denomina también lámina propia o corion y forma un compartimiento vasto y continuo por todo el cuerpo. La función del corion es servir de sostén y nutrición al epitelio. Su origen es a partir de mesénquima embrionario. Está constituido por células y una matriz extracelular, la cual se compone de fibras y sustancia fundamental (Ferraris y Campos, 2009).

1.5.3.1. Células

Las células del tejido conjuntivo pueden ser residentes (fijas) o errantes (libres). Las células que conforman la población celular residente o fija son relativamente estables y es típico que se muevan poco, entre ellas se encuentran los fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos, adipocitos, mastocitos y las células mesenquimáticas. Por otra parte la población celular transitoria, libre o errante consiste en células que han emigrado de la sangre en respuesta a estímulos específicos, entre ellas tenemos a los linfocitos, plasmocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos.

Unas de las células principales de este tejido conectivo es el fibroblasto la cual es la célula más abundante del tejido conectivo, tienen a su cargo la síntesis de las fibras colágenas, reticulares y elásticas y de los carbohidratos complejos de la sustancia fundamental. Un solo fibroblasto es capaz de producir todos los componentes de la matriz extracelular. Su aspecto varía notablemente en los

distintos tejidos. En los preparados de rutina teñidos con Hematoxilina y Eosina (H/E) lo único que suele verse es el núcleo, que a veces contiene un nucléolo evidente. El citoplasma presenta unas prolongaciones aplanadas y pálidas que constituyen la mayor parte del volumen de la célula que por lo general no se ven porque se confunden con las fibras colágenas. Cuando estos producen matriz extracelular durante el crecimiento activo o en la reparación de heridas (fibroblastos activos) puede observarse su citoplasma más extenso e intensamente basófilo como consecuencia del aumento del retículo endoplásmico rugoso (RER) asociado a la síntesis proteica.

Como describíamos anteriormente también en este tejido se encuentra presente el miofibroblasto, que es una célula alargada y fusiforme que no se identifica con preparados de rutina teñidos con H/E. Con microscopía electrónica de transmisión los miofibroblastos muestran características típicas de los fibroblastos junto con características de las células musculares lisas. Sus prolongaciones pueden entrar en contacto con otras prolongaciones de miofibroblastos mediante uniones de hendidura. Una de las funciones del miofibroblasto es que interviene en la reparación de tejido mediante la contracción de las heridas (Ross y Pawlina, 2007).

1.5.3.2. Sustancia fundamental

Se localiza en todos los espacios y hendiduras entre los elementos figurados del tejido conectivo (fibras y células). Está constituida por agua, sales, proteínas y otras sustancias de bajo peso molecular, pero fundamentalmente está compuesta por glucosaminoglicanos (ácido hialurónico), proteoglicanos y glucoproteínas multiadhesivas. Dentro de los glucosaminoglicanos existen varios tipos, siendo los más comunes el ácido hialurónico y numerosos tipos de condroitinsulfatos. La importancia biológica de los glucosaminoglicanos es que son efectivos como material para ocupar espacios, impiden la difusión de bacterias a excepción de aquellas que son muy invasivas por la producción de la enzima hialuronidasa. Su cantidad varía en los diferentes tipos de tejido conectivo.

La sustancia fundamental es sintetizada principalmente por los fibroblastos, dando a la matriz en estado fresco una característica de viscosidad, claridad y resbaladiza al tacto. Con el microscopio óptico la sustancia fundamental se ve con poca estructura morfológica en los cortes preservados por congelación, desecación y teñidos con colorantes básicos o con la técnica de PAS. En los preparados de rutina teñidos con H/E la sustancia fundamental se pierde durante la fijación y deshidratación del tejido (Ross y Pawlina, 2007).

1.5.3.3. Fibras

Se encuentran en cantidades variables según las necesidades estructurales y funcionales del tejido en el que se ubiquen. Los tipos de fibras son las fibras colágenas, las fibras reticulares y las elásticas. Las fibras colágenas son las fibras más frecuentes del tejido conectivo, con un trayecto ligeramente ondulado, incoloras y un grosor aproximado entre 1 a 10 μm . Estas fibras están compuestas por fibras más finas, denominadas fibrillas, de 0,2 a 0,5 μm de diámetro unidas en forma paralela por un material amorfo. Las fibrillas a su vez están compuestas por microfibrillas paralelas de un diámetro de aproximadamente 50 nm que son la unidad fibrilar del colágeno y que exhiben un patrón de bandas transversales con una periodicidad de 68 nm. La subestructura de las microfibrillas de colágeno son las denominadas moléculas de tropocolágeno, que están compuestas por tres cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas alfa, arrolladas entre sí en espiral y unidas además por enlaces intramoleculares e intermoleculares, contribuyendo de esta manera a la estabilidad de la macromolécula. Estas cadenas peptídicas tienen una composición de aminoácidos como: hidroxilisina, hidroxiprolina y glicina, constituyendo 1/3 de todas las proteínas de organismo humano. La función principal de las fibras de colágeno es fortalecer el tejido conectivo y al ser flexibles le permite un cierto movimiento. Presentan gran resistencia a la tracción en sentido longitudinal. La elasticidad en sentido longitudinal es moderada, de 15-20% (Ross y Pawlina, 2007).

1.6. Criopreservación

1.6.1. Fundamentos biológicos

La criopreservación se define como el proceso por el cual células o tejidos son sometidos a bajas temperaturas, con el fin de preservar intactas sus estructuras y mantenerlos en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo (Pegg, 2007).

Los primeros intentos de utilizar frío para la conservación de material biológico se remontan al año 1700, pero fue en realidad en 1949, con el descubrimiento del glicerol como crioprotector, cuando comenzaron a realizarse análisis metódicos sobre congelación. En 1972 Whittingham y colaboradores, publicaron los resultados de sus estudios de congelación de embriones de ratón y en 1983 Trounson y Mohr publicaron su trabajo sobre el primer embarazo en humanos logrado con embriones congelados.

Cualquiera sea el método utilizado para la congelación de un sistema biológico este atraviesa cuatro etapas. En una primera fase se produce un enfriamiento del sistema con congelación, una segunda fase es la de calentamiento y se produce cuando el enfriamiento está por debajo del punto de congelación, la tercera fase es de cristalización y congelación y la última fase es la de enfriamiento después de la cristalización (Figura 4).

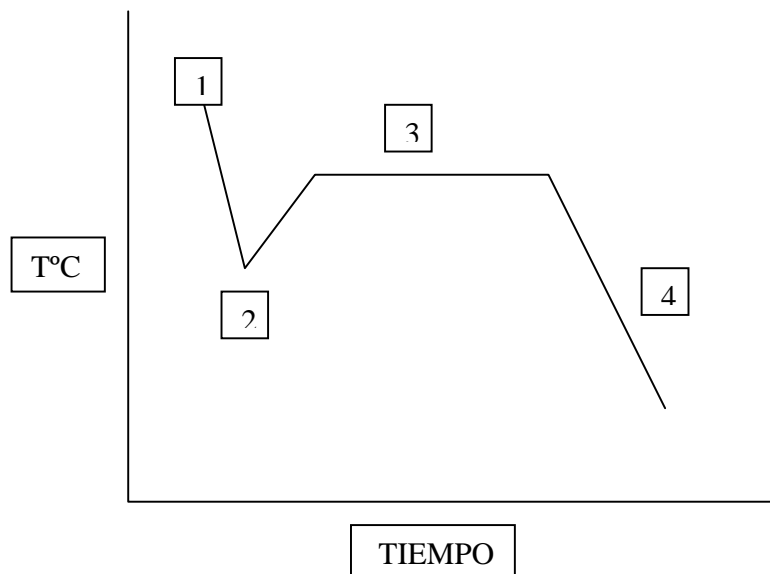


Figura 4. Etapas que atraviesa un sistema biológico durante el proceso de congelación.

El proceso de congelación podría resumirse de la siguiente manera: cuando una solución acuosa se enfría por debajo de 0°C , se produce formación de hielo, o sea que el efecto del frío hace que el agua cambie del estado líquido al sólido (hielo) sobre enfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado (Akyurt et al., 2002). Ahora bien, en muy pocas ocasiones encontraremos en la naturaleza agua en su estado puro, por lo que toda agua que encontremos en el medio ambiente estará combinada con sales. Por lo tanto es importante comprender que existe una correlación entre la temperatura a la que se somete una solución (agua, solvente) y la concentración de sales que ésta contiene (soluto). Consecuentemente, cuando una solución comienza a congelarse se forman cristales de hielo, lo que indica que a la vez que el agua se congela (cristaliza) la concentración de la solución (relación entre moléculas de agua libre y moléculas de la sal en solución) aumenta. De esta misma forma se puede decir que el punto de congelación de una solución disminuye con el aumento de la concentración de sales. Por ejemplo, el agua pura (0 % de sales) se congela a 0°C , pero la solución fisiológica, C1Na 9

%, comienza a congelarse cerca de los -5°C y alcanza su punto eutéctico a $-21,6^{\circ}\text{C}$. El punto eutéctico de una solución es el punto térmico en el cual la solución a consecuencia de la congelación misma alcanzó un punto en el que ya no hay más solvente libre en la solución, o sea que no hay más agua libre ya que toda se ha congelado produciendo como resultado la concentración máxima de las sales que estaban en solución. Volviendo al ejemplo de la solución fisiológica, ésta comienza a formar hielo (inicio de la congelación) cuando se encuentra entre -2 y -5°C , y se congelará totalmente (punto eutéctico) cuando alcanza -21°C , variando la molaridad (M: concentración de sales) de la solución inicial de 0.165 M a 6 M . La concentración de una solución varía acorde a la temperatura a la que se expone, es decir que, si la velocidad de enfriamiento es lenta el agua sale de la célula puesto que la permeabilidad de la membrana es elevada; si la velocidad es elevada el agua no sale de la célula y se congela bruscamente. La mayor parte de los sistemas biológicos son congelados a velocidades lentas de 1 a 5°C por minuto. A estas velocidades sucede en el medio extracelular una formación de hielo que provoca una disminución de la fracción líquida y un aumento de la concentración de solutos y en las células una salida del agua intracelular, un aumento de la concentración salina y una disminución del volumen celular (Vila y García, 1983).

Este proceso no está exento de problemas ya que puede inducir alteraciones en organelas y membranas celulares, y también en los tejidos a criopreservar (Woods et al., 2004). En el proceso de criopreservación se consideran períodos críticos para la supervivencia celular, a la fase inicial de congelación y al período de descongelación (Mazur, 1984). Durante la fase inicial de congelación puede producirse lesión celular como consecuencia directa de la formación de hielo intracelular (Lovelock, 1953) y por el estrés osmótico al que está sometida la membrana celular durante la congelación y descongelación. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas

entre 10 y 16° C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

Por tal motivo la congelación sin protección sería letal, es por esto que resulta necesaria la aplicación de soluciones llamadas crioprotectores.

1.6.2. Crioprotectores

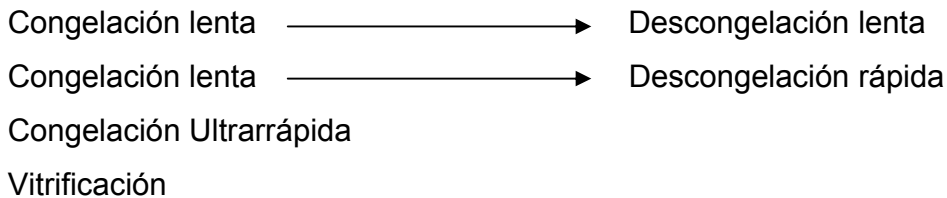
Los crioprotectores son soluciones químicas que deben tener la capacidad de ser hidrosolubles (permeables a la membrana plasmática), de baja toxicidad y que disminuyan el punto congelación. Estos pueden clasificarse de acuerdo a la permeabilidad celular en penetrantes y no penetrantes, y bioquímicamente en alcoholes (metanol, etanol, propanol, propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido (DMSO) (García, 1984; Porcu, 2001). Por lo tanto, cabe esperar, que cada grupo de células u órganos responda de distintas maneras a diferentes crioprotectores, a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de permanencia en la solución crioprotectora (Rana, 1995).

Los crioprotectores penetrantes actúan mediante un mecanismo coligativo, que se caracteriza porque al tener bajo peso molecular penetran en la célula generando una solución salina isotónica entre esta y el medio extracelular, por lo tanto estas sales disminuyen el punto de congelamiento cuanto más sales están disueltas en la célula.

Los crioprotectores no penetrantes poseen un alto peso molecular, son poco permeables a las células y actúan mediante un mecanismo de vitrificación, que consiste en la realización de un enfriamiento rápido a muy bajas temperaturas, logrando la producción de un estado cristalino en donde la célula alcanza una viscosidad lo suficientemente alta como para comportarse como un sólido amorfo sin la formación de hielo. De esta manera se reducen los niveles de toxicidad por parte de los crioprotectores y se evita la deshidratación de la célula a límites extremos logrando disminuir el rompimiento de la membrana plasmática por arrugamiento durante la congelación (Boiso, 2001; Meryman, 1971).

1.6.3. Métodos de criopreservación

A los métodos de criopreservación los podemos clasificar de acuerdo a la velocidad de congelación y descongelación en:



En la congelación lenta, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. De esta manera el frío solidifica el agua en el medio extracelular disminuyendo el volumen de agua y aumentando la concentración de solutos en ese medio. Como consecuencia de esto el agua de la célula pasa al medio extracelular, para mantener el equilibrio osmótico, generando una deshidratación controlada en la misma. De esta manera se evita una deformación extrema de la estructura de la membrana plasmática y aumenta la concentración de sales dentro de la célula produciéndose un descenso del punto de congelación que evita a su vez la formación de cristales de hielo intracelular (Mazur, 1963).

La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso de un congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30° C, para evitar la re-cristalización.

La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones por Trounson en 1986. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotectores, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido.

La vitrificación (Rally y Fahy, 1985) tampoco requiere la utilización de un congelador programable. Se basa en la congelación rápida de una mezcla de crioprotectores utilizados en altas concentraciones, que a bajas temperaturas

aumentan su viscosidad adquiriendo un aspecto amorfo similar al vidrio, del cual toma su denominación, sin formación de hielo.

1.6.4. La criopreservación en la ingeniería tisular

Diferentes estudios realizados hasta la actualidad han investigado sobre los protocolos de criopreservación para algunos órganos y tejidos. La tráquea (Tanaka et al., 2003) y el corazón (Amir et al., 2004) son algunos de los órganos que se ha logrado criopreservar; sin embargo los estudios y avances siguen siendo experimentales (Bakhach, 2009), ya que es ineludible la importancia que tiene la formación de hielo, la cual es gravemente perjudicial durante la criopreservación. El éxito en la criopreservación de órganos y tejidos requerirá de métodos que logren las condiciones de equilibrio en que el hielo no pueda formarse, sea cual sea la velocidad de enfriamiento (Elford et al., 1972; Pegg, 2006).

En el ámbito de la ingeniería tisular se ha logrado criopreservar también sustitutos de dermis alogénicos cultivados con fibroblastos sobre biomateriales a base de ácido hialurónico y atelocolágeno (Kubo y Kuroyanagi, 2005). También en estudios previos se ha demostrado que es posible criopreservar mucosa oral humana generada por ingeniería tisular con un biomaterial a base de colágeno (Spoerl et al., 2008), sin embargo no se han estudiado hasta la actualidad los protocolos de criopreservación para sustitutos de corion de mucosa oral a base de fibrina/agarosa y fibroblastos gingivales humanos generados mediante ingeniería tisular (Alaminos et al., 2007; Sánchez-Quevedo et al., 2007).

Futuras investigaciones destinadas a desarrollar métodos de criopreservación para ingeniería tisular deben por lo tanto focalizar su actividad en determinar el óptimo protocolo entre un infinito número de posibilidades. La investigación experimental y teórica es necesaria para aclarar los mecanismos de daño durante la criopreservación, y para desarrollar modelos predictivos de esos procesos deletéreos.

1.7. Control de calidad de los tejidos generados por ingeniería tisular

La ingeniería tisular se comporta como una disciplina novedosa que en la actualidad nos permite desarrollar en el laboratorio diferentes tejidos artificiales. El objetivo final de la ingeniería tisular es lograr que esos tejidos artificiales puedan ser utilizados en pacientes, por esa razón es necesario previamente que los mismos sean analizados y evaluados y que sus propiedades sean similares a la de los tejidos naturales que deben sustituir. Es por ello que el uso terapéutico de los nuevos tejidos exige el cumplimiento de protocolos sanitarios antes de su incorporación a la práctica clínica. Este control sanitario ha de hacerse a varios niveles. El primer nivel de control sanitario está vinculado al análisis macroestructural e histológico de los tejidos construidos por ingeniería tisular y al análisis de las células y los biomateriales que se utilizan para la construcción del nuevo tejido, lo que incluye el análisis de la viabilidad celular y de la biocompatibilidad de los biomateriales. Un segundo nivel vinculado al control de calidad ha de hacerse en relación con el mantenimiento y la conservación de los tejidos artificiales. El objeto es garantizar la idoneidad biológica y terapéutica y el uso diferido de ellos. En este sentido uno de los mecanismos que se utilizan para evitar la degradación de los componentes celulares de los nuevos tejidos es la criopreservación (Campos, 2004b; Dawson et al., 2003).

1.7.1. Análisis macroestructural

En relación con el control de calidad de los tejidos artificiales es necesario evaluar las características macroscópicas que poseen dichos tejidos con el objeto de establecer la consistencia y la manipulabilidad de los mismos.

1.7.2. Análisis histológico

En relación con el control de calidad de los tejidos artificiales, ha de investigarse la naturaleza histológica del tejido artificial para comprobar su carácter biomimético con el tejido nativo utilizando para ello las técnicas habituales de la histología clásica.

1.7.3. Viabilidad celular

La utilización de las células en ingeniería tisular exige evaluar la viabilidad de las mismas como una manera de valorar su capacidad para asociarse al tejido artificial y la capacidad de mantener su actividad funcional en el interior del organismo. Los métodos utilizados para evaluar la viabilidad celular en modelos experimentales *in vitro* son múltiples y variados y están basados esencialmente en criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos (Tabla I).

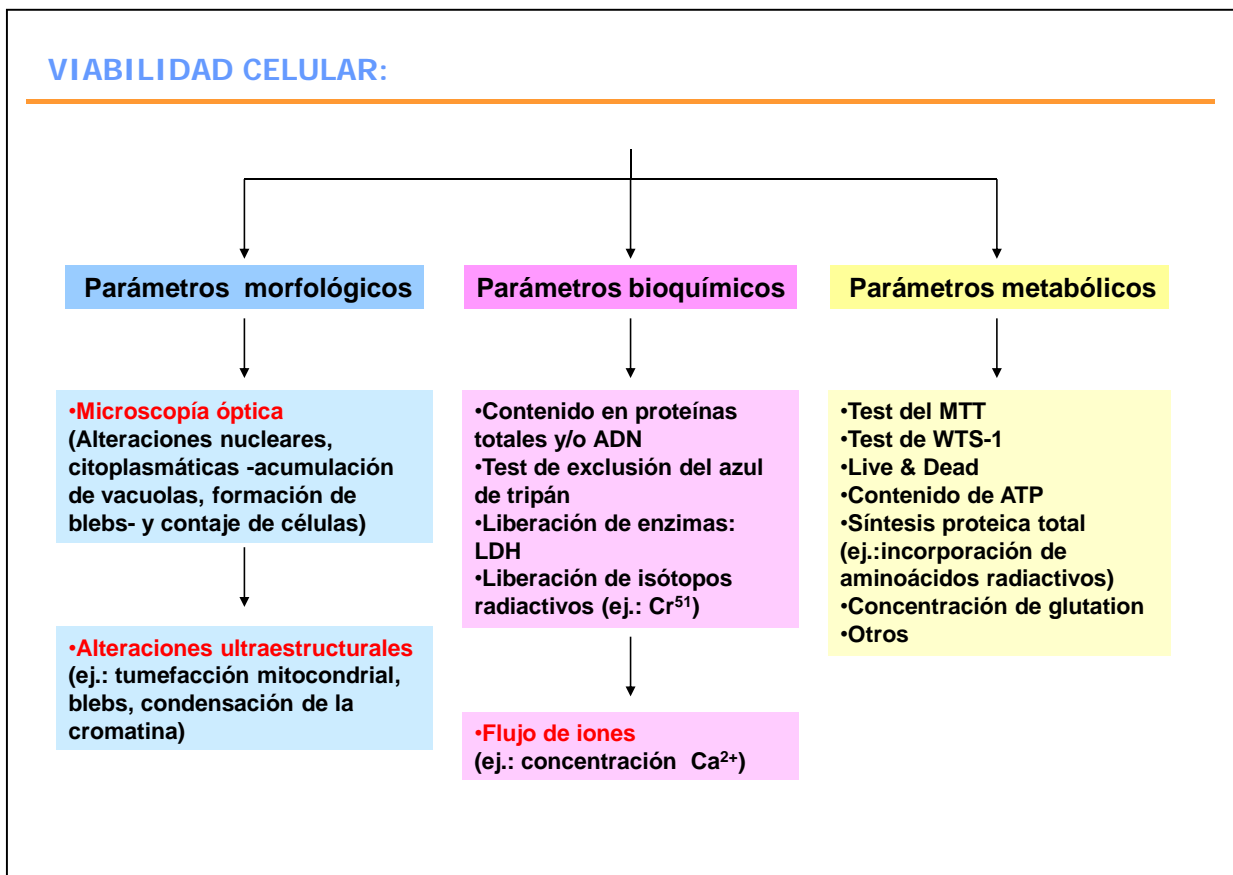


Tabla I. Tomado de Prof Dr. Fernandez Segura E.

Entre estos métodos, vamos a continuación a describir los fundamentos de los dos métodos que hemos utilizado en esta tesis doctoral, uno es el de exclusión vital de azul tripán y el otro es el de Live & Dead.

El método de exclusión vital de azul tripán permite evaluar la integridad de la membrana plasmática. El fundamento de esta técnica radica en la incapacidad de las células vivas para incorporar dicho colorante penetrando tan sólo en las células muertas cuya membrana plasmática está dañada. El tripán azul es un colorante soluble en agua cuyos grupos cargados amino y sulfato le impiden atravesar las membranas celulares intactas, por tanto tiñe sólo las células muertas o dañadas (Figura 5) (Bouillaget et al., 2000; Rodriguez et al., 2008).

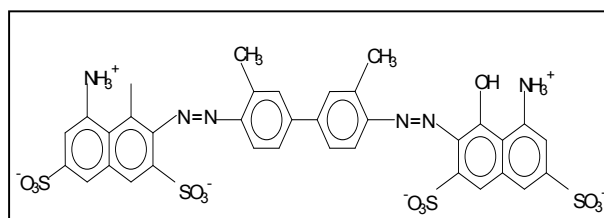


Figura 5. Fórmula química desarrollada del Azul Tripán.

El método de Live & Dead se caracteriza porque analiza también la permeabilidad de membrana pero utilizando dos tipos de colorantes, uno que necesita una etapa de metabolización intracelular (calceína-AM) y otro de exclusión vital (Ethidium homodimer-1). El fundamento de esta técnica radica en que se utiliza la calceína-AM que posee una molécula lipofílica (grupo lipofílico AM) la cual le permite atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva. Luego unas esterasas citoplasmáticas inespecíficas clivan el grupo lipofílico por hidrólisis lo que determina la emisión de una fluorescencia verde. Por tanto, las células vivas que no ven alteradas sus membranas y que poseen una buena actividad metabólica emiten una fluorescencia verde. Por el contrario, cuando las células ven alteradas sus membranas dejan penetrar al Ethidium homodimer-1 que se une al ADN del núcleo y lo tiñe con una fluorescencia roja indicando que se está en presencia de una célula muerta. Es por todo esto que el método de viabilidad de Live & Dead es considerado un método mixto ya que valora

permeabilidad de la membrana plasmática y actividad metabólica de esterasas citoplasmáticas (Dinatolo et al., 2011; Hans et al., 2012).

Existe también un método basado en la medición de la liberación de moléculas intracelulares, el cual está fundamentado, asimismo, en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de los tóxicos. Dicho método es enzimático y está basado en la medición de la enzima citosólico láctico deshidrogenasa (LDH), enzima que es liberada al medio extracelular tras graves alteraciones de la membrana plasmática. En efecto la alteración de la membrana plasmática induce el escape de estas enzimas citosólicas que se manifiesta por un aumento de la coloración rojiza en el medio de cultivo (Rodríguez et al., 2008).

1.7.4. Propiedades biomecánicas

En el campo de la ingeniería tisular, sin bien se han estudiado las propiedades biomecánicas de distintos tejidos artificiales, es importante profundizar en el conocimiento de estas propiedades en aquellos tejidos artificiales que son sometidos a procesos de criopreservación, para lo cual se hace necesario la utilización de una ciencia como lo es la reología.

La reología es la ciencia que estudia los fenómenos de deformación y flujo de los materiales (Barnes et al., 1993). En este contexto, los materiales pueden clasificarse en sólidos ó fluidos (líquidos o gases) (Macosko, 1994). Los sólidos ideales se comportan elásticamente ya que cuando se someten a un esfuerzo se deforman en respuesta a éste, y una vez que cesa recuperan su forma inicial (sólido ideal o de Hooke). La energía asociada a la aplicación del esfuerzo se almacena como energía potencial elástica, y es recuperada completamente al cesar el esfuerzo. Por el contrario, los fluidos ideales experimentan una deformación monótonamente creciente con el tiempo (flujo) al ser sometidos a un esfuerzo, y al cesar éste no se recupera en absoluto la forma inicial. La energía asociada a la aplicación del esfuerzo se disipa en el líquido en forma de calor (disipación viscosa), esto quiere decir que no puede ser recuperada al desaparecer el esfuerzo (Macosko, 1994).

Los materiales reales no son ni sólidos ideales ni líquidos ideales (Macosko, 1994). Los sólidos reales pueden ser deformados irreversiblemente bajo la aplicación de una fuerza suficientemente grande (Macosko, 1994). Por ejemplo: por encima de un determinado valor del esfuerzo, el acero, un sólido típico, se deforma irreversiblemente, como en el caso de la chapa de acero, cuando se moldea bajo una prensa formando tapas de motor o techos de automóvil.

Sólo unos pocos líquidos importantes en la técnica o en la práctica se comportan como líquidos ideales. La mayoría de los líquidos presentan un comportamiento reológico que incluye una cierta elasticidad, es decir, una característica típica de los sólidos (Barnes, 1993).

Podemos decir por tanto, que los materiales reales poseen características tanto propias de los líquidos ideales (comportamiento viscoso) como de los sólidos ideales (comportamiento elástico). Se dice entonces que los materiales reales son tanto viscosos como elásticos; es decir, son materiales viscoelásticos (Barnes, 1993; Macosko, 1994). Estos materiales viscoelásticos se caracterizan por mostrar un flujo viscoso combinado con deformación elástica cuando se los somete a un esfuerzo. Este es el comportamiento típico de los materiales poliméricos (Larson, 1999).

Clasificados los diferentes cuerpos el problema básico de la reología es determinar la relación existente entre el esfuerzo aplicado y la deformación producida en un material de una naturaleza físico-química dada. Esta relación es conocida para sólidos elásticos sometidos a pequeñas deformaciones como la Ley de Hooke, y para líquidos sencillos y gases como Ley de Newton de la viscosidad (Macosko, 1994). Sin embargo, no siempre existe una relación lineal entre esfuerzo y deformación debido a complejidades en la estructura y morfología de algunos materiales.

La reología resulta interesante para cuantificar fenómenos relacionados con la estabilidad física, sedimentación y redispersión, ya que nos permite conocer de una forma indirecta la estructura interna de los sistemas (Larson, 1999).

La reología tiene aplicación en diversos campos: para el fisiólogo, la reología gobierna la circulación de la sangre y los grandes vasos; para el médico,

la fluidez de las soluciones que se inyectan con jeringas hipodérmicas o que se inyectan por vía intravenosa; para el farmacéutico, la reología es importante en la preparación de la mayor parte de las formas farmacéuticas.

La reometría es la parte experimental de la reología, para la cual se emplea un aparato llamado reómetro con el que se mide el flujo macroscópico, que a su vez es consecuencia de los cambios microestructurales que se producen en el seno del material (invisibles a simple vista) (Macosko, 1994). Existen dos modos básicos de caracterización reológica experimental de un material: uno se refiere a las medidas en estado estacionario o viscosimetría, y el otro a las medidas en régimen dinámico u oscilometría (Barnes, 1993). En el primero el material objeto de estudio se somete a un esfuerzo constante y se mide la deformación resultante en función del tiempo. A partir de este tipo de medida se puede conocer si el material tiene un comportamiento marcadamente elástico (no fluye) o marcadamente viscoso (fluye). En este último caso se obtiene la viscosidad, como relación entre el esfuerzo aplicado y la velocidad con la que se deforma el material. Es habitual en muchos materiales la existencia de un esfuerzo mínimo por debajo del cual no existe flujo durante el tiempo de medida, mientras que por encima de él el material fluye. A esto se le conoce como esfuerzo umbral, y para caracterizarlo es usual someter el material a rampas de esfuerzos de valor creciente. A la representación gráfica resultante en la forma esfuerzo de cizalla vs velocidad de deformación se la conoce como reograma, y a la pendiente correspondiente a la zona de flujo como viscosidad dinámica (Barnes, 1993).

Para el caso de los materiales con comportamiento marcadamente viscoso y elástico, es habitual realizar experimentos en régimen dinámico. En este tipo de experimentos, el material se somete a esfuerzos oscilatorios (sinusoidales) de amplitud y frecuencia dada. A partir de la relación, tanto en amplitud como en fase, entre la deformación resultante y el esfuerzo aplicado, se obtienen los llamados módulos elástico o de almacenamiento (G') y viscoso o de pérdidas (G'') (Barnes, 1993). Estas magnitudes (módulos) cuantifican tanto el carácter elástico como el viscoso del material. Así, un material marcadamente elástico tendrá un valor de G' varios órdenes de magnitud superior al de G'' . Lo contrario ocurriría para un

material marcadamente viscoso. Es habitual someter los materiales tanto a experimentos oscilométricos en los que la frecuencia se mantiene fija y la amplitud del esfuerzo variable (barridos de amplitud) como a experimentos en los que la amplitud del esfuerzo se mantiene fija y la frecuencia variable. Ello permite caracterizar la respuesta viscoelástica del material para distintas condiciones experimentales, que simulen situaciones de utilidad práctica (Barnes, 1993).

La reología, en consecuencia, resulta interesante para cuantificar fenómenos relacionados con la estabilidad física, y los cambios que tienen lugar en los materiales a escala microscópica. En el caso de los biomateriales, las propiedades biomecánicas (reológicas) son además sustanciales para muchos procesos asociados a sus funciones. Por ejemplo, los tejidos de la faringe han de tener unas determinadas propiedades mecánicas para poder emitirse sonidos de frecuencia audible. La reología permite pues comprobar si los biomateriales que deben ser injertados en los individuos, poseen las propiedades biomecánicas adecuadas, para lo cual es necesario realizar una completa caracterización reológica de estos (Meyers et al., 2008). Las propiedades viscoelásticas de tejidos blandos intraorales han sido estudiadas bajo diferentes metodologías (Inoue et al., 1985; Yatabe, 1991; Roodenburg et al., 1990; Birch y Srodon 2009; Kutti y Webb, 2009). Si bien la viscoelasticidad ha sido evaluada en sustitutos de corion de mucosa oral a base de fibrina y agarosa generados por ingeniería tisular (Rodríguez et al., 2011), las propiedades reológicas en estos sustitutos sometidos a criopreservación no han sido estudiados hasta ahora.

En la presente tesis doctoral desarrollamos distintos protocolos de criopreservación de sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular y con la finalidad de realizar un control de calidad de estos tejidos artificiales, hemos llevado a cabo análisis macroestructurales, histológicos, de viabilidad celular y de propiedades biomecánicas en dichos tejidos.

2-OBJETIVOS

Objetivo General:

Generar sustitutos de corion de mucosa oral mediante ingeniería tisular y realizar un control de calidad de estos tejidos artificiales a través de análisis macroestructurales, histológicos, de viabilidad celular y de sus propiedades biomecánicas cuando los mismos son sometidos a un proceso de criopreservación utilizando distintas soluciones crioprotectoras.

Objetivos Específicos:

1. Generar sustitutos de corion de mucosa oral de fibrina y agarosa al 0,1% con fibroblastos gingivales humanos mediante ingeniería tisular.

2. Someter a los sustitutos de corion de mucosa oral a un proceso de criopreservación con las distintas soluciones crioprotectoras estandarizadas que se utilizan en los Bancos de Tejidos.

3. Evaluar el comportamiento macroestructural de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular tras la utilización de los distintos protocolos de criopreservación.

4. Realizar un análisis histológico mediante microscopía óptica de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular en las distintas condiciones de criopreservación.

5. Evaluar la viabilidad celular en poblaciones celulares aisladas y a nivel tisular de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular en los distintos protocolos de criopreservación.

6. Evaluar las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular sometidos a los distintos protocolos de criopreservación.

3-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de muestras de mucosa oral humana

En la presente tesis doctoral, se obtuvo un total de 10 muestras de mucosa oral masticatoria normal de espesor total (epitelio y corion) procedentes de 10 pacientes sometidos a diferentes procedimientos de cirugía oral ambulatoria bajo anestesia local. Todos los pacientes seleccionados para este trabajo no presentaron enfermedad sistémica grave, proceso neoplásico asociado o enfermedad infectocontagiosa. Los mismos fueron tratados en el Máster de Periodoncia e Implante que se desarrolla en la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada (España) y en todos los casos, se contó con el consentimiento informado de los pacientes.

Inmediatamente después de obtenidas las muestras, fueron introducidas en un medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955, Steinheim, Germany) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

3.2. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos

Para realizar la separación de epitelio-corion se incubaron las muestras en disipasa al 2 % durante 12 horas a 4° C. Posteriormente y una vez separado el corion del tejido epitelial, se llevó a cabo la digestión de la matriz extracelular con la finalidad de conseguir la separación de los fibroblastos gingivales incluidos en dicha matriz. Para ello las muestras fueron incubadas a 37° C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium hystolicum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 12 horas. Esta solución de colagenasa permite digerir el colágeno del corion y liberar los fibroblastos. Para la obtención de los fibroblastos, el corion sometido a colagenasa se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos con una temperatura de 21° C (Omnifuge 2.0 RS), y se recogió el

pellet celular correspondiente a los fibroblastos para posteriormente colocarlos en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie (Corning® Flash, NY, USA). Como medio de cultivo, se utilizó DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665, Taufkirchen, Germany) al 10 %. En todos los casos, las células fueron incubadas en una estufa a 37° C con un 5 % de dióxido de carbono (Nuair DH Autoflow), en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días (Sánchez-Quevedo et al., 2007).

3.3. Sub-cultivo de fibroblastos procedentes de cultivos primarios de mucosa oral

Alcanzada la confluencia celular, los cultivos celulares se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) estéril y se incubaron en 2 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37° C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión entre las células y de estas a la superficie del frasco de cultivo, con la finalidad de obtener fibroblastos individualizados. Cumplidos los 10 minutos, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante la adición de 2 ml de medio de cultivo DMEM. La presencia de abundantes proteínas séricas en el medio de cultivo DMEM es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se re-suspendió cuidadosamente en 5 ml de medio DMEM y parte de las células se cultivaron en frascos de cultivo de 15, 25 ó 75 cm² de superficie, para su utilización en subcultivos posteriores (Sánchez-Quevedo et al., 2007).

3.4. Desarrollo de la matriz extracelular: elaboración de un sustituto de corion de la mucosa oral

En esta tesis doctoral se elaboró un sustituto de corion de mucosa oral, cuyo protocolo de elaboración se expone a continuación:

En cabina de flujo laminar (Telstar AV-100) para 30 ml de fibrina y agarosa:

- Plasma	22,8 ml
- DMEM +150.000 células/ml	2,25 ml
- Ácido Tranexámico	450 µl
- Agarosa 2 %	1,5 ml
- Cl ₂ Ca	3 ml

Para la creación de los sustitutos de corion de mucosa oral, se utilizó 22,8 ml de plasma sanguíneo humano que procedía de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, España) y con el seguimiento de las normas y recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT).

Posteriormente se añadió al plasma sanguíneo humano 2,25 ml de medio de cultivo DMEM con fibroblastos en una concentración de 150.000 cel/ml. Para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina, se incorporó 450 µl de ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides Ecofarma, Valencia, España). Posteriormente se incorporó 1,5 ml de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045). Previamente la agarosa sólida se disolvió al 2 % (v/v) en PBS, calentando la mezcla hasta ebullición para favorecer la disolución de la agarosa. Esta solución de agarosa al 2 % en PBS se esterilizó a 120° C y 2 atmósferas de presión mediante auto-clavado. Para la fabricación de los sustitutos corion, se incubó a baño María el gel de agarosa hasta alcanzar el punto de fusión, momento en el que fue agregada a la mezcla de fibrina, hasta obtener una concentración final de 0,1 %.

Finalmente, la reacción de coagulación de la fibrina se precipitó mediante la adición de 3 ml de Cl_2Ca a la mezcla, e inmediatamente, se alicuotó en recipientes estériles de cultivo celular (Transwell 3450 de 6 pocillos, Corning, NY 14831, USA), 4 ml de la solución en cada pocillo y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los pocillos con la solución se dejaron en el incubador a 37°C con un 5 % de CO_2 , durante 2 horas para que coagularan y secan. Después de este tiempo los geles o constructos o sustitutos de corion fueron cubiertos en su totalidad con 2 ml de medio de cultivo DMEM. Los medios de cultivos fueron renovados cada tres días (Sánchez-Quevedo et al., 2007).

3.5. Proceso de criopreservación de los sustitutos de corion de la mucosa oral

Para la conservación a corto plazo de los sustitutos de corion y con la finalidad de mantener la viabilidad celular a bajas temperaturas, después de 7 días de elaborados los sustitutos de corion, se sometieron a un proceso de criopreservación en nitrógeno líquido. Para ello se procedió a la preparación de las distintas soluciones crioprotectoras siguiendo los distintos protocolos del Banco de Tejidos de Granada.

3.5.1 Soluciones crioprotectoras

- Solución de criopreservación A

En cabina de flujo laminar las proporciones para 100 ml:

- Medio TC 199	70 ml
- DMSO	15 ml
- Albúmina al 20 %	15 ml

Se mezclaron el TC 199 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) y el DMSO (Merck, Damstadt, Germany), se enfriaron a 4°C y posteriormente se agregó la albúmina fría (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).

- Solución de criopreservación B

En cabina de flujo laminar las proporciones para 100 ml:

- Medio DMEM	70 ml
- SBF	20 ml
- DMSO	10 ml

- Solución de criopreservación C

En cabina de flujo laminar las proporciones para 100 ml:

- Medio QC	90 ml
- Glicerol (Merk, Damstad, Germany)	10 ml

Todas las soluciones una vez elaboradas se mantuvieron a 4° C.

3.5.2 Protocolo de congelación

Los sustitutos de corion a los 7 días de elaborados se retiraron de los pocillos correspondientes con bisturí y microespátulas estériles (Corning® incorporated, NY, USA) manteniendo su forma original, y fueron trasladados a placas de petri (Corning® Incorporated, NY, USA) donde se cubrieron en su totalidad cada uno de ellos con una solución crioprotectora diferente, las cuales estaban refrigeradas a 4° C. Las muestras fueron sometidas a un proceso de congelación lenta para evitar un choque térmico demasiado brusco. En un primer momento los sustitutos de corion de mucosa oral con las distintas soluciones crioprotectoras fueron mantenidos con hielo durante 30 minutos. Posteriormente las muestras se llevaron -40° C durante las primeras 24 horas y a -80° C durante 48 horas. Finalmente, fueron trasladados a un tanque con nitrógeno líquido (inicialmente en fase vapor y después en fase líquida), donde se almacenaron por un periodo de 7 días.

Los controles respectivos fueron sustitutos de corion de mucosa oral no expuestos a un proceso de criopreservación (CF) y sustitutos de corion expuestos a criopreservación (CS) sin solución crioprotectora.

3.5.3 Protocolo de descongelación

El protocolo de descongelación para los sustitutos de corion criopreservados, fue la descongelación rápida, la cual consistió en exponer las muestras a temperatura ambiente.

Posteriormente a la descongelación, las muestras se lavaron inmediatamente dos veces en PBS para eliminar las soluciones crioprotectoras y se procedió a realizar los distintos ensayos planteados en los objetivos.

A modo de resumen en el siguiente esquema (Figura 6) se muestra el modelo experimental seguido en esta tesis doctoral. Asimismo, el total de sustitutos de corion analizados por grupo experimental fue de 20 muestras independientes siendo un total de 100 muestras las evaluadas.

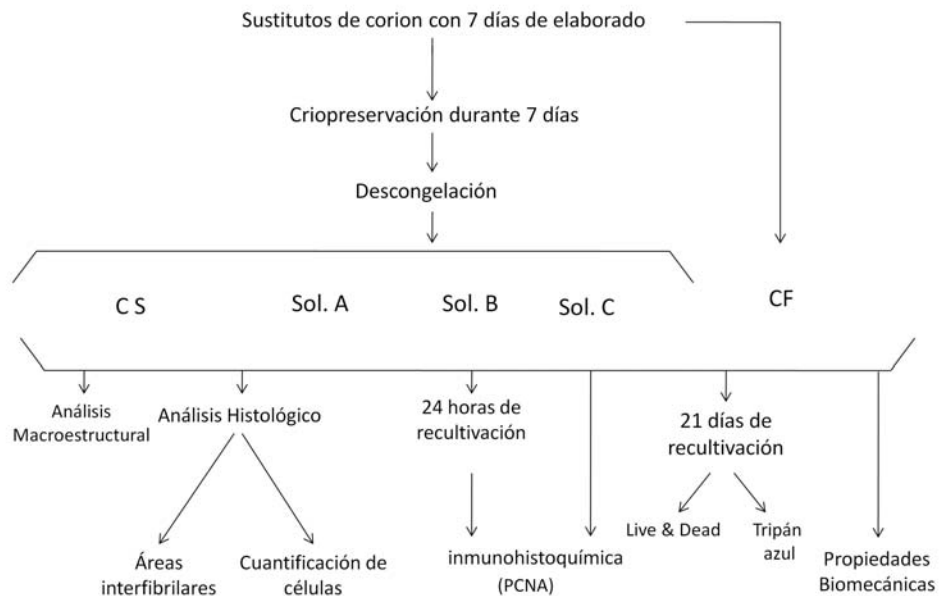


Figura 6. Diagrama del trabajo experimental.

3.6. Control de calidad de los tejidos generados por ingeniería tisular

3.6.1. Análisis macroestructural de los sustitutos de corion de mucosa oral

Finalizado el proceso de descongelación, 5 sustitutos de corion por cada grupo experimental fueron retirados de los pocillos correspondientes con microespátulas estériles (Corning® incorporated 3012, NY, USA) y posteriormente fueron manipulados con pinzas de algodón para valorar su consistencia. Además su morfología fue fotografiada con una cámara (Sony DSC-T10, Japan) para realizar una comparación con sus controles.

3.6.2. Análisis histológico mediante microscopía óptica de los sustitutos de corion de mucosa oral

Como comentamos en el apartado anterior, una vez finalizado el proceso de descongelación, de 2 sustitutos de corion por grupo experimental se extrajeron muestras de 8 mm de diámetro con un punzón estéril para biopsia dérmica (Biopsy Punch, Seki, Japan), las cuales fueron fijadas en formol al 4 % durante 24 horas y a 4° C. Posteriormente fueron lavadas 3 veces en PBS y sometidas a un proceso de deshidratación en alcoholes de concentración creciente (Shandon Citadle 2000) e incluidas luego en bloques de parafina (Microm EC 350-1). A continuación se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo (Microm HN 315) y las muestras fueron teñidas siguiendo el protocolo para hematoxilina/eosina.

Para llevar a cabo el análisis estructural en los sustitutos de corion, se realizó una medición de las áreas interfibrilares y la cuantificación de células.

3.6.2.1. Áreas interfibrilares

Para la medición del patrón de porosidad de las áreas interfibrilares, por cada grupo experimental se seleccionaron de los cortes histológicos 5 áreas al azar observadas con aumento de 200X utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse con una cámara digital DXM 1200C (Melville, NY). Las imágenes

obtenidas fueron analizadas, por un lado, con el programa MacBiophotonic Image J, y por el otro, mediante un programa informático NIS- Elements (Nikon, Japan). En ambos análisis se obtuvo una media con su correspondiente desviación estándar.

3.6.2.2. Cuantificación de células

Para la cuantificación de células por cada grupo experimental se seleccionaron de los cortes histológicos 6 áreas al azar observadas con un aumento de 200X utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse con un programa informático NIS-Elements (Nikon, Japan). Se realizó el conteo de las células existentes en cada área obteniendo una media con su desviación estándar.

3.6.3. Viabilidad celular mediante el estudio inmunohistoquímico de proliferación celular (PCNA)

Una vez descongeladas las muestras se realizó la técnica inmunohistoquímica de PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular), para lo cual se siguieron dos protocolos:

- 1- Unas muestras fueron fijadas de inmediato a la descongelación.
- 2- Y otras fueron cubiertas nuevamente con medio de cultivo DMEM y llevadas a 37° C con un 5 % de CO₂, durante 24 horas, para posteriormente ser fijadas.

Se utilizaron para este análisis 4 sustitutos de corion por cada grupo experimental. Para cada protocolo se utilizaron 2 muestras por grupo experimental.

Una vez fijadas y montadas en portaobjetos, las muestras fueron desparafinadas en xilol e hidratadas en concentraciones de alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. Posteriormente se colocaron en tampón citrato con un pH de 6 durante 40 minutos a 95° C para lograr la recuperación antigénica. Los sitios antigénicos inespecíficos fueron bloqueados utilizando suero de caballo (Vector U1118) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó la incubación del anticuerpo primario diluido en suero de

bloqueo (Vectastain Universal Quick Kit) 1:1000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario (anti-mouse Panespecific Universal Secondary antibody) fue incubado durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se incubaron en estreptavidina peroxidasa de rábano. Para la detección de la reacción colorimétrica, se utilizó diamino bencidina, que adquiere un color marrón oscuro cuando es oxidada por la peroxidasa. Todos los pasos se realizaron en cámara húmeda, evitando la desecación de las muestras. Una vez llevada a cabo la reacción inmunológica, contando con la presencia de controles positivos y negativos, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron utilizando cubreobjetos de vidrio. La observación se realizó en un microscopio Nikon Eclipse con un programa informático NIS-Elements (Nikon, Japan) y una cámara digital DXM 1200C (Melville, NY).

Para determinar el porcentaje de células PCNA positivas, es decir, células con sus núcleos inmunoteñidos, se realizó en el microscopio óptico un recuento total de 200 células en distintos campos con un aumento de 200X por área (Garzon et al., 2009).

3.6.4. Viabilidad celular mediante el método de recultivación

Una vez finalizado el proceso de descongelación, de 4 sustitutos de corion por grupo experimental se extrajo una muestra de 8 mm de diámetro con un punzón estéril para biopsia dérmica (Biopsy Punch, Seki, Japan). Posteriormente la muestra fue seccionada con bisturí hasta lograr pequeños explantes que inmediatamente fueron resuspendidos con 5 ml de medio de cultivo DMEM en frascos de cultivos de 15 cm², y llevados a 37° C con un 5 % de dióxido de carbono para permitir así la migración y recultivación de los fibroblastos gingivales humanos durante 21 días. Transcurrido este período, para poder evaluar la viabilidad celular se realizó un conteo de células utilizando 2 muestras para un ensayo basado en fluorescencia llamado Live & Dead® y las otras 2 muestras para la técnica de exclusión vital de Azul Tripán.

3.6.4.1. Técnica de Live & Dead

La técnica de Live & Dead consta de un kit (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) que contiene Calcein-AM, encargado de teñir las células vivas de color verde, y Ethidium homodimer-1 encargado de teñir los núcleos de las células muertas de color rojo (Hans et al., 2012).

Una vez transcurrido los 21 días de la recultivación, se eliminó el medio de cultivo DMEM y se realizó un lavado utilizando 5 ml de PBS. Posteriormente se colocaron 5 µl de Ethidium homodimer-1, 1,25 µl de Calcein-AM y 2,5 ml de PBS en contacto con las células y se incubaron durante 5 minutos a resguardo de la luz. Su observación se realizó en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti con cámara Nikon Intensilight C-HGFI y un programa informático NIS-Elements (Nikon, Japan). Se valoraron 60 áreas con un aumento de 400X, correspondiente a dos ensayos independientes para cada grupo experimental. Para el conteo de células se utilizó el programa MacBiophotonic Image J y para determinar el porcentaje de células viables se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células viables} = 100 \times \frac{\text{número de células con fluorescencia verde}}{\text{número total de células}}$$

3.6.4.2. Técnica de exclusión vital de Azul Tripán

La técnica de exclusión del azul tripán permite evaluar la integridad de la membrana plasmática a través de la microscopía óptica. El azul tripán es un colorante soluble en agua cuyos grupos cargados amino y sulfato le impiden atravesar las membranas celulares intactas y por tanto tiñe sólo las células muertas cuya membrana plasmática está dañada (Rodríguez et al., 2008).

La metodología llevada a cabo para evaluar la viabilidad de células fue la siguiente:

- Los fibroblastos presentes en los frascos de cultivos se individualizaron mediante tripsinización y una vez obtenido el pellets celular, estas se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo DMEM.
- Se procedió a la extracción de 500 µl de medio cultivo DMEM con fibroblastos y se le adicionó 500 µl de la solución 0,4 % de tripán azul, incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Tras la incubación, se procede a extraer 10 µl de la suspensión celular depositándola sobre la cámara de Neubauer.
- Finalmente, se procedió al recuento de células mediante un microscopio óptico (Nikon, Japan) determinando el número de células que captan la solución del azul tripán (color azul intenso), evaluando un total de 100 células en cada condición experimental. Para determinar el porcentaje de células viables se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células viables} = 100 \times \frac{\text{número de células que captan el colorante}}{\text{número total de células}}$$

3.6.5. Análisis de las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral

Los estudios reológicos fueron realizados en el Departamento de Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (España) y bajo la coordinación del Prof. Dr. Juan de Dios García López-Durán y el Prof. Dr. Modesto Torcuato López-López.

Para los ensayos de las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion en las distintas situaciones experimentales, el protocolo de análisis fue el siguiente:

Los sustitutos de corion de fibrina y agarosa al 2 % fueron sometidos a ensayos reológicos de viscosimetría y oscilometría. Para dichos estudios se utilizó un reómetro de esfuerzo controlado marca Bohlin CS10 (Bohlin instruments, England) usando una geometría de medida plato-plato (Figura 7).



Figura 7. Reómetro de esfuerzo controlado usando una geometría de medida plato-plato.

Para el análisis, la muestra fue colocada sobre una placa inferior que poseía una temperatura similar a la corporal (producto de un circuito de agua interno) y se apoyó sobre la misma una placa superior plana de 40 mm de diámetro. El gap (constante de análisis que representa la distancia entre la placa superior e inferior) se reguló según el espesor de la muestra y rondó entre 1 y 2 mm. Todas las determinaciones fueron realizadas a una temperatura de $36,0 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$, para lo cual se adicionó a un dispositivo de la placa superior agua destilada que generó vapor de agua con la finalidad de que la muestra mantenga la humedad original. Es importante destacar que la temperatura de trabajo permite termostatar la muestra a los fines de que las propiedades de viscosidad no se alteren y se puedan obtener análisis fiables. Para ayudar a establecer esta situación una vez colocada la muestra entre los platos se esperó 5 a 10 minutos (Figura 8) (Rodríguez et al., 2011). Se analizaron 5 muestras por grupo experimental.

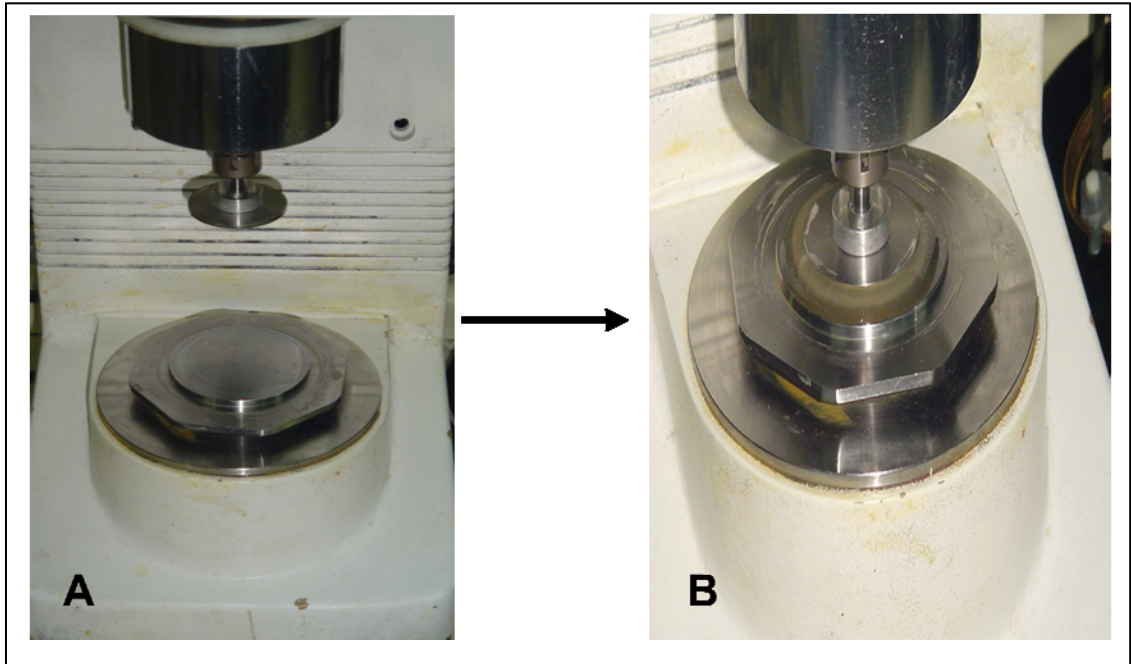


Figura 8. A- Sistema plato-plato con su base termostatizada. **B-** Sustituto de corion entre los dos platos con el gap ajustado y listo para comenzar la medición.

Las constantes de trabajo del aparato para cada uno de los análisis fueron las siguientes:

- Viscosimetría (rampas de esfuerzo de cizalla de valor creciente):

Gap: se reguló según tamaño de la muestra

Esfuerzo inicial de la rampa: 0,06 Pa

Esfuerzo final de la rampa: 20 Pa

Toma de puntos de esfuerzo de forma logarítmica en la rampa

Duración de la rampa: 180 segundos

Número de puntos: 60

Tras los análisis de viscosimetría, y antes de comenzar con los de oscilometría, se dejó reposar la muestra 5 minutos.

- Oscilometría (barridos de amplitud de esfuerzo creciente a frecuencia constante):

Gap: se reguló según tamaño de la muestra

Frecuencia: 1Hz

Amplitud inicial del esfuerzo: 0,06 Pa

Amplitud final del esfuerzo: 20 Pa

Tiempo de espera: 3 segundos

Toma de puntos de esfuerzo de forma logarítmica en la rampa

Número de puntos: 60

- Oscilometría (barridos de frecuencia creciente con amplitud de esfuerzo constante):

Gap: se reguló según tamaño de la muestra. En todos los casos fue inferior a 2 mm.

Tiempo de espera: 3 segundos

Amplitud de esfuerzo: 0,5 Pa

Número de puntos: 60

Con el objeto de limitar los efectos de las fuerzas inerciales hasta el punto de que fueran despreciables, limitamos la frecuencia de trabajo a un máximo de 7 Hz. Este valor se eligió siguiendo las recomendaciones de Ferry (1980) en donde se relaciona la densidad y viscosidad de la muestra con la frecuencia de oscilación y la distancia de confinamiento (gap) de modo que los efectos de la fuerzas de inercia en las medidas oscilométricas sean despreciables.

3.7. Tratamiento estadístico

Para identificar las muestras entre dos grupos concretos se realizó la prueba de Mann-Whitney. En el estudio estadístico se asumió como máximo un error alfa del 5 % ($p < 0.05$) en todas las pruebas realizadas.

4- RESULTADOS

Los resultados de esta tesis doctoral se exponen a continuación:

4.1. Análisis macroestructural de los sustitutos de corion de mucosa oral

El análisis de la macroestructura y de la consistencia de los distintos sustitutos de corion sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras A, B y C, pone de relieve la existencia de escasas modificaciones de los mismos (Figura 11, 12, 13) similar a lo que sucede con los controles no sometidos a criopreservación (CF) (Figura 9). La excepción la constituye el sustituto de corion que fue criopreservado sin crioprotector (CS), cuya estructura sufrió desgarros que impedían su correcta manipulación (Figura 10).

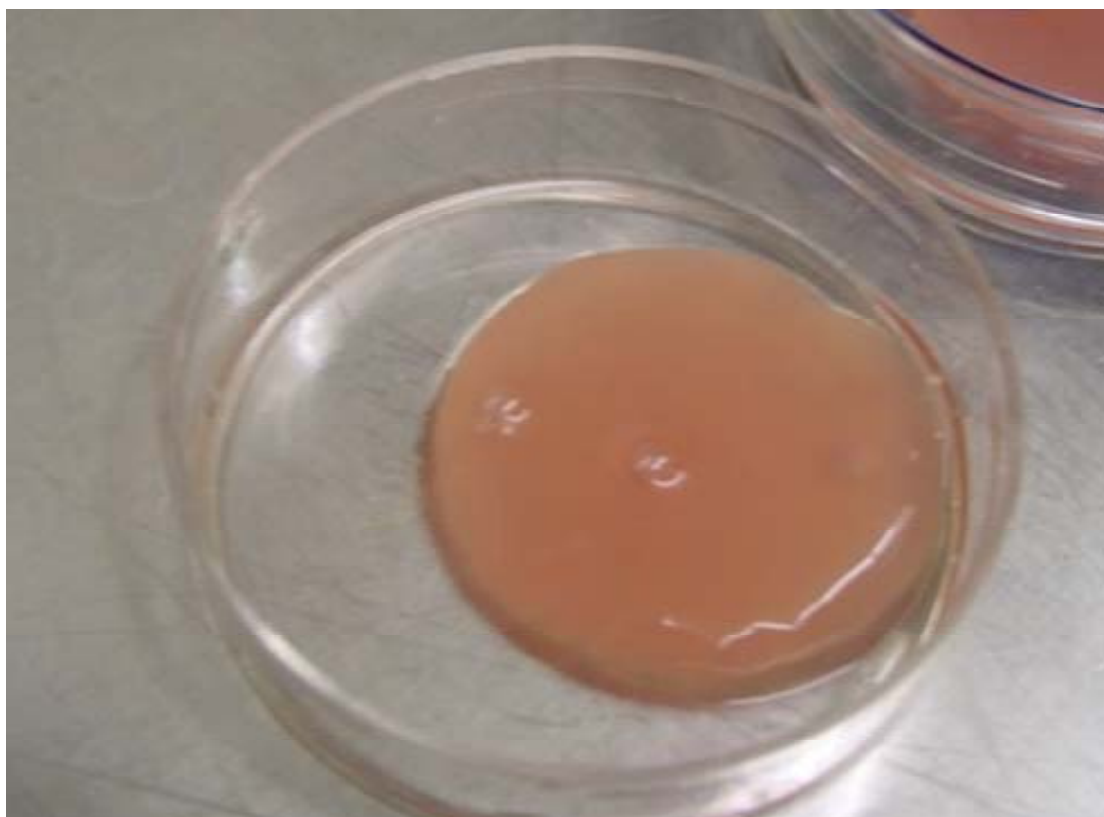


Figura 9. Se observa la macroestructura del sustituto de corion **control** sin criopreservar (CF). Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes.



Figura 10. Se observa la macroestructura de los sustitutos de corion criopreservados **sin solución** crioprotectora (SC). Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes.

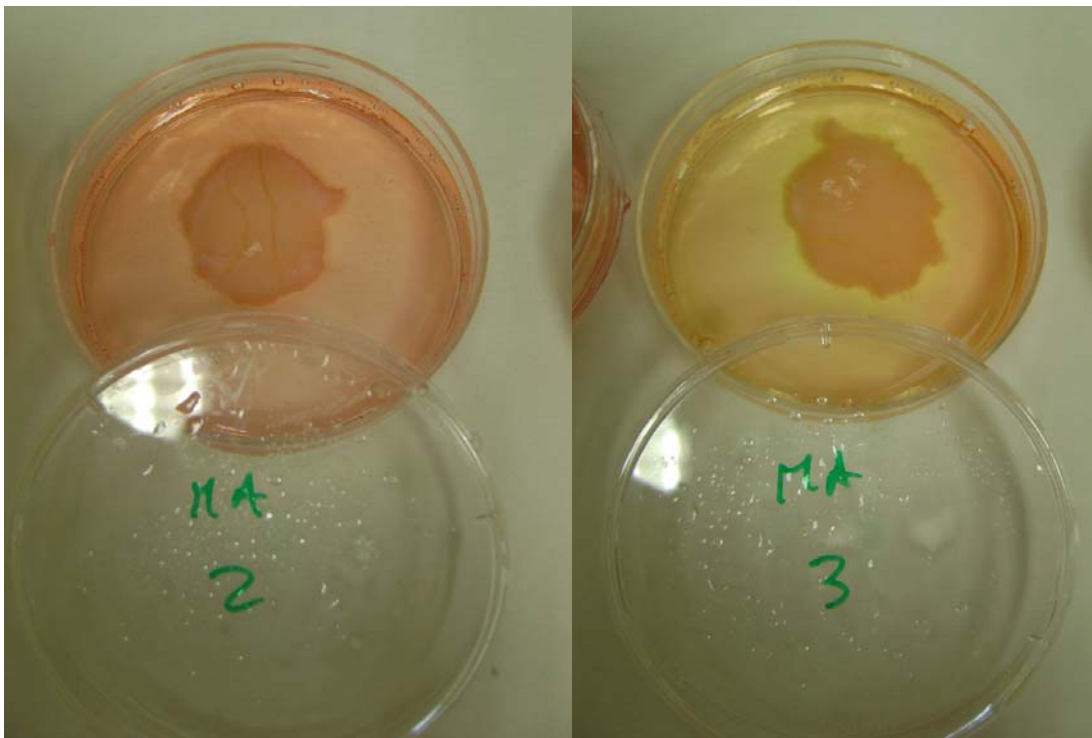


Figura 11. Se observa la macroestructura de los sustitutos de corion criopreservados con **solución A**. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes.

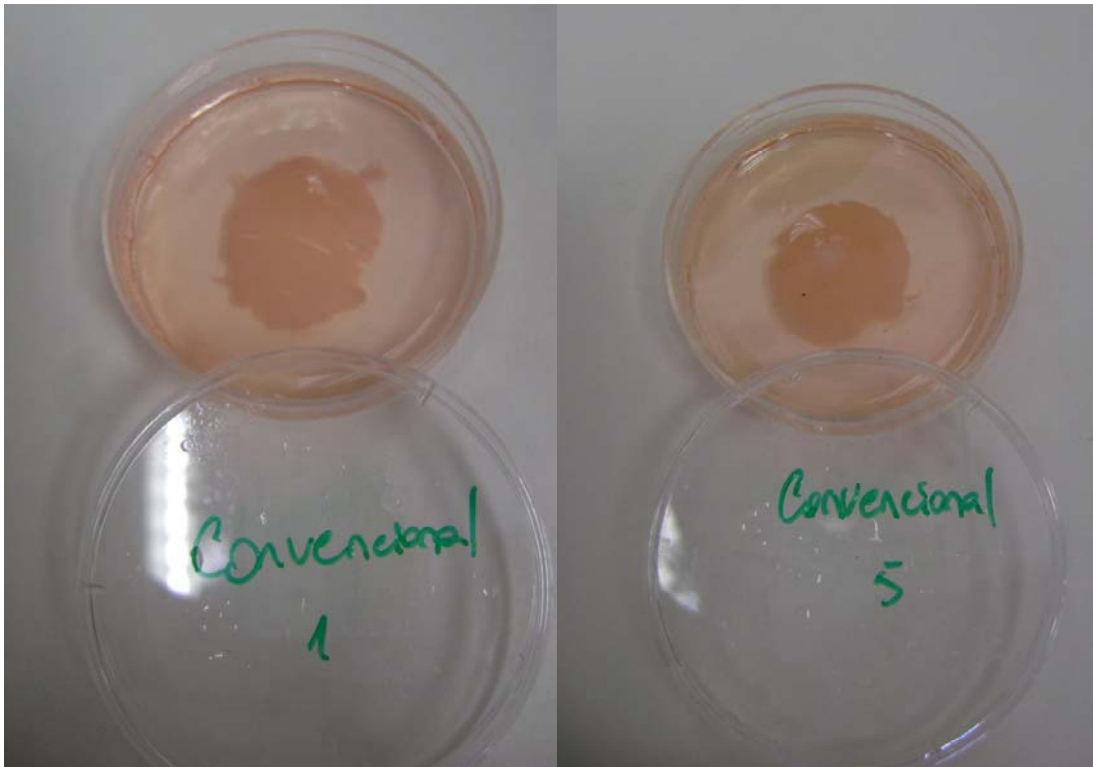


Figura 12. Se observa la macroestructura de los sustitutos de corion criopreservados con **solución B**. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes.

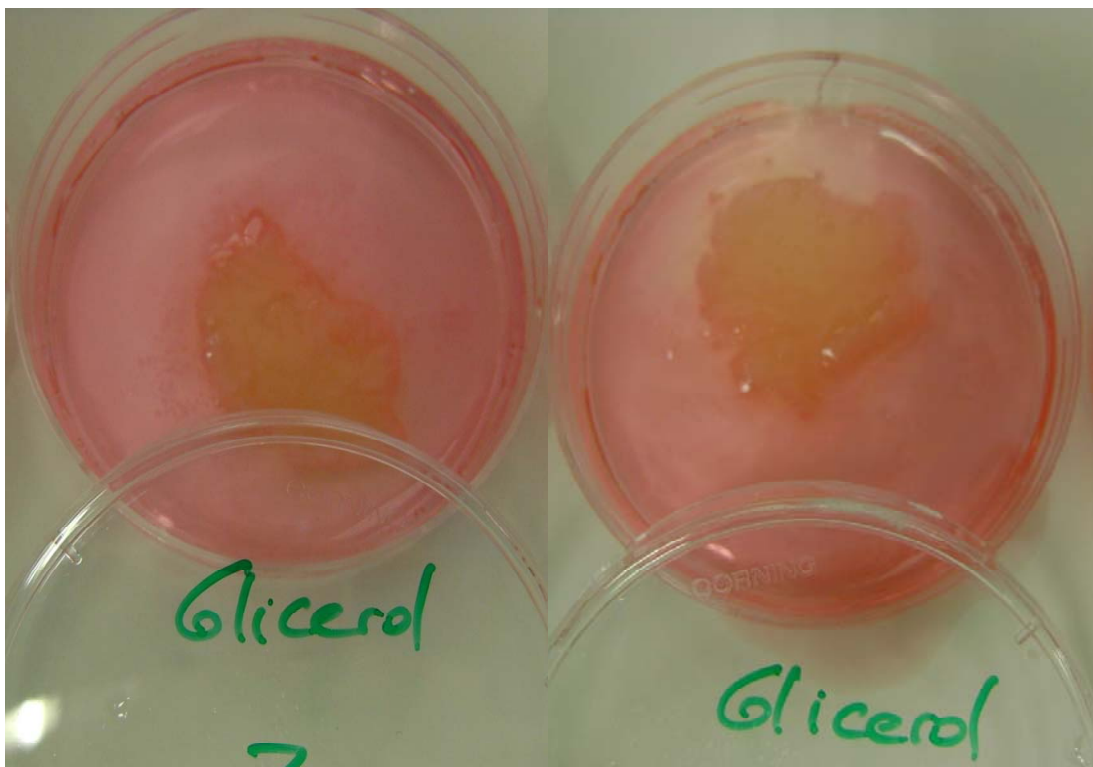


Figura 13. Se observa la macroestructura de los sustitutos de corion criopreservados con **solución C**. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes.

4.2. Análisis histológico mediante microscopía óptica de los sustitutos de corion de mucosa oral

4.2.1. Áreas interfibrilares

En este análisis se observó, en los grupos experimentales sometidos a criopreservación con crioprotectores, un aumento del patrón de porosidad, es decir, un aumento de los espacios interfibrilares en la matriz extracelular. En el caso de los sustitutos crioprottegidos con la solución A existe una media del área interfibrilar del orden del 23,09 %, sin que exista una diferencia estadísticamente significativa con el control no sometido a criopreservación (CF). El patrón de porosidad de este último tiene un área interfibrilar promedio de 21,15 %. Al valorar los sustitutos crioprottegidos con la solución B y solución C los valores obtenidos del área interfibrilar fueron del 27,06 % y 27,74 % respectivamente. Estos valores son mayores y estadísticamente significativos con respecto al control CF. En el grupo control donde no se utilizó solución crioprotectora (CS) se observaron alteraciones extremas de la microestructura. En este caso, la media del área interfibrilar fue de 33,98 % siendo mayor y estadísticamente significativo con respecto al control que no fue sometido a criopreservación (CF).

En las figuras 14A y 14B se observa, con un aumento de 200X, el patrón de porosidad de los sustitutos de corion en los distintos grupos experimentales tanto con la tinción de hematoxilina/eosina ordinaria como con la imagen transformada a binario a partir del programa MacBiophotonic Image J. En la tabla 2 y en las figuras 15 y 16 se presentan los resultados de la medición de las áreas interfibrilares de los sustitutos de corion en los distintos grupos experimentales. El valor de las áreas interfibrilares es representativo de la medición total de 10 áreas de 200X de aumento correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental. Para identificar las diferencias entre dos grupos concretos se realizó la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5 % ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas (Tabla 3).

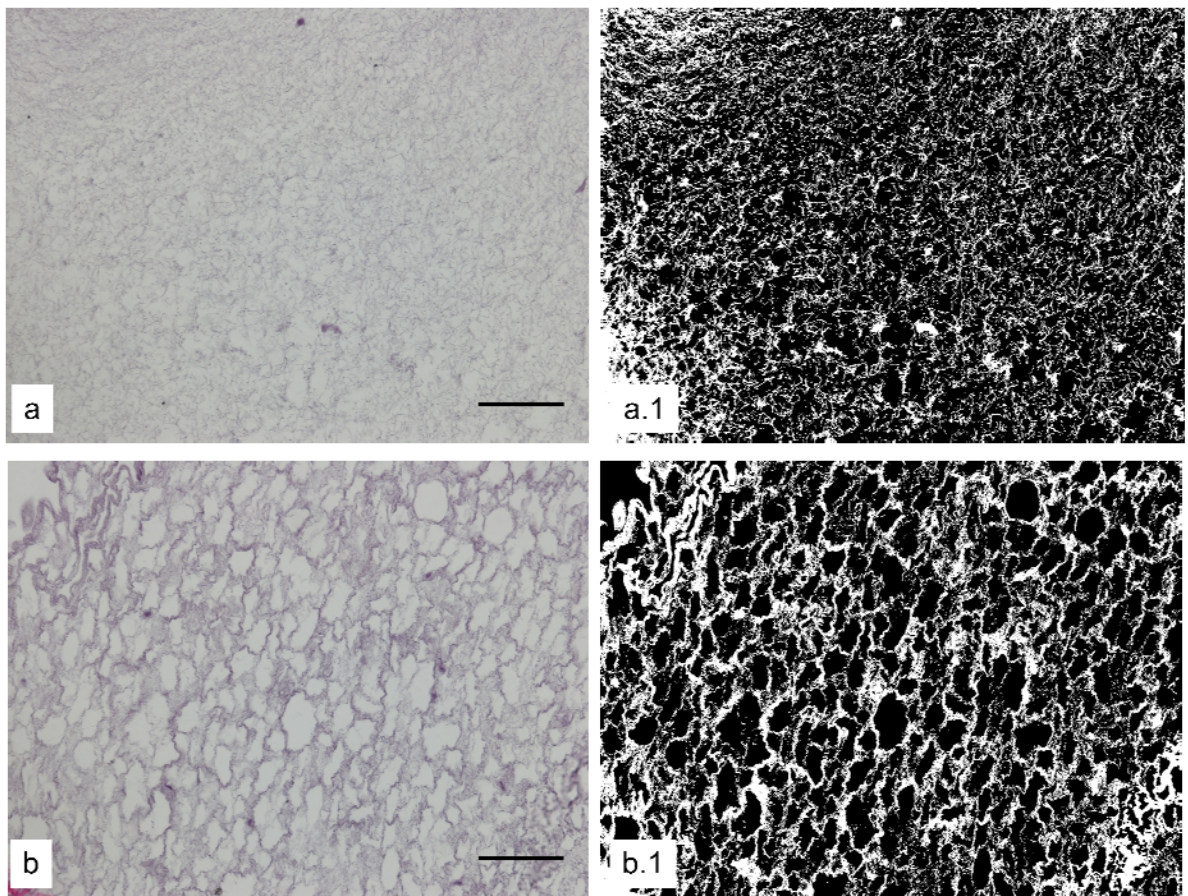


Figura 14A. Se observa el patrón de porosidad representado por las áreas interfibrilares con la tinción de hematoxilina/eosina y la misma imagen transformada a binario con el programa MacBiophotonic Image J para cada grupo experimental, a) Control (CF), a.1) Control (CF) con Image J; b) Sin solución (CS), b.1) Sin solución (CS) con Image J. Aumento de 200X. Todas las imágenes están a escala de 100 μm .

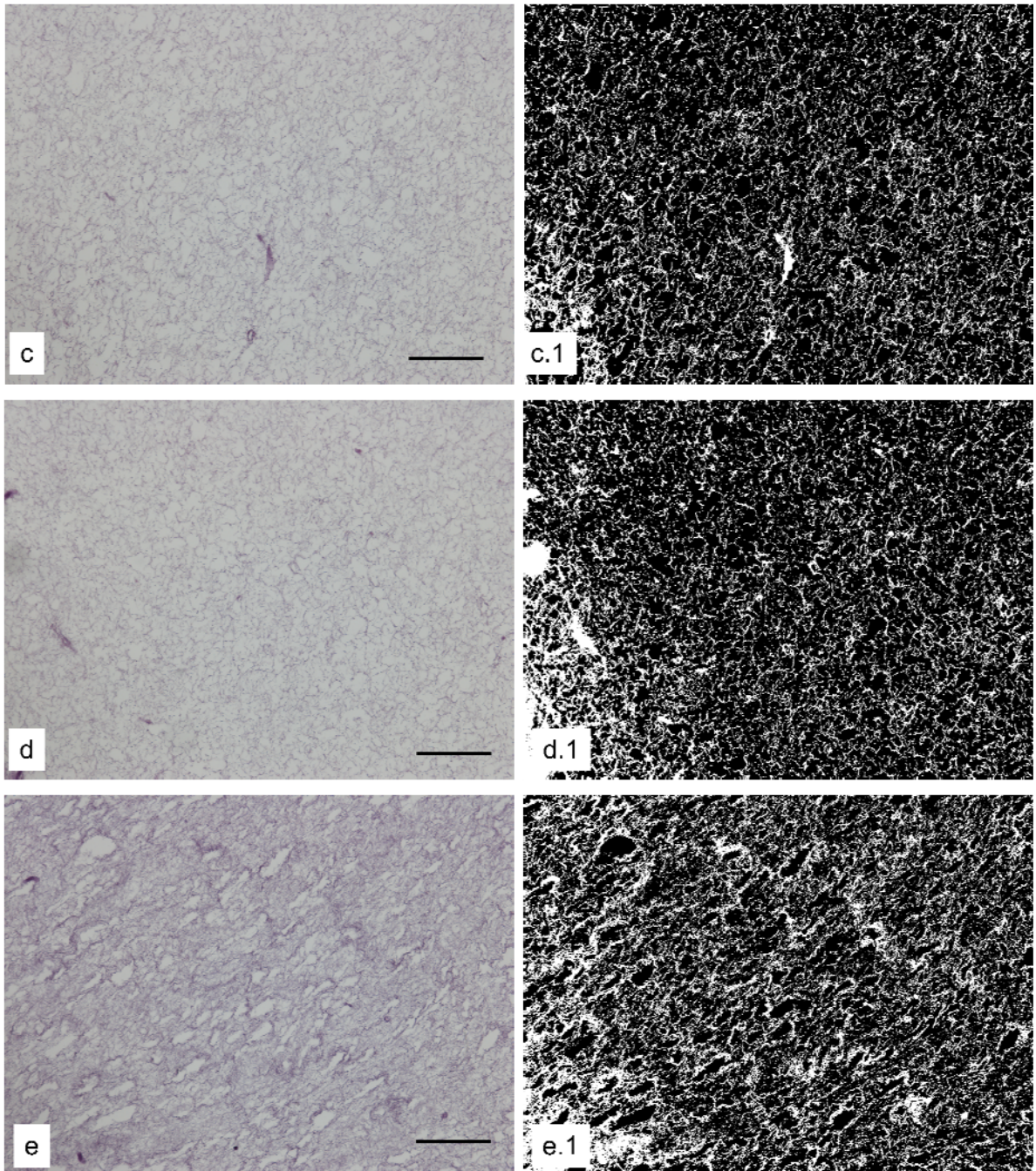


Figura 14B. Se observa el patrón de porosidad representado por las áreas interfibrilares con la tinción de hematoxilina/eosina y la misma imagen transformada a binario con el programa MacBiophotonic Image J para cada grupo experimental: c) Solución A, c.1) Solución A con Image J; d) Solución B, d.1) Solución B con Image J; e) Solución C, e.1) Solución C con Image J. Aumento de 200X. Todas las imágenes están a escala de 100 µm.

Área	CF	CS	Sol. A	Sol. B	Sol. C
1	17,3	31,2	19,5	36	32,1
2	22,9	34,8	19,6	37	31,8
3	25,9	35,5	22,8	27,8	33,1
4	23,4	35,7	27,1	19,2	30,3
5	22,8	31,4	26	25,8	30,4
6	20,9	32,6	24,1	23,6	27,2
7	15,6	38,2	24,9	27,9	18,6
8	19	32,8	23,5	23,2	21,9
9	25	34,2	22,6	27,2	28,1
10	18,7	33,4	20,8	22,9	23,9
Media	21,15	33,98	23,09	27,06	27,74
Desviación estándar	3,40	2,15	2,57	5,65	4,83
Error estándar	1,07	0,67	0,81	1,78	1,52

Tabla 2. Resultados expresados en porcentaje como media de 10 áreas representativas correspondiente a 2 ensayos independientes para cada grupo experimental con su desviación y error estándar.

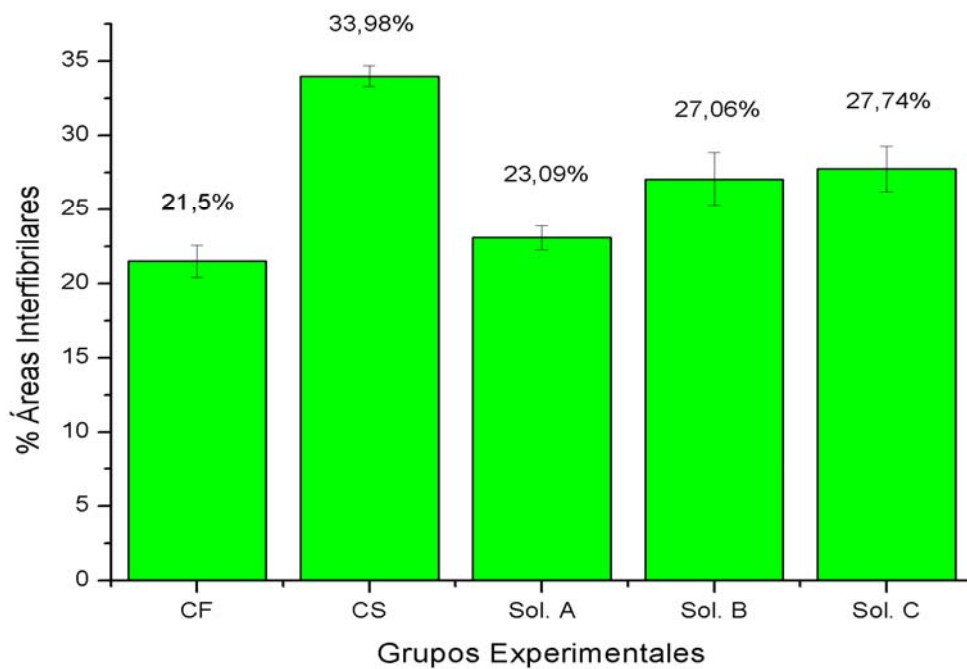


Figura 15. Se observa la gráfica con la media expresada en porcentaje de 10 áreas representativas correspondiente a 2 ensayos independientes para cada grupo experimental y su error estándar.

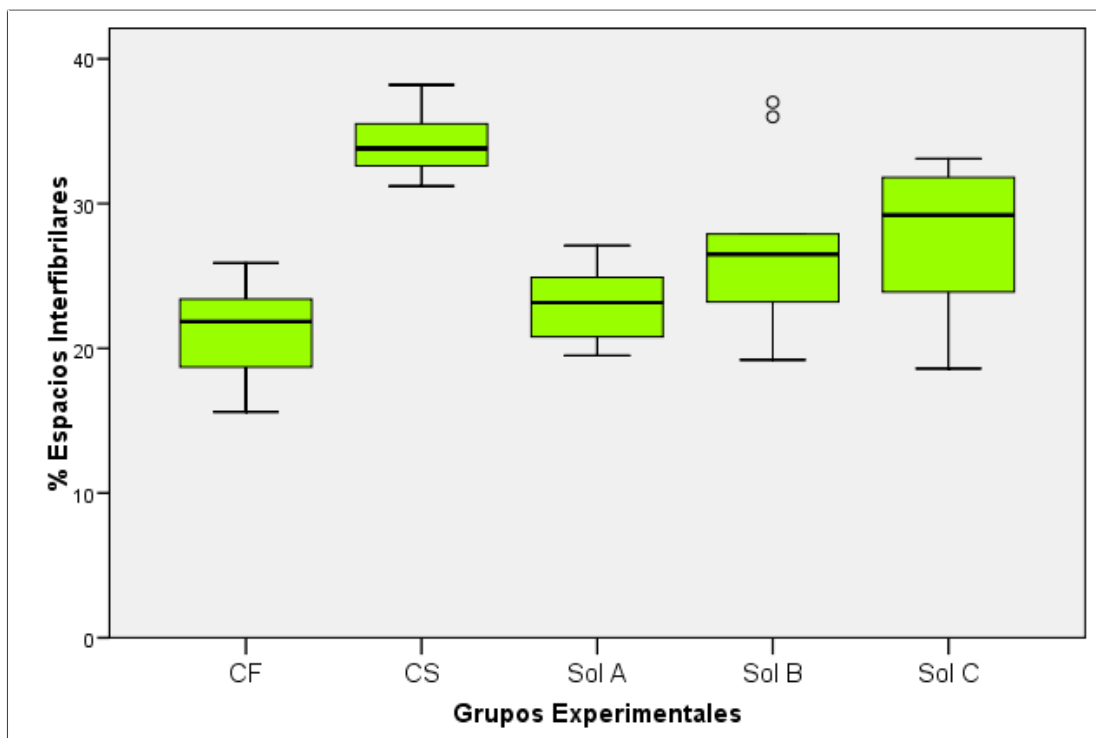


Figura 16. Se observa un diagrama de cajas con su mediana expresada en porcentaje de 10 áreas representativas correspondiente a 2 ensayos independientes para cada grupo experimental con sus valores máximos y mínimos.

% Espacios	CF	CS	Sol A	Sol B	Sol C
CF	**	0,00016	0,21212	0,00908	0,00815
CS	0,00016	**	0,00016	0,01556	0,00150
Sol A	0,21212	0,00016	**	0,06964	0,02837
Sol B	0,00908	0,01556	0,06964	**	0,52037
Sol C	0,00815	0,00150	0,02837	0,52037	**

Tabla 3. Para identificar las diferencias entre dos grupos concretos se realizó la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5% ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas.

4.2.2. Cuantificación de células

Nuestros resultados muestran que el número total de células presentes en la matriz de fibrina y agarosa fue para los sustitutos crioprottegidos con la solución A de 71 células, para solución B de 95 células, y para la solución C de 45 células. La cantidad de células cuantificadas en los controles CF fue de 103 células y para el control CS de 50 células. En la figura 17 se observa mediante microscopía óptica las células en los sustitutos de corion en todas las condiciones experimentales. En la tabla 4 y figura 18 se expresan los resultados de la cuantificación de células en los sustitutos de corion posterior a su descongelación. El total de células es representativo de la medición de 10 áreas observadas con un aumento de 200X, correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental.

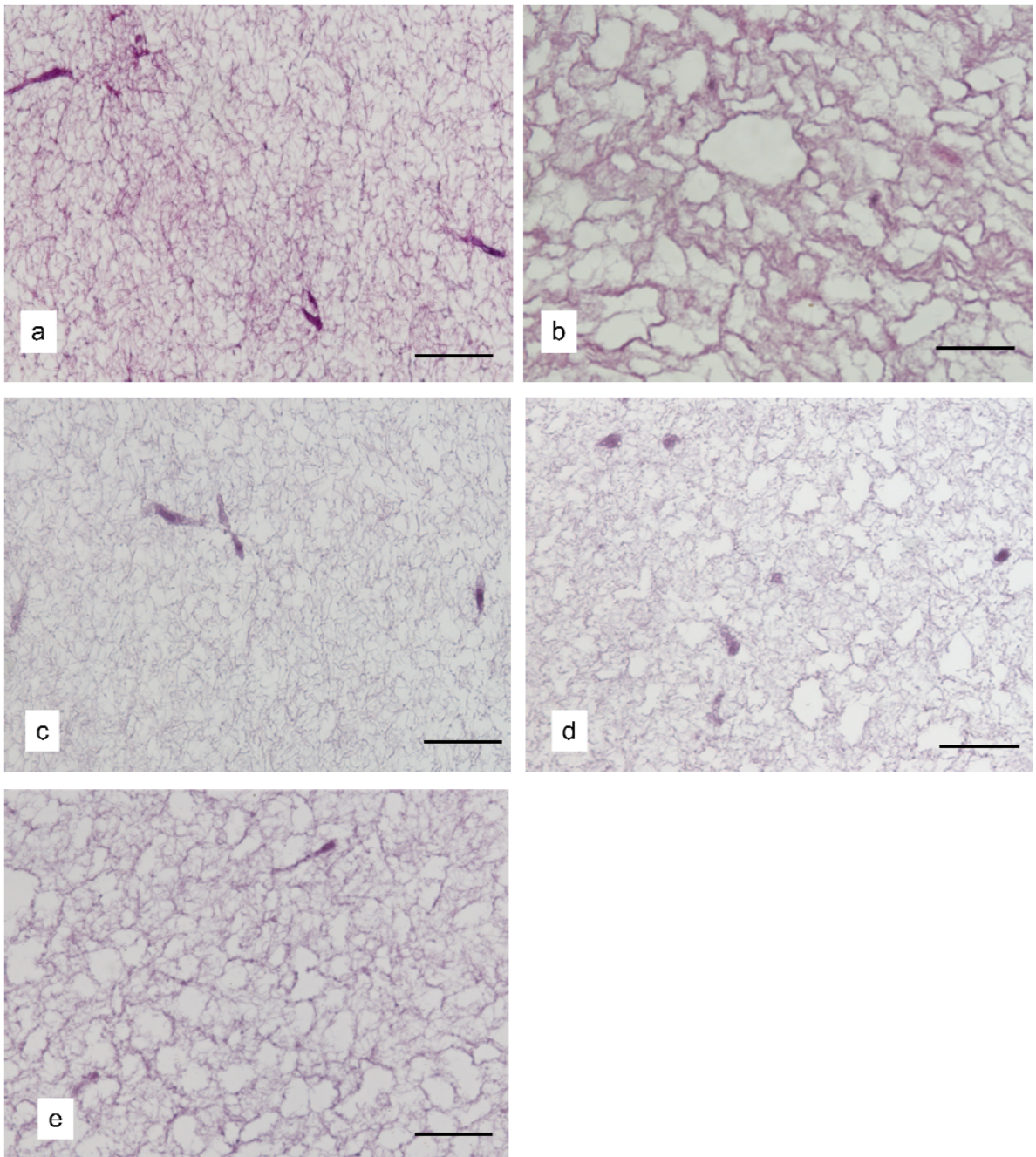


Figura 17. Células en los sustitutos de corion criopreservados. Se representa con **a: Control (CF)**, **b: Control (CS)**, **c: Solución A**, **d: Solución B**, **e: Solución C**. Aumento 200X. Escala 100 μ m.

Área	CF	CS	Sol. A	Sol. B	Sol. C
1	10	10	4	2	7
2	8	18	7	5	6
3	8	5	7	7	8
4	4	4	6	19	5
5	14	6	10	5	14
6	15	1	13	18	1
7	12	3	4	13	2
8	11	0	5	9	1
9	8	2	13	8	0
10	13	1	2	9	1
Total de células	103	50	71	95	45

Tabla 4. Expresa el total de células representativo de la medición de 10 áreas observadas con un aumento de 200X, correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental.

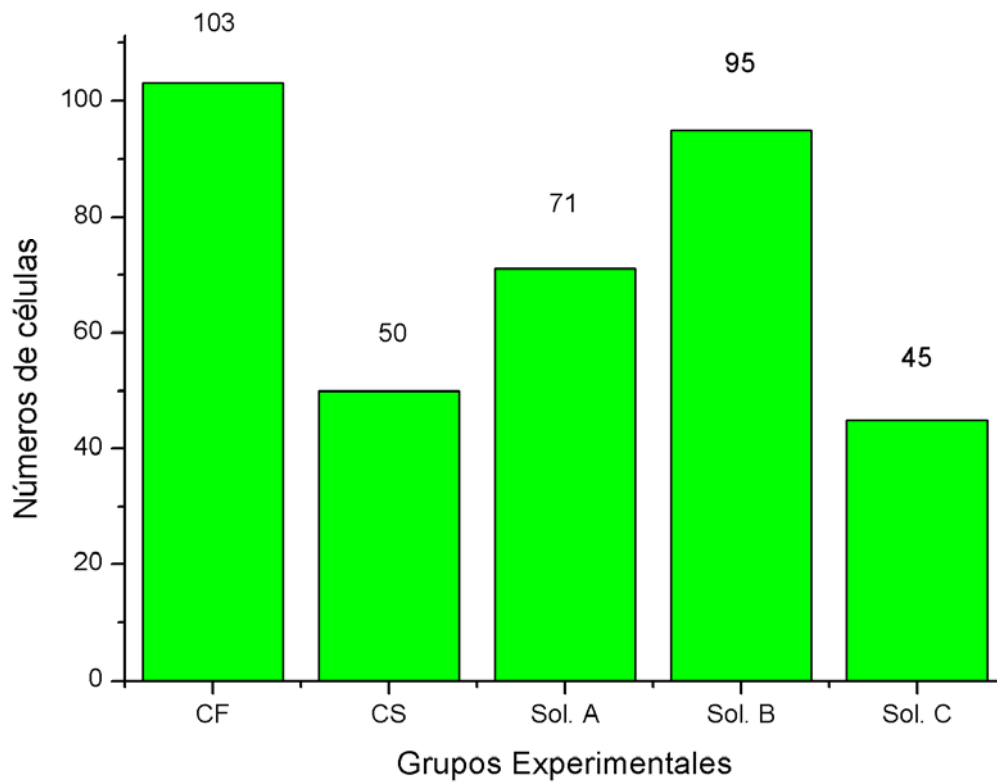


Figura 18. Se expresa el total células de sustitutos de corion correspondiente a 10 áreas de dos ensayos independientes para cada grupo experimental.

4.3. Viabilidad celular mediante el estudio inmunohistoquímico de proliferación celular (PCNA)

4.3.1. Análisis inmediato a la descongelación

Los resultados del análisis de proliferación de células mediante ensayos de PCNA realizados en forma inmediata a su descongelación muestran en los sustitutos crioprotegidos con la solución A un porcentaje de proliferación del 48,21 %, con la solución B del 68,85 %, y en el caso de la solución C del 33,02 %. Para el grupo control (CF) el índice de proliferación celular fue de 64,95 %, mientras que el control (CS) mostró un índice del 16,06 %. En la siguiente figura se presentan imágenes al microscopio óptico de los sustitutos de corion de cada grupo experimental tratados mediante el ensayo de PCNA (Figura 19). En la tabla 5 y figuras 20 y 21 se exponen los resultados de células PCNA positivas en sustitutos de corion analizados en forma inmediata a su descongelación. El porcentaje de células PCNA positivas es representativo de la medición de 10 áreas con un aumento de 200X por área, correspondiente a dos ensayos independientes para cada grupo experimental. Para identificar las diferencias entre dos grupos concretos se realizó la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5 % ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas (Tabla 6).

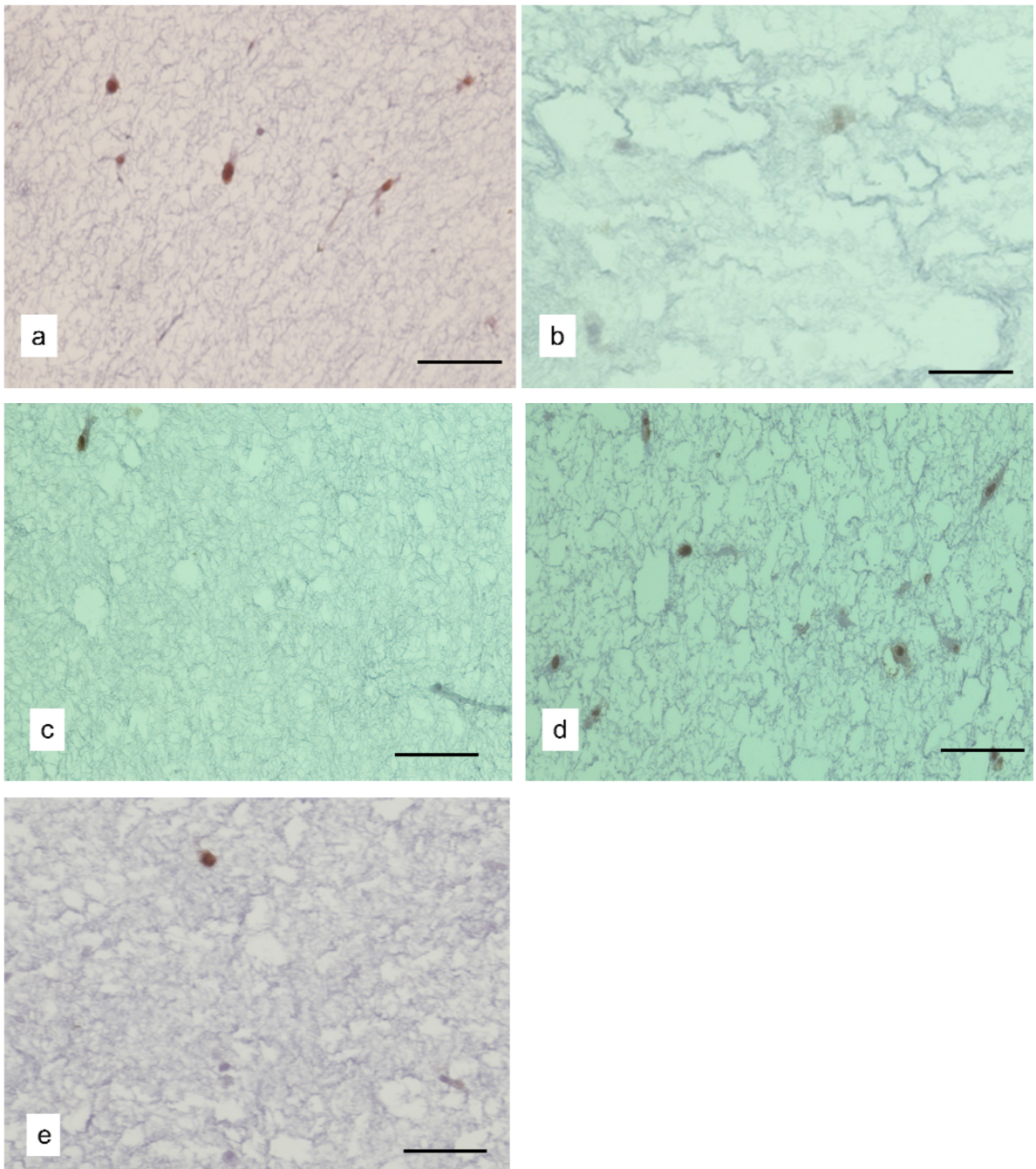


Figura 19. Se observan las imágenes del ensayo de PCNA sobre sustitutos de corion en forma inmediata a su descongelación. Se representa con **a: Control (CF)**, **b: Control (CS)**, **c: Solución A**, **d: Solución B**, **e: Solución C**. Aumento 200X. Escala 100 μ m.

Área	CF	CS	Sol. A	Sol. B	Sol. C
1	75	5,88	50	64,70	50
2	70	3,70	53,33	55,55	57,14
3	79,16	6,89	66,66	59,57	33,33
4	71,42	6,25	42,30	74,35	55,55
5	91,48	6,66	52,17	73,33	42,85
6	60	21,87	50	100	28,57
7	54,5	19,35	36,84	50	10
8	41	41,37	36,36	50	22,22
9	57	15,38	44,44	41	8,33
10	50	33,33	50	60	22,22
Media	64,95	16,06	48,21	62,85	33,02
Desviación estándar	15,15	12,94	8,88	16,68	17,84
Error estándar	4,79	4,09	2,80	5,27	5,64

Tabla 5. Los resultados son expresados en porcentajes como la media de 10 áreas representativas de 2 ensayos independientes para cada grupo experimental con su desviación y error estándar.

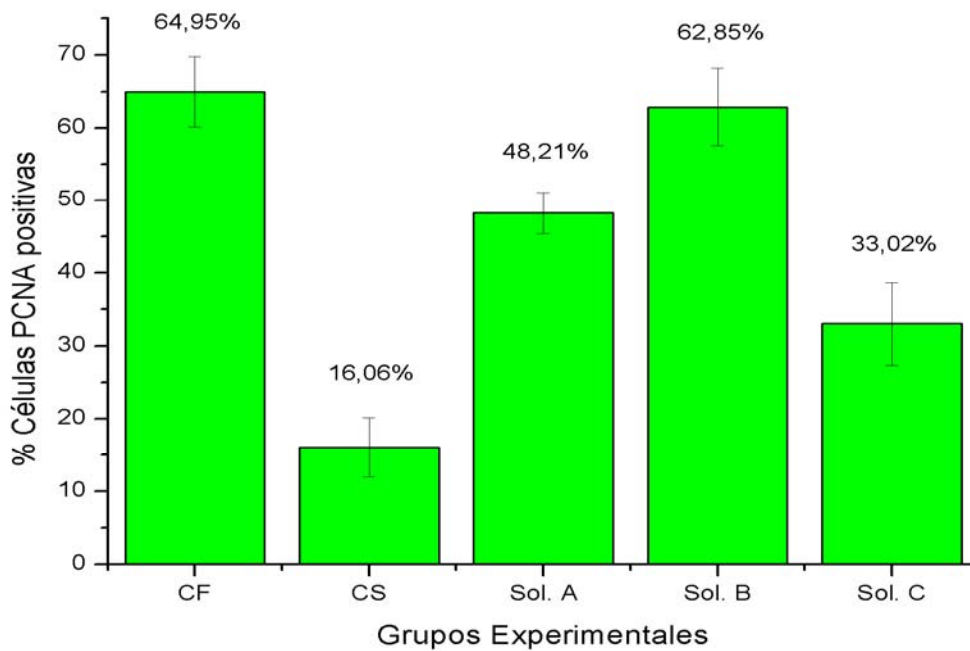


Figura 20. Porcentaje de células PCNA positivas obtenido de sustitutos de corion de mucosa posteriormente a su descongelación. Los resultados son representativos a dos ensayos independientes para cada grupo experimental y están expresados como media +/- error estándar de la media.

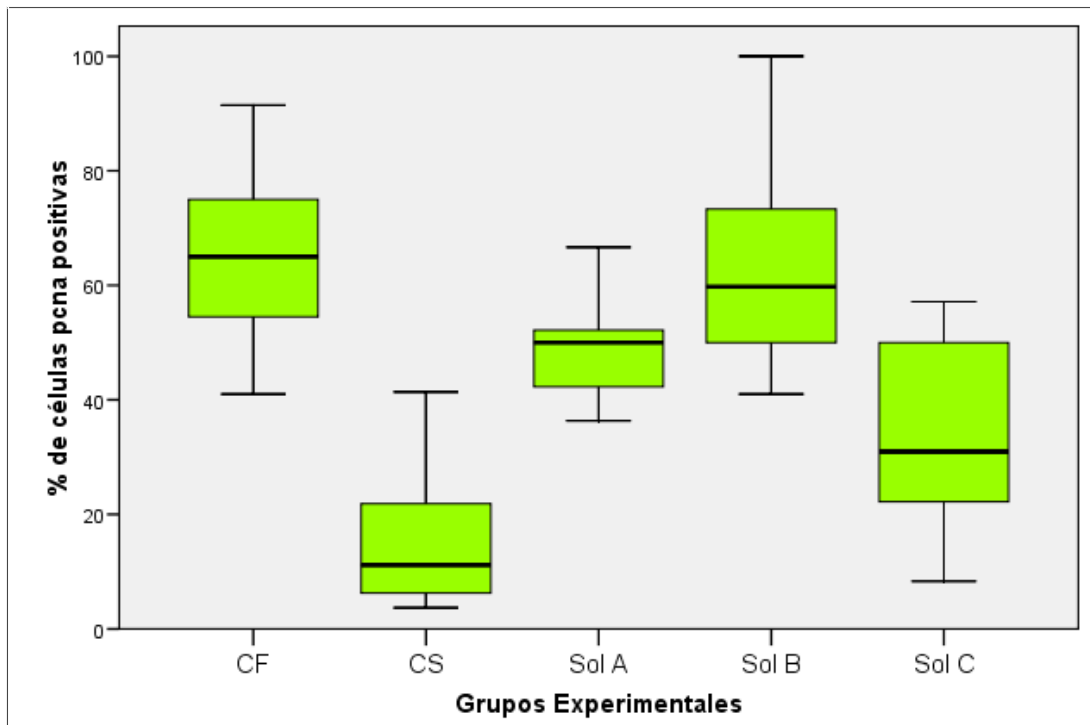


Figura 21. Se observa un diagrama de cajas con su mediana expresada en porcentaje de células PCNA positivas obtenida de sustitutos de corion de mucosa posteriormente a su descongelación correspondiente a dos ensayos independientes para cada grupo experimental con sus valores máximos y mínimos.

PCNA +	CF	CS	Sol A	Sol B	Sol C
CF	**	0,00021	0,00885	0,64941	0,00219
CS	0,00021	**	0,00028	0,00021	0,01395
Sol A	0,00885	0,00028	**	0,02718	0,07445
Sol B	0,64941	0,00021	0,02718	**	0,00277
Sol C	0,00219	0,01395	0,07445	0,00277	**

Tabla 6. Estudio estadístico utilizando la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5% ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas.

4.3.2. Análisis 24 horas después de la descongelación

Los resultados del análisis de proliferación de células mediante ensayos de PCNA 24 horas después a su descongelación muestran en los sustitutos crioprottegidos con la solución A un porcentaje de proliferación del 49,81 %, con la solución B del 72,41 %, y para la solución C del 38,88 %. Para el grupo control (CF) el índice de proliferación celular fue del 87,02 %, mientras que en el control (CS) el índice fue del 0 %. En las siguientes figuras se presentan imágenes al microscopio óptico de los sustitutos de corion de cada grupo experimental tratados mediante el ensayo de PCNA (Figura 22). En la tabla 7 y figuras 23 y 24 se exponen los resultados de células PCNA positivas en sustitutos de corion 24 horas posterior a su descongelación. El porcentaje de células PCNA positivas es representativo de la medición de 10 áreas, con un aumento de 200X por área, correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental. Para identificar las diferencias entre dos grupos concretos se realizó la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5 % ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas (Tabla 8).

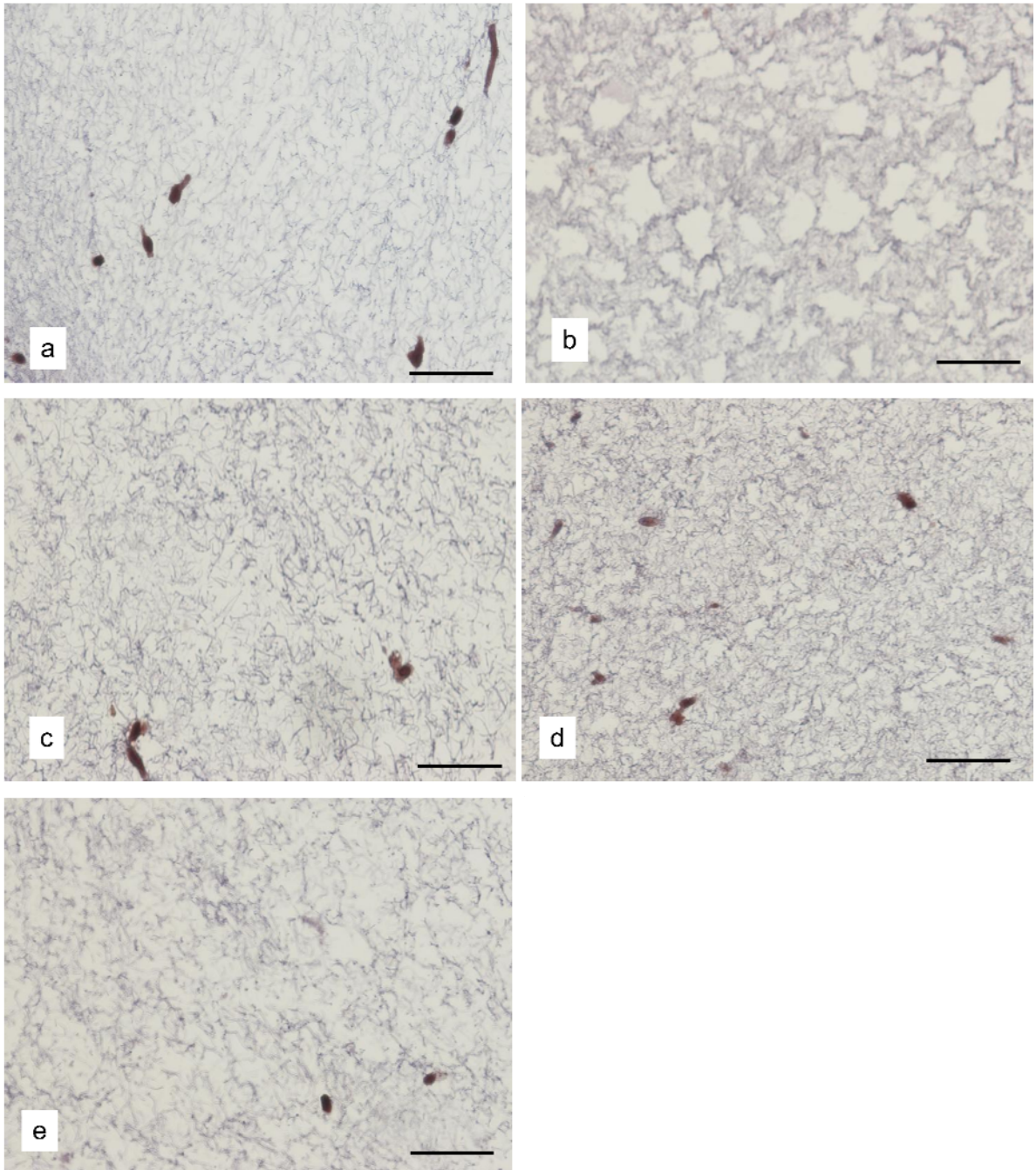


Figura 22. Se observan las imágenes del ensayo de PCNA sobre sustitutos de corion 24 horas después de descongelarlos. Se representa con **a: Control (CF)**, **b: Control (CS)**, **c: Solución A**, **d: Solución B**, **e: Solución C**. Aumento 200X. Escala 100 μ m.

Área	CF	CS	Sol. A	Sol. B	Sol. C
1	86	0	16	50	16
2	80	0	42	83,33	40
3	75	0	20	60	0
4	80	0	50	50	14,28
5	100	0	41	80	28,57
6	83,33	0	66,60	100	50
7	90,90	0	75	63,33	40
8	75	0	42,80	62,50	100
9	100	0	73,33	100	50
10	100	0	71,4	75	50
Media	87,02 %	0 %	49,81 %	72,41 %	38,88 %
Desviación estándar	10,1	0	21,48	18,31	27,59
Error estándar	3,20	0	6,79	5,79	8,72

Tabla 7. Resultados expresados en porcentaje como media de 10 áreas representativas de 2 ensayos independientes de PCNA para cada grupo experimental con su desviación y error estándar.

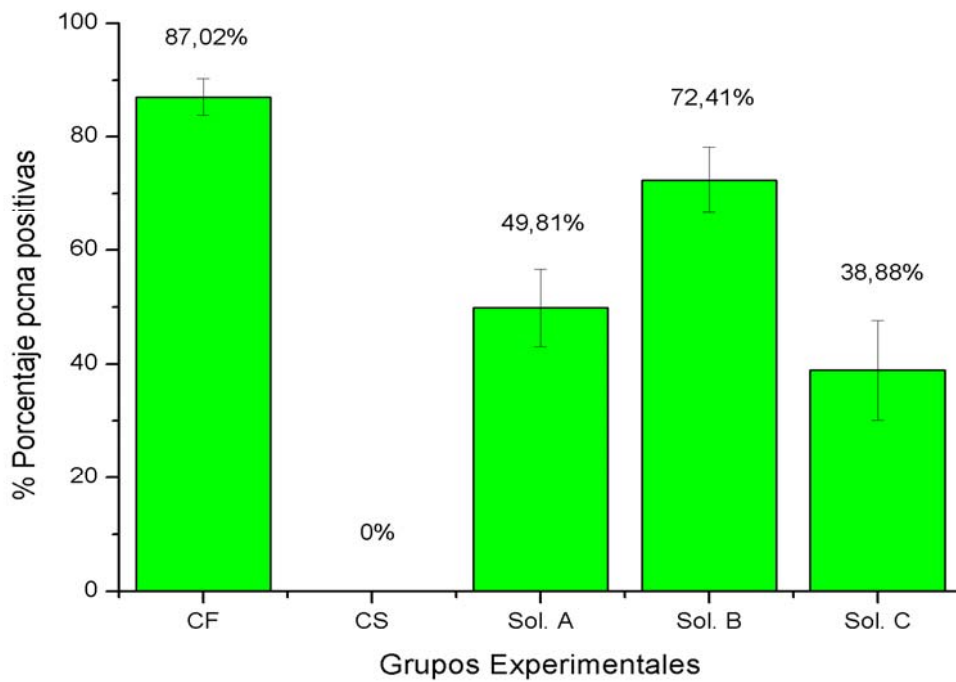


Figura 23. .Porcentaje de células PCNA positivas obtenido de sustitutos de corion 24 horas posterior a su descongelación mediante dos ensayos independientes para cada grupo experimental. Los resultados son expresados como media +/- error estándar de la media.

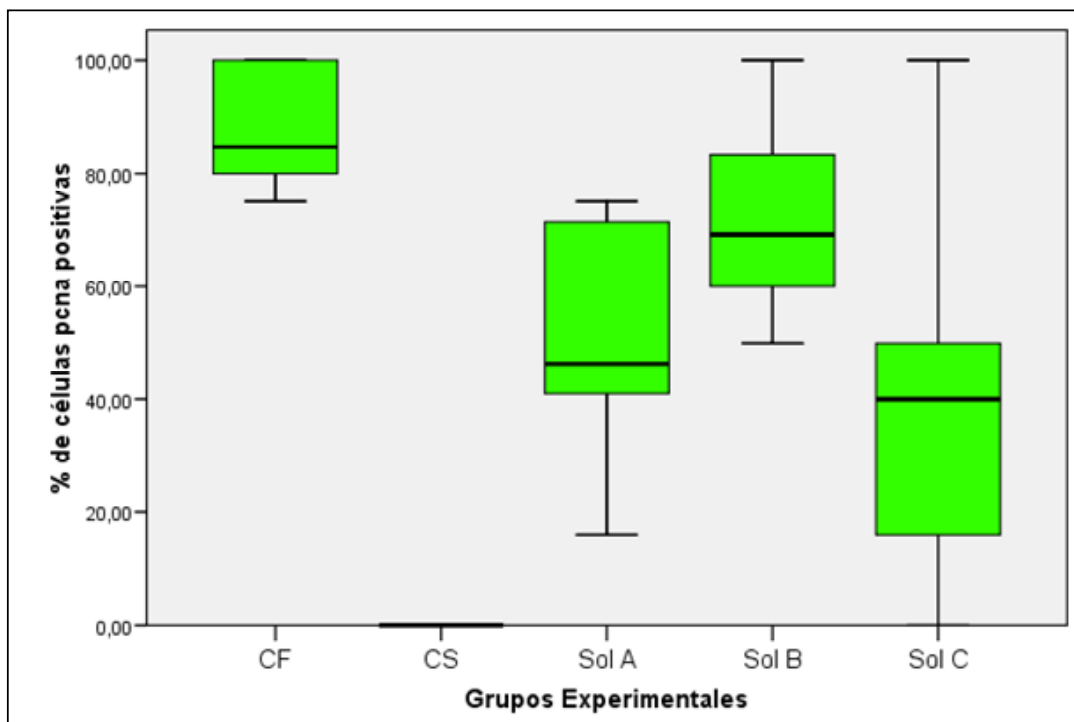


Figura 24. Se observa un diagrama de cajas con su mediana expresada en porcentaje de células PCNA positivas obtenida de sustitutos de corion de mucosa 24 hs. posterior a su descongelación correspondiente a dos ensayos independientes para cada grupo experimental con sus valores máximos y mínimos.

pcna (1d)	CF	CS	Sol A	Sol B	Sol C
CF	**	0,00005	0,00020	0,06103	0,00159
CS	0,00005	**	0,00005	0,00005	0,00019
Sol A	0,00020	0,00005	**	0,03083	0,19673
Sol B	0,06103	0,00005	0,03083	**	0,00373
Sol C	0,00159	0,00019	0,19673	0,00373	**

Tabla 8. Estudio estadístico utilizando la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5 % ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas.

4.3.3. Comparación estadística entre los análisis de PCNA inmediatos y 24 horas después a la descongelación

En la figura 25 se muestra un estudio comparativo entre los análisis de PCNA inmediatos y 24 horas después a la descongelación de los distintos grupos experimentales. Se puede observar que los sustitutos de corion de mucosa oral crioprottegidos con las distintas soluciones presentan un índice de proliferación mayor a las 24 horas posterior a su descongelación que los analizados en forma inmediata a la descongelación. De todas maneras en la tabla 9 se presenta el estudio estadístico que pone de manifiesto que esas diferencias no son estadísticamente significativas. Sin embargo, en el caso del control (CF) muestra un índice de proliferación mayor y estadísticamente significativo 24 horas después de la descongelación que el control analizado en forma inmediata a la descongelación. Por otro lado, el control CS presenta un índice de proliferación de menor y estadísticamente significativo a las 24 horas de la descongelación que el control que se analiza inmediatamente a la descongelación.

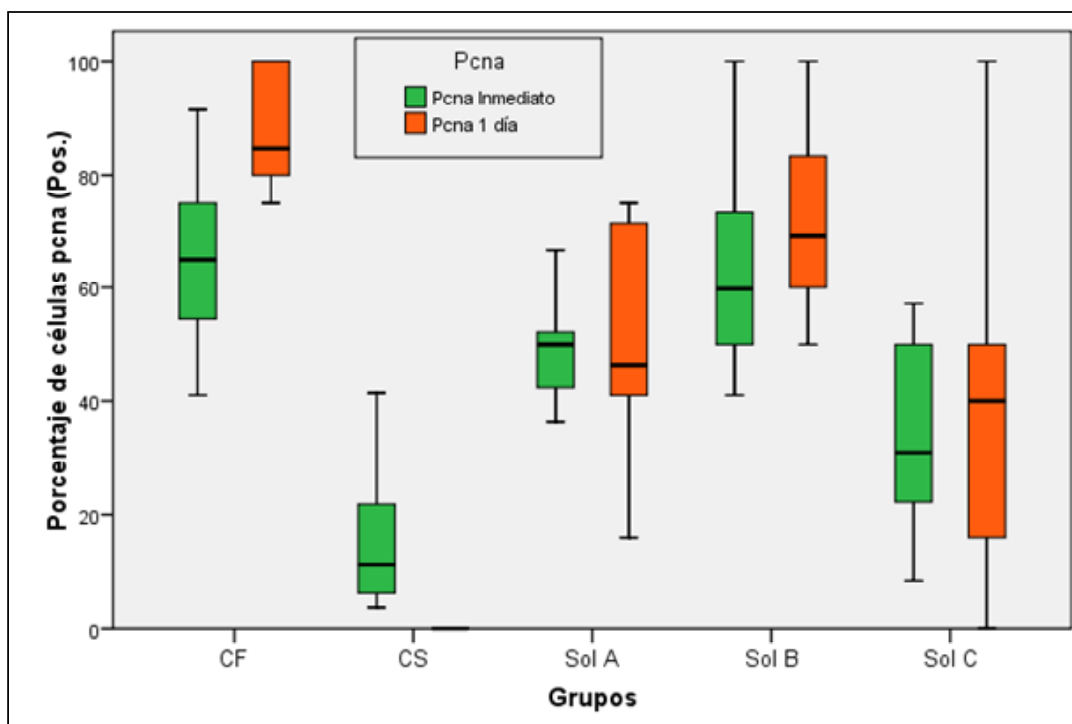


Figura 25. Se observa un diagrama de cajas con su mediana expresada en porcentaje para una comparación estadística entre los análisis de PCNA inmediatos y 24 horas después a la descongelación correspondiente a dos ensayos independientes para cada grupo experimental con sus valores máximos y mínimos.

	CF	CS	Sol A	Sol B	Sol C
Inmediato	0,002	0,00005	0,909	0,183	0,820
1 día					

Tabla 9. Estudio estadístico utilizando la prueba de Mann-Whitney donde se asumió como máximo un error alfa del 5 % ($p < 0,05$) en todas las pruebas realizadas.

4.4. Viabilidad celular mediante el método de recultivación

4.4.1. Técnica de Live & Dead

4.4.1.1. Cuantificación de células

La cuantificación de células mediante la utilización del método de Live & Dead muestra que, en los sustitutos de corion crioprotectados con la Solución A, el total de células fue de 1478 células, con la Solución B de 6156 células y en el caso de la Solución C de 2279 células. Para el caso Control CF el total de células observado fue de 31881 mientras que en el caso del Control CS, es decir el control que no poseía crioprotector, no se encontraron células. En las siguientes figuras (26, 27, 28, 29) se presentan imágenes mediante microscopía de fluorescencia de células de cada grupo experimental obtenidas de la recultivación de los sustitutos de corion 7 días posterior a su descongelación tratadas mediante un ensayo de Live & Dead. En la tabla 10 y figura 30 se presenta el total de células obtenido de la medición de 60 áreas, con un aumento de 400X por área, correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental.

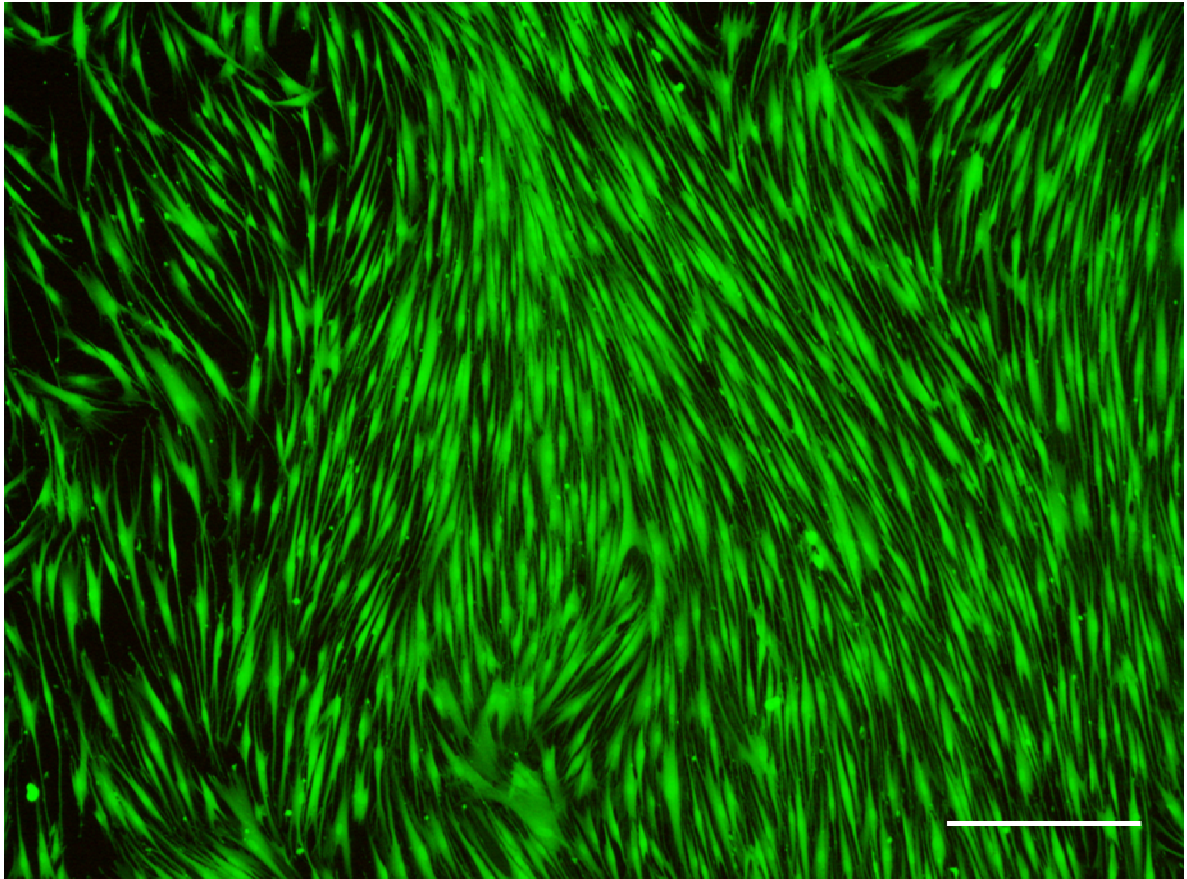


Figura 26. Células obtenidas de la recultivación de sustitutos de corion **control (CF)**. Aumento de 400X. Escala 50 μm .

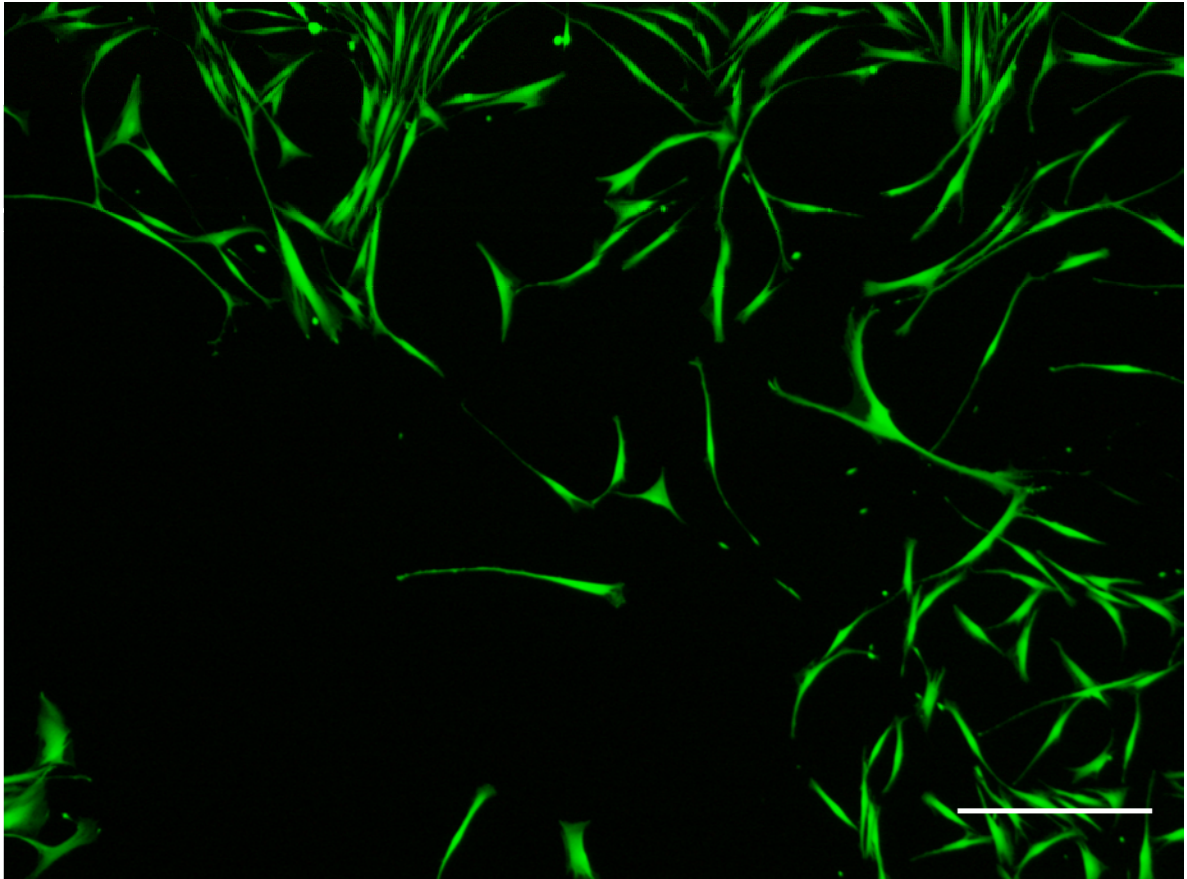


Figura 27. Células obtenidas de la recultivación de sustitutos de corion criopreservados con **solución A**. Aumento de 400X. Escala 50 μm .

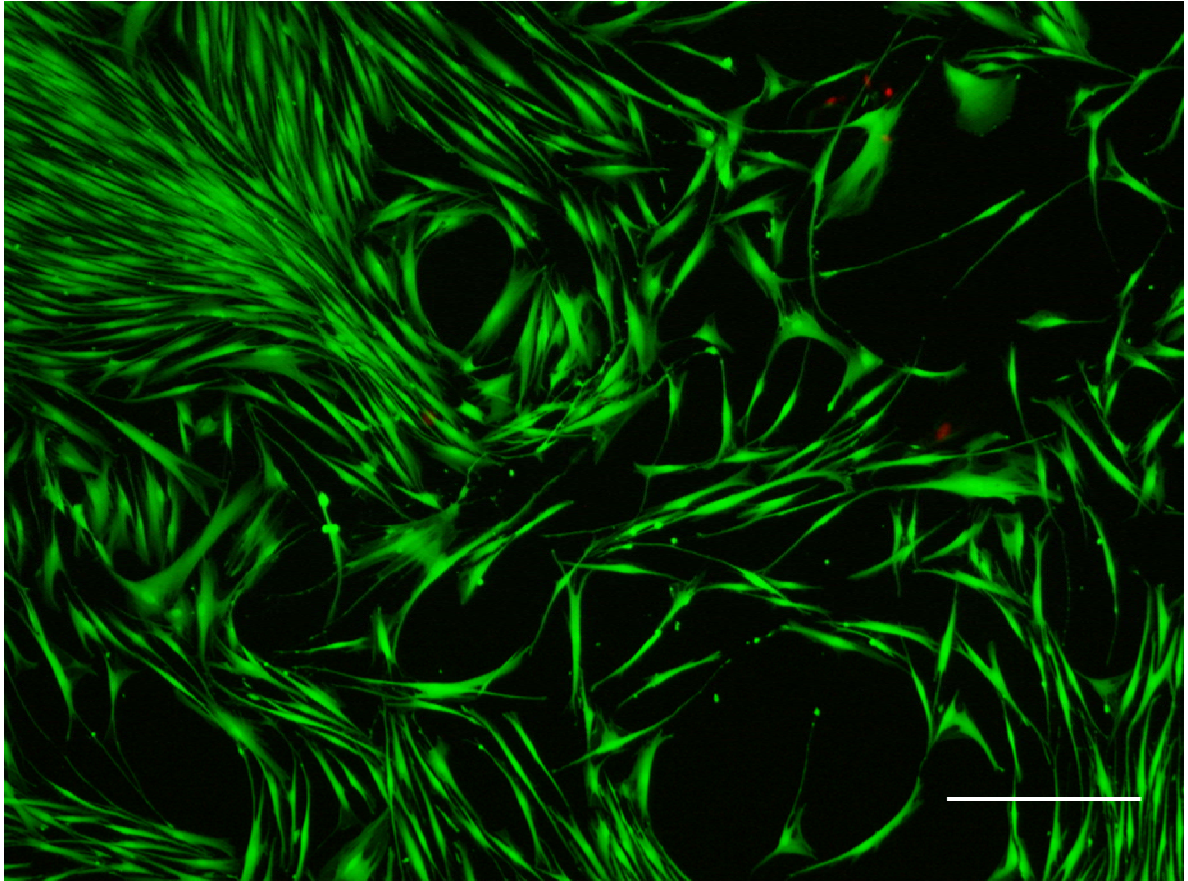


Figura 28. Células obtenidas de la recultivación de sustitutos de corion criopreservados con **solución B**. Aumento de 400X. Escala 50 μm .

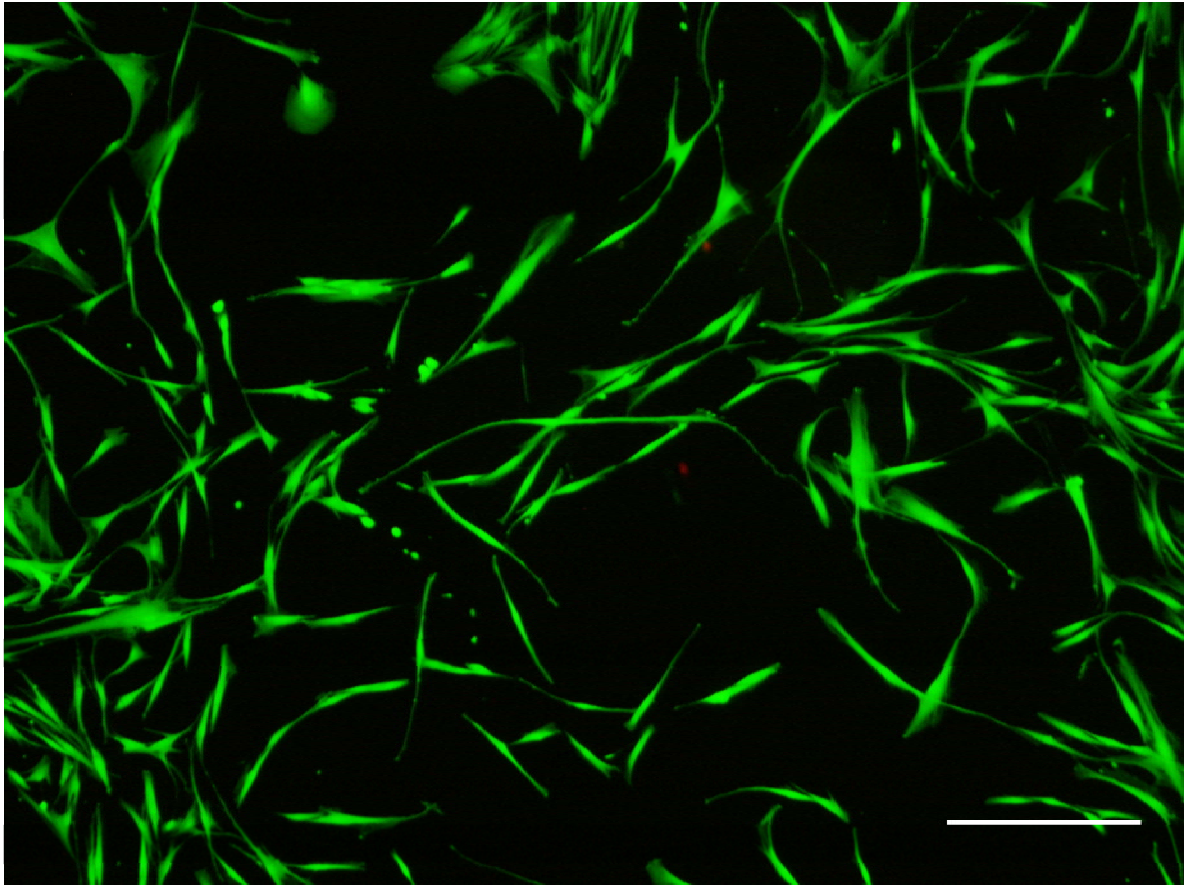


Figura 29. Células obtenidas de la recultivación de sustitutos de corion criopreservados con **solución C**. Aumento de 400X. Escala 50 μm .

Mediciones	CF	CS	Sol. A	Sol. B	Sol. C
1	444	0	0	547	0
2	256	0	0	833	0
3	95	0	0	853	0
4	254	0	0	436	0
5	422	0	0	1	0
6	162	0	0	3	0
7	723	0	0	0	0
8	706	0	0	1	0
9	564	0	0	54	0
10	231	0	0	4	0
11	622	0	0	0	204
12	173	0	0	2	0
13	402	0	0	0	97
14	173	0	0	0	232
15	1013	0	0	0	0
16	1605	0	0	1	18
17	690	0	0	5	0
18	679	0	0	42	0
19	108	0	0	695	0
20	717	0	0	4	0
21	540	0	0	119	885
22	1274	0	0	1	0
23	223	0	0	0	0
24	626	0	0	383	0
25	256	0	0	2	0
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	4	0
30	0	0	0	15	12
31	893	0	151	0	1
32	642	0	0	0	2
33	592	0	142	234	0
34	925	0	0	0	13
35	897	0	0	6	43
36	639	0	0	47	21
37	789	0	17	0	8
38	744	0	0	0	80
39	484	0	4	35	7
40	193	0	0	0	7
41	493	0	37	0	7
42	905	0	143	1374	16
43	896	0	0	0	9
44	916	0	0	1	124
45	782	0	15	1	19

46	450	0	0	6	37
47	408	0	9	56	3
48	665	0	0	69	9
49	588	0	7	9	3
50	591	0	0	102	11
51	354	0	4	1	349
52	679	0	0	1	12
53	495	0	879	0	5
54	478	0	4	0	11
55	520	0	66	1	4
56	384	0	0	0	5
57	664	0	0	99	0
58	731	0	0	52	16
59	701	0	0	7	0
60	421	0	0	43	0
Total de células	31881	0	1478	6156	2279

Tabla 10. Número de células desarrollado mediante ensayos de Live & Dead.

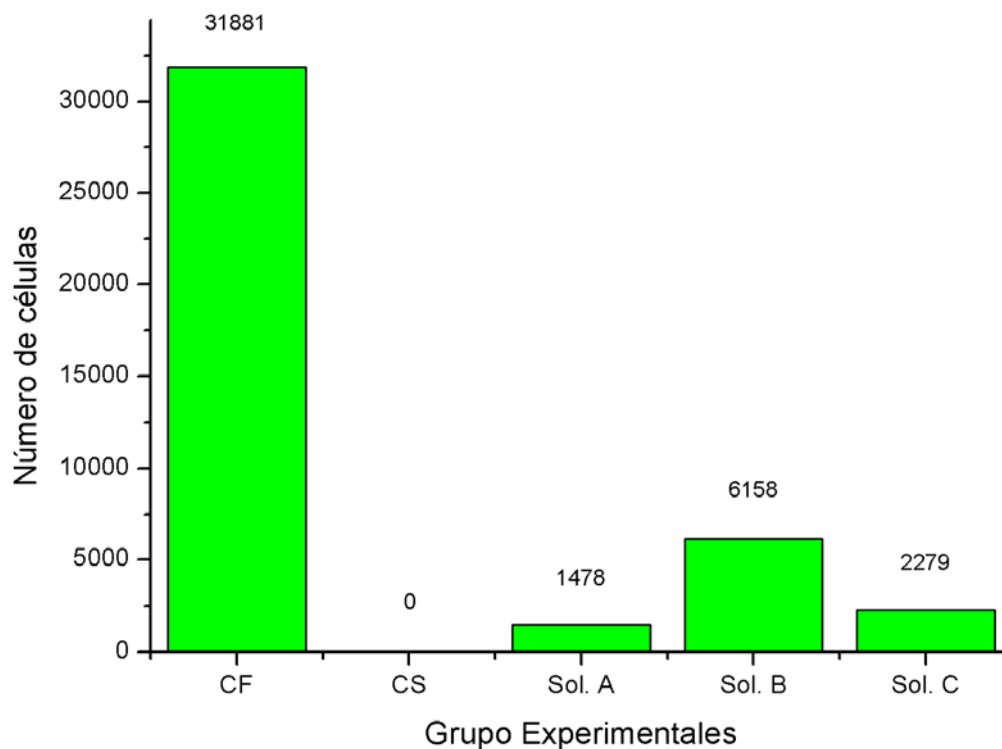


Figura 30. Número de células de la recultivación de sustitutos de corion de mucosa oral mediante ensayo de Live & Dead. Los sustitutos de corion de mucosa oral fueron sometidos a criopreservación con diferentes soluciones crioprotectoras, posteriormente fueron descongelados y recultivados durante 21 días. Los resultados son expresados como media de 60 áreas representativas de 2 ensayos independientes.

4.4.1.2. Viabilidad celular mediante Live & Dead

En la tabla 11 y en la figura 31 se muestra el porcentaje de viabilidad que es representativo de la medición de 60 áreas, con un aumento de 400X por área, correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental.

Células	CF	CS	Sol. A	Sol. B	Sol. C
Vivas	31724	0	1478	6144	2279
Muertas	157	0	0	12	0
% Viabilidad	% 99,50	% 0	% 100	% 99,80	% 100

Tabla 11. Porcentaje de células viables mediante ensayos de Live & Dead. Los resultados son expresados como media de 60 áreas representativas de 2 ensayos independientes.

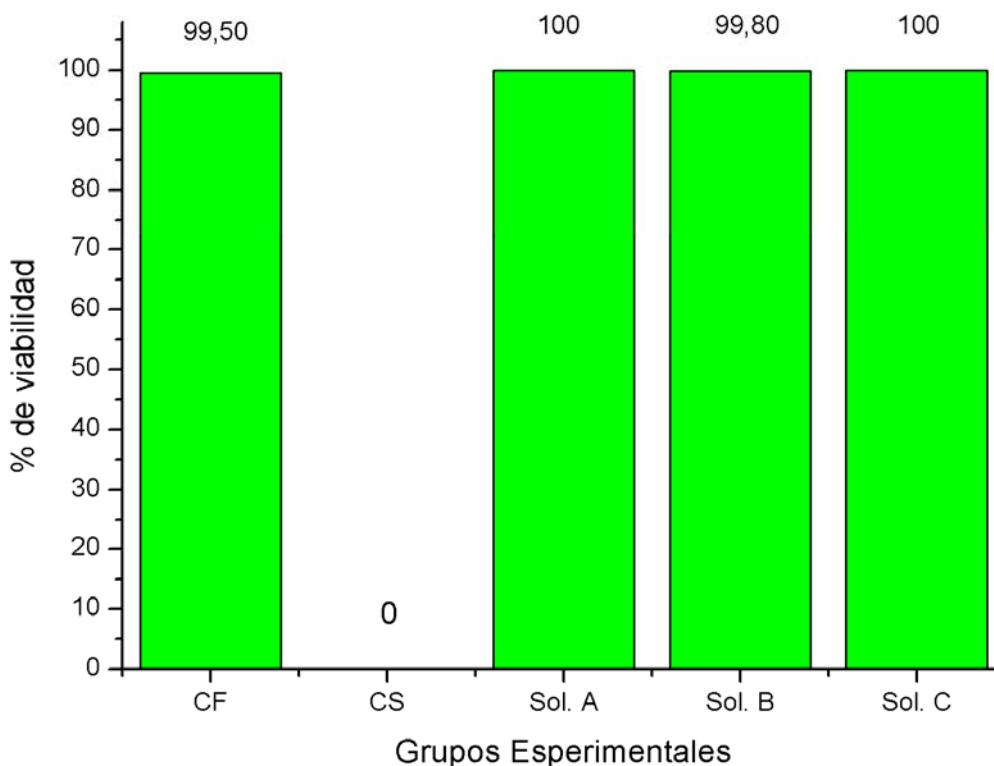


Figura 31. Porcentaje de células viables obtenido de 2 ensayos independientes de la recultivación de sustitutos de corion de mucosa oral mediante ensayo de Live & Dead.

4.4.2. Técnica de exclusión de Azul Tripán

En la siguiente figura 32 se muestra el porcentaje de viabilidad obtenido 21 días después a la descongelación de los sustitutos de corion mediante el ensayo de exclusión de Azul Tripán evaluando un total de 100 células correspondientes a dos ensayos independientes para cada grupo experimental.

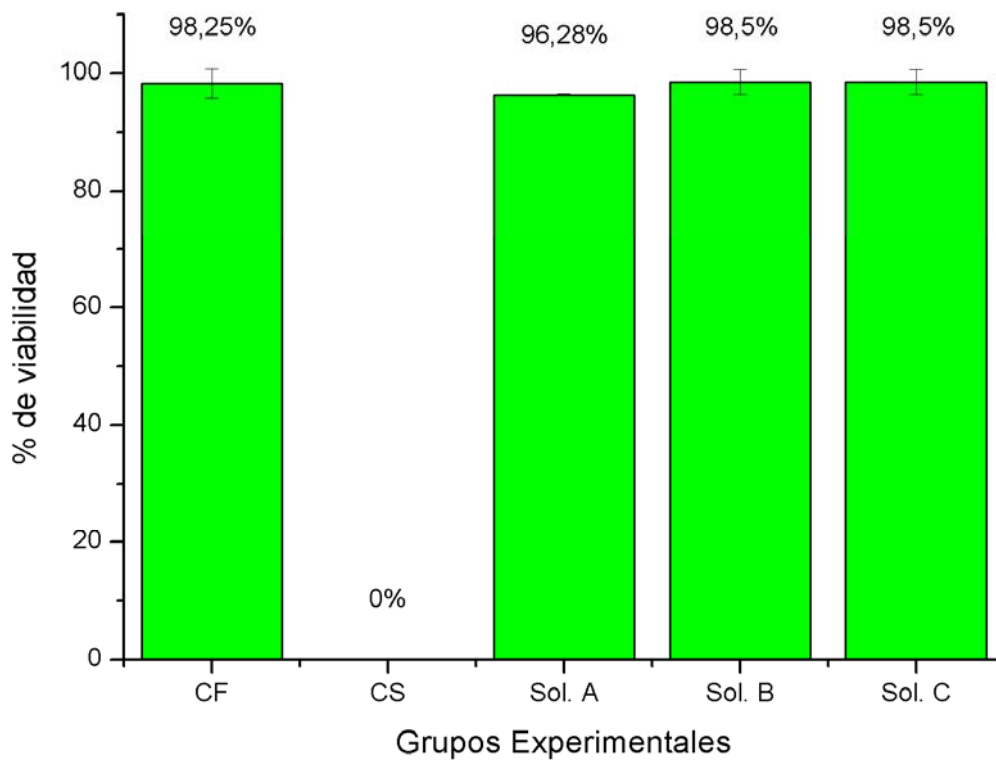


Figura 32. En la gráfica se observa el porcentaje de células viables obtenido de 2 ensayos independientes de la recultivación de sustitutos de corion de mucosa oral mediante ensayo de exclusión de Tripán Azul.

4.5. Análisis de las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral

4.5.1. Viscosimetría

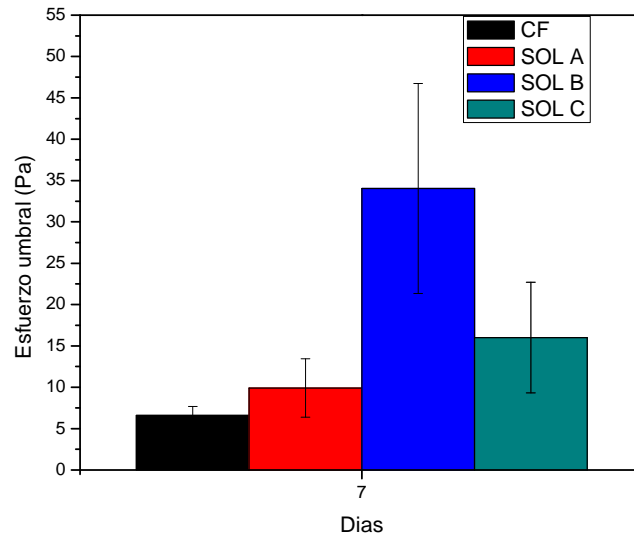


Figura 33. Se muestran los valores del esfuerzo umbral para el control sin criopreservar (CF) y tres muestras criopreservadas con distintos crioprotectores. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes \pm desviación standard.

En la figura 33 se muestran los valores del esfuerzo umbral (como anteriormente hemos comentado, se trata del esfuerzo mínimo que es necesario aplicar para hacer fluir el material) para una muestra control (CF) y tres muestras criopreservadas con distintos crioprotectores. Como podemos observar, esta magnitud es similar en el caso de la muestra protegida con la solución A al de la muestra CF. Por el contrario, en el caso de la muestra protegida con la solución C, y especialmente con la solución B, observamos un aumento importante del esfuerzo umbral. Para la muestra control criopreservada sin crioprotector (CS) no ha sido posible realizar su análisis porque la misma presentó distintos desgarros que impedían su evaluación.

4.5.2. Oscilometría

4.5.2.1. Barrido de Amplitud de esfuerzo. Módulo Elástico

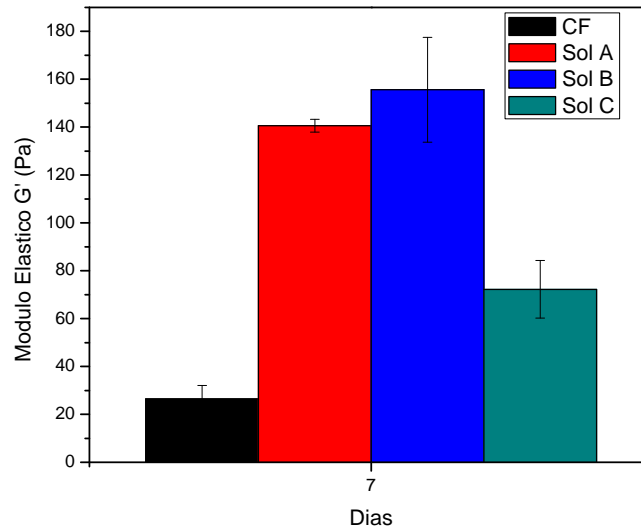


Figura 34. Módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal para la muestra de control y las tres muestras criopreservadas obtenido en experimento de oscilometría a frecuencia de 1 Hz. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes \pm desviación standard.

En la figura 34 se muestra el valor del módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal (aquella en la que los valores de los módulos viscoelásticos no dependen de la amplitud del esfuerzo aplicado) para una frecuencia de 1 Hz. Como observamos, la muestra control sin criopreservar (CF) presenta una baja elasticidad, en comparación con las muestras sometidas a un proceso de criopreservación. El caso de la muestra protegida con la solución A vemos que en este test presenta una elasticidad más elevada que CF.

4.5.2.2. Barrido de Amplitud de esfuerzo. Módulo Viscoso

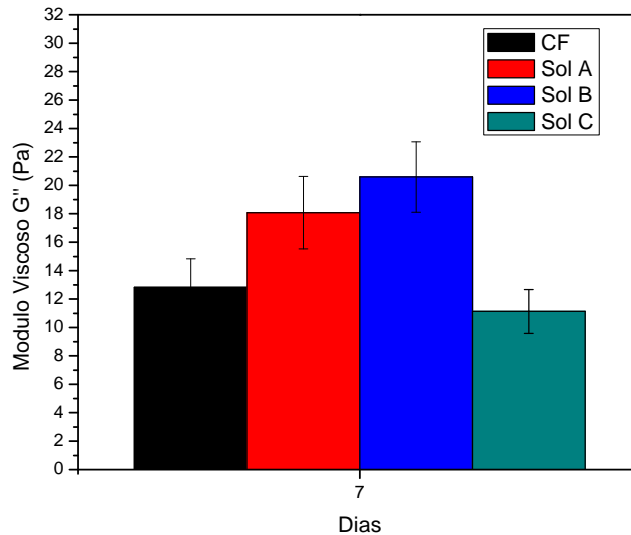


Figura 35. Módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal para la muestra de control y las tres muestras criopreservadas obtenido en experimento de oscilometría a frecuencia de 1 Hz. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes \pm desviación standard.

En esta figura 35 vemos el módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal obtenido a partir de barridos de amplitud de esfuerzo. Como se puede observar todas las muestras, tanto CF, como aquellas sometidas a un proceso de criopreservación, presentan valores de este módulo similares, por lo que podemos concluir que su respuesta viscosa es similar. Si comparamos esta gráfica con la anterior, vemos que G' es superior a G'' , por lo que todas las muestras presentan un comportamiento más elástico que viscoso. Sin embargo, este comportamiento más elástico que viscoso es más importante en las muestras criopreservadas utilizando la solución A y la solución B que en la muestra control y en aquella protegida con la solución C.

4.5.2.3. Barrido de Frecuencia de esfuerzo. Módulo Elástico y Módulo Viscoso.

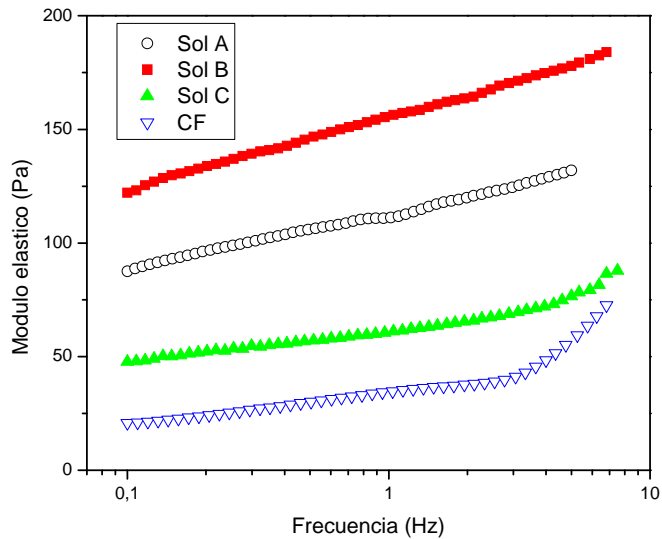


Figura 36. Módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal para la muestra de control y las tres muestras criopreservadas obtenido en experimento de oscilometría a frecuencia de entre 0,1 y 7 Hz. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes \pm desviación estándar.

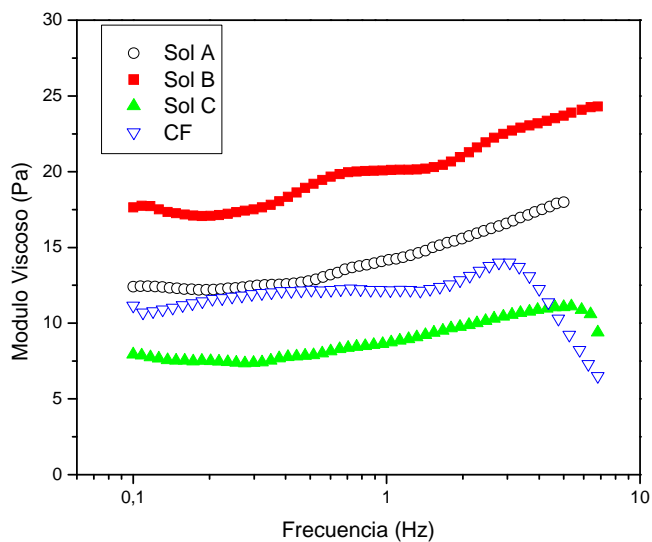


Figura 37. Módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal para la muestra de control y las tres muestras criopreservadas obtenido en experimento de oscilometría a frecuencia entre 0,1 y 7 Hz. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes \pm desviación estándar.

Las dos figuras (36, 37) muestran los resultados de los barridos de frecuencia dentro de la zona viscoelástica lineal. Lo primero que se observa es que el módulo elástico es para todas las muestras y en todo el rango de frecuencia estudiado superior al módulo viscoso.

Cuando realizamos un análisis pormenorizado del módulo elástico (G') (Figura 36) vemos que todas las muestras estudiadas presentan una tendencia común al aumento del módulo elástico con el aumento de la frecuencia. Esta tendencia es más acentuada a alta frecuencia y especialmente para la muestra control (CF). En lo que respecta a la comparación entre los valores relativos del módulo elástico de las distintas muestras vemos que los valores más bajos los presentan (CF).

Respecto del módulo viscoso (G'') (Figura 37) observamos dos tendencias claramente diferenciadas. Por una parte en el caso de CF y la las muestras criopreservadas con la solución C, G'' muestra una tendencia aproximadamente plana hasta frecuencias a tornos a 2 Hz seguida de una subida suave y una caída más abrupta para las frecuencias más elevadas. Esta tendencia es más acusada en el caso de CF. Por otra parte, en el caso de las muestras criopreservadas con las soluciones A y B, observamos que G'' aumenta con la frecuencia en todo el rango de frecuencia estudiado. En cualquier modo y en lo que respecta a nuestros tejidos criopreservados los valores de G'' están dentro del mismo orden de magnitud en todos los casos.

5-DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se ha logrado optimizar un protocolo para la criopreservación de un sustituto de corion de mucosa oral humana generado mediante ingeniería tisular cuyo objetivo final es su futura utilización clínica.

El uso terapéutico de los nuevos tejidos exige el cumplimiento de protocolos sanitarios antes de su incorporación a la práctica clínica. Como indicábamos en la introducción, la criopreservación constituye un segundo nivel en el que ejercer el control de calidad sanitario de los tejidos construidos artificialmente con el objeto de garantizar la idoneidad biológica y terapéutica y el uso diferido de ellos. En este sentido la criopreservación se constituye en uno de los mecanismos que se utilizan para evitar la degradación de los componentes celulares de los nuevos tejidos (Campos, 2004b; Dawson et al., 2003).

En nuestro trabajo de tesis doctoral se ha conseguido cultivar en el laboratorio fibroblastos gingivales humanos a partir de pequeñas biopsias extraídas con anestesia local. Nuestros cultivos de fibroblastos demostraron una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en medio de cultivo exento de factores de crecimiento. Estos resultados coinciden con los datos aportados por otros investigadores (Teixeira et al., 2004; Alaminos et al., 2007; Sánchez- Quevedo et al., 2007).

En relación con los andamiajes o soportes que se utilizan para la construcción de tejidos artificiales, diferentes autores han utilizados distintos biomateriales para la construcción de los tejidos en el laboratorio, destacando los geles de quitosán, agarosa, colágeno y fibrina (Meana et al., 1998; Schoop et al., 1999; Bach et al., 2001; Chinnathambi et al., 2003; Llamas et al., 2004; Llamas et al., 2006; Isenberg et al., 2006; Peretti et al., 2006; Talbot et al., 2006; Alaminos et al., 2007). En el caso de la utilización de colágeno distintos autores han observado que los geles tienden a perder volumen y a contraerse con el tiempo, por lo que el volumen de la mucosa obtenida resulta menor al tamaño previsto (Reichl et al., 2004; Alaminos et al., 2006; Capitán Cañadas, 2006). Por otro lado el estroma constituido por fibrina facilita el crecimiento de los fibroblastos y apenas presentan contracción en su volumen final, sin embargo las propiedades mecánicas no son comparables con la consistencia y elasticidad de la mucosa oral lo que dificultaría su empleo con fines terapéuticos (Rodríguez et al., 2011). En relación con la utilización de la

agarosa como sustituto de corion, Alaminos y colaboradores (2006) observaron que los fibroblastos crecen en su interior con mucha dificultad. En esta tesis doctoral hemos utilizado un soporte o andamiaje mixto compuesto por una mezcla de fibrina y agarosa 0,1 %, que ha desarrollado nuestro grupo de investigación y que ha demostrado su eficacia como sustituto de corion de mucosa oral (Sánchez-Quevedo et al., 2007; Alaminos et al., 2007; Rodríguez et al., 2011). El sustituto de fibrina y agarosa utilizado en esta tesis doctoral mejora los índices de consistencia al incorporar la agarosa, mientras que la utilización de fibrina tiene una ventaja adicional y es que al proceder del plasma sanguíneo, facilita la incorporación de citoquinas y factores de crecimiento que promueven la generación de un excelente microambiente que potencia la proliferación y desarrollo de las células a utilizar en el sustituto de corion (Alaminos et al., 2006).

En nuestro trabajo hemos utilizado como modelo experimental un sustituto de corion de mucosa oral tras una semana de su elaboración. Aunque los sustitutos de mucosa oral de espesor completo (epitelio-conectivo) necesitan veinte días tras su elaboración para disponer de un epitelio estratificado (Alaminos et al., 2007; Sanchez-Quevedo et al., 2007), la finalidad de trabajar con un sustituto de corion de una semana de elaboración, tiene por objeto evaluar la posibilidad de obtener un corion aceptable, en un menor plazo, tanto desde el punto de vista biológico como de sus propiedades biomecánicas. En este sentido, en relación con las propiedades biológicas, San Martín y colaboradores (2011), han demostrado que cuando se analiza la matriz extracelular de constructos de fibrina y agarosa generados por ingeniería tisular se observa que a partir de la primera semana ya se evidencian por medio de la inmunohistoquímica la expresión de proteínas de colágeno tipo I, III, VI así como la presencia lamina y decorina. Además, en los constructos de fibrina y agarosa los autores observaron que el número de células se mantiene constante entre la primera y la sexta semana de elaboración. Desde el punto de vista de las propiedades biomecánicas o reológicas, la fibrina y agarosa se considera un biomaterial viscoelástico, es decir, que coexisten propiedades viscosas y elásticas. En este sentido Rodríguez y colaboradores (2011), analizaron las propiedades reológicas de viscosidad y de elasticidad de constructos de fibrina y agarosa en un estudio temporal entre 1 y 21 días,

observando que dichas estructuras mantenían una estabilidad de las propiedades de viscosidad y elasticidad en período de tiempo analizado. Este comportamiento reológico de estabilidad en el transcurso de tiempo analizado se correlaciona con los datos biológicos del estudio de San Martín y colaboradores (2011) donde se observó un mantenimiento del número de células y de la estructura de la matriz extracelular.

Como comentábamos en el inicio de esta discusión dentro del control sanitario de los tejidos generados por ingeniería tisular existe un segundo nivel de control de calidad que estaría vinculado con el mantenimiento y la conservación de los tejidos mediante el proceso de criopreservación. En nuestra tesis doctoral hemos seleccionado para el proceso de criopreservación un método de congelación lenta siguiendo lo realizado por otros diferentes grupos de investigación como son los de Kuroyanagi (2004), Kubo y Kuroyanagi (2005), Spoerl (2008), Bhakta (2009), y Xiong (2010). Esta elección se fundamenta en que si la velocidad de enfriamiento es adecuada, es decir, que se utiliza un proceso de congelación lento, la célula se deshidratará y se concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación (formación de hielo), de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará. Por el contrario, si la velocidad con que desciende la temperatura es muy brusca, es decir un proceso de congelación rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular y el daño consecuente de la célula (Mazur, 1984; Boiso, 2001).

Una de las ventajas de la criopreservación de estos tejidos para su aplicación clínica como injertos, no sólo es su conservación, sino también que es posible una producción en masa y además la posibilidad de transporte de los mismos a otros centros sanitarios. En este sentido, los trabajos publicados por el grupo de investigación de Kuroyanagi (2003, 2004) destacan que sustitutos dérmicos alogénicos criopreservados están disponibles para treinta hospitales alrededor de Japón, y pueden ser transportados a esos hospitales en un estado de congelación y mantenidos en dichos lugares hasta antes de su utilización clínica. Siguiendo esta idea de la importancia del transporte de tejidos entre distintos centros hospitalarios, es por lo que en nuestra tesis

doctoral hemos desarrollado la elaboración de protocolos de criopreservación con un período de congelación de corto plazo (siete días) con el objeto de facilitar también su traslado lo más inmediato y efectivo.

Cuando realizamos el análisis macroestructural pudimos observar que las muestras que habían sido sometidas a un proceso de criopreservación con la utilización de crioprotectores mantenían al descongelarlas la estructura que permitía su manipulación para su posterior utilización como injerto. Por el contrario aquellas muestras donde no se utilizaron crioprotectores, es decir el control negativo, generaban al descongelarlas una desintegración de la estructura de las mismas que impedía su manipulación para la utilización como futuros injertos. Como señala Alaminos y colaboradores (2006), la incorporación de la agarosa en el modelo de la matriz extracelular de fibrina-agarosa aumenta los índices de consistencia de la misma. Ahora bien, tanto la agarosa como la fibrina son geles hidrosolubles y por tanto absorben mucha agua, esto ayudaría a explicar, en el caso de los controles negativos, que al congelar las muestras se formarían hielo dentro de la estructura y al descongelar se produciría la desintegración de las mismas. En el caso de los grupos experimentales la utilización de distintos crioprotectores creemos que ayudaría a evitar la formación de hielo dentro de la estructura y por tanto al descongelar las muestras, la macroestructura de los sustitutos de corion mantendrían la estabilidad. Estos datos se correlacionarían con lo observado por Spoerl y colaboradores (2008), quienes al criopreservar mucosa oral generada por ingeniería tisular a partir de colágeno, utilizando como crioprotector al DMSO, se mantiene la estructura del injerto tras la descongelación, lo que permite la manipulación quirúrgica.

Cuando se realizó el análisis histológico con microscopía óptica se observó en todos los grupos experimentales un aumento del patrón de porosidad, es decir un aumento de los espacios interfibrilares, en la matriz extracelular de los sustitutos de corion de mucosa oral, denotando una ligera alteración microestructural. En el grupo control donde no se utilizó solución crioprotectora (CS) se observaron alteraciones extremas de la microestructura. En este caso, la media del área interfibrilar fue de 33,98 % siendo mayor y estadísticamente significativo con respecto al control que no fue sometido a criopreservación (CF) y que presentaba un área interfibrilar de 21,15 %.

Cuando analizamos los grupos experimentales donde se utilizaron distintos crioprotectores observamos que la solución A presenta una media del área interfibrilar del orden del 23,09 %, que no es estadísticamente significativa con respecto a CF. Al valorar la solución B y solución C los valores obtenidos del área interfibrilar fueron de 27,06 % y 27,74 % respectivamente. Estos valores fueron mayores y estadísticamente significativos con respecto a CF. De todas maneras la utilización de soluciones crioprotectoras indican que se minimizan las alteraciones microestructurales de los sustitutos de corion de mucosa oral sometidos a procesos de criopreservación con respecto a CS. Estos datos coinciden con Kubo y Kuroyanagi (2005) quienes demostraron que al criopreservar sustitutos dérmicos alogénicos, construidos con ácido hialurónico y atelo-colágeno, utilizando como crioprotector el DMSO al 10 %, observan con microscopía electrónica de barrido que la estructura porosa original de dicho sustituto dérmico se mantiene. En nuestro análisis histológico observamos que la solución A fue la que mejor se comportó (dentro de las soluciones crioprotectoras) en el mantenimiento de la microestructura. Podemos inferir entonces que la mayor concentración de DMSO en la solución crioprotectora A (Solución A con DMSO al 15 % y solución B con DMSO al 10 %) sería la responsable de dicho comportamiento. Por el contrario Wang y colaboradores (2007), analizó los efectos del DMSO en la criopreservación en sustitutos dérmicos generados por ingeniería tisular con ácido poliglicólico. Dichos autores observaron, con microscopía electrónica de barrido, que las soluciones crioprotectoras de DMSO al 10 % generan un menor desprendimiento de los fibroblastos y de la matriz extracelular que ellos producen en el constructo de ácido poliglicólico, que cuando se utilizan soluciones crioprotectoras de DMSO al 15 %. Los autores explican que esto se debería a que la viabilidad de los fibroblastos es mayor con DMSO al 10 %.

Lo observado por el grupo de Wang (2007) nos permitiría explicar los resultados obtenidos en nuestro trabajo cuando realizamos un análisis de cuantificación de células dentro de la matriz de fibrina y agarosa. En nuestro estudio observamos en efecto que el número de células presentes en esa matriz de fibrina y agarosa fue mayor con la solución B que con la solución A y a su vez esta mayor que con la solución C.

Ahora bien, para poder determinar la capacidad de proliferación de las células presentes en la matriz extracelular de nuestro modelo experimental realizamos ensayos de PCNA en forma inmediata a su descongelación y a las 24 horas de producida esta. Nuestros resultados mostraron que si bien se observa un mayor índice de proliferación celular en los sustitutos que fueron analizados a las 24 horas posterior a la descongelación no hubo diferencias estadísticamente significativas de esa proliferación celular entre los sustitutos valorados en forma inmediata. Sin embargo, si pudimos corroborar que el mayor índice de proliferación celular se observó en sustitutos de corion crioprotegidos con la solución B y que esos valores fueron similares a los observados en los sustitutos de corion utilizados como controles no criopreservados (CF), no habiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, los sustitutos de corion criopreservados con la solución A mostraron una proliferación celular que fue estadísticamente menor al control fresco. A su vez los sustitutos crioprotegidos con la solución C fueron los que mostraron el menor índice de proliferación celular de todos grupos experimentales. Los datos en los índices de proliferación celular se correlacionan con el análisis de cuantificación de células observándose que los sustitutos de corion crioprotegidos con la solución B son los que mejores resultados aportaron. Por otro lado, el sustituto control criopreservado sin crioprotector (CS) mostró una disminución del índice de proliferación hasta valores de 0 % a las 24 horas de la descongelación siendo el que peor comportamiento tuvo en todas las situaciones experimentales. Todo esto puede explicarse a partir de los estudios realizados por Wang y colaboradores (2007) donde destacan que el DMSO al 10 % ofrece una mayor viabilidad celular que el DMSO a una concentración del 15 % debido a que la toxicidad del DMSO se incrementa con la concentración del mismo en los crioprotectores. En relación a la menor respuesta ofrecida por el crioprotector de la solución C, Bravo y colaboradores (2000) y García López (1982) explican, en sus distintos estudios, que el mejor comportamiento del DMSO sobre el Glicerol se debe a que este posee una mayor capacidad para difundirse a través de las membranas biológicas y de ahí su mejor propiedad preservadora. Los autores destacan que el DMSO establece puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, reduciendo el calor latente de fusión; además, modifica el

punto crioscópico del medio, disminuyendo la posibilidad de formación de núcleos de hielo, que conllevarían a la creación de un gradiente osmótico, lo cual sería indeseable para la célula. El Glicerol por otra parte es un criopreservador de gran importancia, aunque su ámbito de aplicación no sea tan amplio como el del DMSO, probablemente debido a su menor capacidad de penetración a través de las membranas celulares.

Las fundamentaciones realizadas más arriba, ayudan también a explicar los ensayos de recultivación de los sustitutos de corion de los distintos grupos experimentales realizados en este trabajo, donde se observó una mayor proliferación celular cuando los sustitutos se crioprotegieron con la solución B. Asimismo, al valorar la viabilidad celular con los métodos de live & dead y azul tripán, en los casos donde utilizamos crioprotectores la misma se situó por encima del 96 %. Esto sin duda es buen signo ya que como lo destacan Kubo y Kuroyanagi (2005) en sus trabajos de criopreservación de sustitutos dérmicos los fibroblastos recultivados después de la descongelación mantienen su capacidad de proliferación y liberación de citoquinas (VEGF, bFGF, HGF, TGF-B1, and IL-8). Los autores agregan que la liberación de estas citoquinas por parte de estas células recultivadas jugarían un rol muy importante, por ejemplo, en los procesos de cicatrización.

En relación al análisis de las propiedades biomecánicas de los tejidos blandos, los mismos han sido evaluados por diferentes autores, usando diferentes métodos. Inoue y sus colaboradores (1985) evaluaron las propiedades reológicas de tejidos blandos orales utilizando un método de compresión directa. Birch y Srodon (2009) para analizar en un estudio biomecánico ex vivo las propiedades reológicas de la mucosa del paladar utilizó un método experimental de relajación-tensión. En esta tesis doctoral hemos analizado el comportamiento de las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral a base de fibrina y agarosa utilizando un reómetro para obtener medidas en estado estacionario o viscosimetría, y medidas en régimen dinámico u oscilométría. Otros autores han empleado el mismo método para conocer las propiedades viscoelásticas de diferentes tejidos blandos (Chan y Titze, 1999; Yatabe et al., 1991; Webb y Kutty, 2009). En particular el trabajo de Chan y Titze es pionero en la caracterización de las

propiedades biomecánicas de mucosas de cuerdas vocales. Asimismo, nuestro grupo de investigación ya utilizó este método para evaluar las propiedades biomecánicas de viscosidad y elasticidad en los constructos de fibrina y agarosa, comparándolas con andamiajes de fibrina (Rodríguez et al., 2011). En dicho trabajo se realizó un estudio temporal de los sustitutos de corion de mucosa oral observando que los andamiajes de fibrina y agarosa mantenían una estabilidad de las propiedades de viscosas y elásticas en un período de tiempo analizado de 21 días, mientras que las de fibrina aumentaban su rigidez en el transcurso de ese tiempo.

Cuando realizamos el análisis de las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral elaborados con fibrina y agarosa sometidos a los distintos protocolos de criopreservación observamos que los valores del esfuerzo umbral (esfuerzo mínimo que es necesario aplicar para hacer fluir el material) es similar en el caso de la muestra protegida con la solución A al control CF; es decir, en este caso el proceso de criopreservación no parece haber afectado a la rigidez de la muestra. Sin embargo, las muestra crioprotegida con la solución C, y especialmente con la solución B, mostraron un aumento importante del esfuerzo umbral, y por tanto de la rigidez, que probablemente esté asociado a cambios internos provocados por el proceso de criopreservación. No obstante, en todos los casos analizados se observó una baja rigidez (valores del esfuerzo umbral inferiores a 50 Pa), que es propia de materiales blandos.

Cuando analizamos el módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal (aquella en la que los valores de los módulos viscoelásticos no dependen de la amplitud del esfuerzo aplicado) para una frecuencia de 1 Hz, observamos, que CF presentó una baja elasticidad, en comparación con las muestras sometidas a un proceso de criopreservación. En cualquier caso los valores de las muestras criopreservadas con los distintos crioprotectores se encuentran dentro del rango de valores obtenidos en caso de tejidos naturales no sometidos a criopreservación ($G' \approx 10\text{-}200$ Pa) (Chan y Titze, 1999).

Al analizar el módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal obtenido a partir de barridos de amplitud de esfuerzo, pudimos observar que todas las muestras presentan valores de este módulo similares, y por tanto la respuesta viscosa es similar. Al comparar los valores del módulo elástico con

los valores del módulo viscoso en todas las muestras, podemos concluir que todas las muestras presentan un comportamiento más elástico que viscoso. Sin embargo, este comportamiento más elástico que viscoso es más importante en las muestras criopreservadas utilizando la solución A y la solución B que en CF y en aquella protegida con la solución C.

Cuando analizamos los resultados de los barridos de frecuencia dentro de la zona viscoelástica lineal, lo primero que observamos es que el módulo elástico es para todas las muestras y en todo el rango de frecuencia estudiado superior al módulo viscoso. Por tanto, podemos concluir que en la zona viscoelástica lineal los materiales presentan una respuesta principalmente elástica. No obstante, la respuesta viscosa no es despreciable. En primer lugar al realizar un análisis pormenorizado del módulo elástico todas las muestras estudiadas presentan una tendencia común al aumento del módulo elástico con el aumento de la frecuencia. Esta tendencia es más acentuada a alta frecuencia y especialmente para la muestra control (CF). Este tipo de comportamiento ha sido observado previamente en el caso de muestras de mucosa oral humana natural (Chan y Titze, 1999). Cuando realizamos la comparación entre los valores relativos del módulo elástico de las distintas muestras observamos que los valores más bajos los presentan las muestras del control (CF), aunque todos los valores están dentro del rango referenciado para tejidos blandos de origen natural (Chan y Titze, 1999). Desde el punto de vista físico un aumento de G' viene a indicar un aumento de la respuesta elástica del material. En el trabajo de Chan y Titze (1999) se encontró que el módulo elástico aumenta, en general, al aumentar la edad de los individuos. El hecho de que G' sea superior en las muestras criopreservadas con crioprotectores que en las de control (CF) podría interpretarse como un envejecimiento de las primeras. En cuanto al aumento de G' con la frecuencia, y puesto que se observa tanto en los tejidos naturales como en los preparados mediante ingeniería tisular podríamos concluir que se trata de una característica fisiológica asociada a este tejido.

Cuando analizamos G'' se pudo observar dos tendencias claramente diferenciadas. Por una parte en el caso de la muestra de control y la criopreservada con la solución C, G'' muestra una tendencia aproximadamente plana hasta frecuencias en torno a 2 Hz seguida de una subida suave y una

caída más abrupta para las frecuencias más elevadas. Esta tendencia es más acusada en el caso de la muestra de control. Hasta donde nosotros sabemos no existen datos bibliográficos del valor de G'' en función de la frecuencia para muestras de tejidos naturales de mucosa oral. No obstante en el trabajo de Titze y Chan (1999) se muestran valores del factor de amortiguamiento de este tipo de tejido en función de la frecuencia para el mismo rango de estudio considerado en nuestro trabajo. Curiosamente la tendencia que muestra el factor de amortiguamiento es, a grandes rasgos, idéntica a la que aquí observamos para G'' en el caso de la muestra de control y la crioprotegida con el solución C: un comportamiento aproximadamente plano inferior a 2 Hz seguido a un aumento y una posterior disminución. Aunque desde el punto de vista físico G'' y el factor de amortiguamiento son magnitudes distintas ambas están relacionadas con las pérdidas de origen viscoso en el material. Por tanto, podríamos concluir que la tendencia observada para G'' en el caso de la muestra de control y la crioprotegida con la solución C se debe a características fisiológicas de este tipo de tejido.

En el caso de las muestras criopreservadas con las soluciones A y B, observamos que G'' aumenta con la frecuencia en todo el rango de frecuencia estudiado. Esta diferencia en comportamiento para estas muestras, también observada en la gráfica de G' podría de nuevo asociarse con un envejecimiento de los tejidos. En este punto es importante destacar que en el trabajo de Titze y Chan (1999) se observa en muchos casos un aumento del factor de amortiguamiento con la edad del individuo del que se extrajo el tejido. No obstante y a diferencia de lo que ocurría a diferencia de G' este resultado no es concluyente. En cualquier modo y en lo que respecta a nuestros tejidos criopreservados los valores de G'' están dentro del mismo orden de magnitud en todos los casos.

Como conclusión general al estudio reológico realizado podríamos decir que todas las muestras criopreservadas poseen parámetros reológicos (esfuerzo umbral, módulo elástico, módulo viscoso) apropiados para su uso en medicina regenerativa como se desprende del hecho de que estos valores sean similares a los de la muestra de control y, en todo caso, dentro del rango valores bibliográficos existentes sobre tejidos naturales.

Finalmente, en relación con la discusión de esta tesis, es importante reseñar que los resultados macroestructurales, histológicos, de viabilidad celular y de sus propiedades biomecánicas nos han permitido establecer patrones de criopreservación en todas las situaciones experimentales que pueden ser útiles en relación con los distintos objetivos que plantea el uso de los sustitutos de corion de mucosa oral también en programas terapéuticos inmediatos o diferidos.

6-CONCLUSIONES

1. Los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y biomaterial de fibrina y agarosa constituyen un constructo apto para someterse a criopreservación con las soluciones crioprotectoras A (DMSO 15 %), B (DMSO 10 %) y C (Glicerol) y el protocolo estandarizado existente en los Bancos de Tejidos, así como para ser evaluados mediante los controles de calidad propuestos para los tejidos artificiales.

2. La evaluación del comportamiento macroestructural de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras y el protocolo estandarizado de los Bancos de Tejidos, mantienen la forma y la consistencia sin generar cambios artefactuales significativos a diferencia de los sustitutos de corion criopreservados en ausencia de soluciones crioprotectoras.

3. La evaluación histológica con microscopía óptica del patrón de porosidad de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras y el protocolo estandarizado de los Bancos de Tejidos, pone de relieve que sólo en los sustitutos en los que se utiliza la solución crioprotectora tipo A se observa un patrón de porosidad compatible con los valores ortotípicos, a diferencia de los patrones de porosidad que se observan cuando se utilizan las soluciones crioprotectoras tipo B y C, y cuando la criopreservación se realiza sin soluciones crioprotectoras.

4. La evaluación histológica con microscopía óptica del número de células existente en los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras y el protocolo estandarizado de los Bancos de Tejidos, pone de relieve la presencia de una mayor población fibroblástica en los sustitutos criopreservados con la solución

tipo B a los que siguen en población los sustitutos criopreservados con las soluciones A y C, y los sustitutos criopreservados sin solución crioprotectora

5. La evaluación inmunohistoquímica de la proliferación celular a nivel tisular en los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras y el protocolo estandarizado de los Bancos de Tejidos, pone de relieve la existencia de una mayor proliferación celular en los sustitutos que utilizan la solución crioprotectora tipo B a los que siguen en proliferación los sustitutos criopreservados con las soluciones A y C, y los sustitutos criopreservados sin solución crioprotectora.

6. La evaluación de la viabilidad celular con microscopía óptica y de fluorescencia de células aisladas procedentes de la recultivación de sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras y el protocolo estandarizado de los Bancos de Tejidos, pone de relieve la existencia de una viabilidad superior al 96% cuando se utilizan las 3 soluciones crioprotectoras y un mayor número de células viables cuando se utiliza la solución tipo B que cuando se utilizan las soluciones C y A.

7. La evaluación de las propiedades biomecánicas mediante estudios reológicos de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras estandarizadas de los Bancos de Tejidos, pone de relieve que dichos sustitutos poseen parámetros reológicos apropiados –esfuerzo umbral, modulo elástico y modulo viscoso- para su uso en medicina regenerativa al poseer valores compatibles con los valores control.

8. La evaluación conjunta del comportamiento macroestructural, el patrón de porosidad, la población fibroblástica, la proliferación celular, la viabilidad celular y las propiedades biomecánicas de los sustitutos de corion de mucosa oral generados por ingeniería tisular con fibroblastos gingivales humanos y fibrina-agarosa, sometidos a criopreservación con las soluciones crioprotectoras A, B y C y el protocolo estandarizado de los Bancos de Tejidos, pone de relieve que la utilización de la solución crioprotectora tipo B asegura un elevado nivel de calidad estructural, biológico y funcional para dicho constructo que lo hace útil para ser utilizado con carácter diferido en los protocolos de medicina regenerativa sustentados en la incorporación al organismo de tejidos artificiales.

7- RESUMEN

El objetivo de esta tesis doctoral fue realizar un análisis macroestructural, histológico, de viabilidad celular y de propiedades biomecánicas para sustitutos de corion de mucosa oral generados mediante ingeniería tisular cuando los mismos son sometidos a procesos de criopreservación utilizando distintas soluciones crioprotectoras.

Se criopreservaron durante 7 días sustitutos de corion de mucosa oral a base de fibrina y agarosa con fibroblastos gingivales humanos criopreservados con las soluciones crioprotectoras A (DMSO 15 %), B (DMSO 10 %) y C (Glicerol). Los controles fueron sustitutos de corion no criopreservados (CF) y sustitutos preservados sin solución crioprotectora (CS).

Los resultados del análisis macroestructural muestran que la forma y la consistencia en gel de los sustitutos criopreservados con las distintas soluciones protectoras se asemejan a CF. El análisis histológico mediante microscopía óptica reveló que la solución A mantiene un patrón de porosidad similar a los valores de CF. Al evaluar el número de células en la matriz de fibrina y agarosa los sustitutos crioprotegidos con la solución B mostraron mejores resultados. La viabilidad celular mediante el estudio inmunohistoquímico PCNA mostró que el índice de proliferación celular fue mayor en los sustitutos criopreservados con la solución B. El método de recultivación y su análisis de viabilidad por técnica de Live & Dead destacó la mayor proliferación de células con la solución B. El método de exclusión vital de azul tripán y Live & Dead mostraron un alto porcentaje de viabilidad celular en los sustitutos crioprotegidos. El control CS fue el que mostró las mayores alteraciones en todos los análisis realizados. El análisis de las propiedades biomecánicas mostró que los sustitutos criopreservados con las distintas soluciones mostraron parámetros reológicos (esfuerzo umbral, módulo elástico, módulo viscoso) apropiados para su uso en medicina regenerativa.

Conclusión: los resultados han permitido establecer patrones de criopreservación para todas las situaciones experimentales destacando a la solución B (DMSO 10 %) como el mejor crioprotector para la criopreservación de sustitutos de corion de mucosa oral a base de fibrina y agarosa.

Palabras claves: criopreservación, ingeniería tisular, fibroblastos gingivales humanos, crioprotectores.

8- SUMMARY

The aim of this work was to analyze the macro-structural, histological, cell viability and biomechanical properties of human oral mucosa chorion substitutes generated by tissue engineering and submitted under different cryopreservation protocols.

Human oral mucosa chorion substitutes based on fibrin agarose with human gingival fibroblasts cultured 7 days at in vitro conditions were cryopreserved with three cryoprotective solutions (A (DMSO 15 %), B (DMSO 10 %) y C (Glicerol)). As controls chorion substitutes in absence of cryopreservation processes (CF) and cryopreserved substitutes in absent of cryoprotective solution were used (CS). Macro-structural analysis results showed that the shape and gel consistency of cryopreserved substitutes with different cryoprotective solutions were similar to CF. Histological analysis by light microscopy revealed that the solution A maintain a porosity pattern similar to the values of CF. According to the number of cells in the fibrin agarose matrix the cryoprotective substitutes with solution B showed better results. Cell viability detected by PCNA immunochemical studies showed that cell proliferation index was higher in cryopreserved substitutes with solution B. The re-cultivation method and cell viability analyzes by using Live & Dead reveled an increased proliferation of cells with solution B. The vital exclusion method tripan blue and Live & Dead showed a high percentage of cell viability in the cryoprotetive substitutes. Apart from this, CS control showed the greatest alterations along the analysis. Biomechanical properties analysis showed that cryopreserved substitutes by using different solutions exhibited adequate rheological parameters (yield stress, elastic modulus and viscous modulus) suitable for use in regenerative medicine

Conclusion: These results have established patterns of cryopreservation for all experimental situations pointing the solution B as the best cryoprotectant for cryopreservation of oral mucosa chorion substitutes based on fibrin agarose.

Keywords: Cryopreservation, tissue engineering, human gingival fibroblasts.

9-BIBLIOGRAFÍA

Akyurt M, Zaki G, Habeebullah B (2002). Freezing phenomena in ice water systems. *Energy Conversion and Management* 43: 1771-1789.

Amir G, Horowitz L, Rubinsky B, Yousif BS, Lavee J (2004). Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein II. *Cryobiology* 48: 273-282.

Alaminos M, Sánchez Quevedo MC, Muñoz Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3311-3317.

Alaminos M, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, Gonzalez-Andrades M, Fernandez-Montoya A, Campos A (2007). Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 1(5): 350-359.

Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, Bittner KM, Stark GB (2001). Fibrin glue as matrix from cultured autologous urothelial cells in urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng* 7: 45-53.

Bannasch H, Föhn M, Unterberg T, Bach AD, Weyand B, Stark GB (2003). Skin tissue engineering. *Clin Plast Surg* 30(4): 573-579. Review

Barnes HA, Hutton JF, Walters FRS (1993). An introduction to rheology. Elsevier Science Publisher B.V.

Bhakta G, Lee KH, Magalhaes R, Wen F, Gouk SS, Huttmacher DW, Kuleshova LL (2009). Cryoreservation of alginate-fibrin beads involving bone marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification. *Biomaterials* 30: 336-343.

Birch MJ, Srodon PD (2009). Biomechanical properties of the human soft palate. *Cleft Palate Craniofac J* 46(3): 268-274.

Boiso I (2001). Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 18(4): 20-22.

Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, Gonzalez L, Rakich DR, Meyer JM (2000). Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater* 16: 213-217.

Bravo D, Rigley TH, Gibran N, Strong DM, Newman-Gage H (2000). Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* 26: 367-378.

Campos A (2004a). Objetivos conceptuales y metodológicos de la investigación en odontología. *Educación Médica* 7(2): 36-40.

Campos A (2004b). *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid.*

Capitán Cañadas LM (2006). Caracterización histológica de mucosa oral de espesor completo obtenida mediante ingeniería tisular. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

Chan RW, Titze IR (1999). Viscoelastic shear properties of the human vocal fold mucosa: measurement methodology and empirical results. *J Acoust Soc Am* 106: 2008- 2021.

Chen G, Ushida T, Tateishi T (2002). Scaffold desing for tissue engineering. *Macromol Biosci* 2: 67-77.

Chinnathambi S, Tomanek-Chalkley A, Ludwing N, King E, De Waard R, Johnson G, Wertz PW, Bickenbach JR (2003). Recapitulation of oral mucosal tissues in long-term organotypic culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270: 162-174.

Clark R, Singer AJ (2000). Wound repair: basic biology to tisular engineering. En: Principles of tisular engineering 2nd edition. Ed. Lanza RP, Langer, Vacanti J. Elsevier, California: 857-878.

Dawson L, Bateman-House AS, Mueller Agnew D, Bok H, Brock DW, Chakravarti A, Greene M, King PA, O'brien SJ, Sachs DH, Schill KE, Siegel A, Solter D, Suter SM, Verfaillie CM, Walters LB, Gearhart JD, Faden RR (2003). Safety issues in cell-based intervention trials. *Fertil Steril* 80: 1077-1085.

Dinatolo E, Gimenez Zapiola C, Marquez S, Perez A, Martinez E, Sansinena M (2011). 48 effect of trehalose addition on in vitro viability of cooled RAM spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 24(1): 136.

Elford BC and Walter CA (1972). Effects of electrolyte composition and pH on the structure and function of smooth muscle cooled to -79°C in unfrozen media. *Cryobiology* 9: 82-100.

Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819): 154-156.

Ferraris ME, Campos A (2009) *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3era ed, Editorial Medica Panamericana, México, pp. 136-176.

Ferry JD (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. 3^a Edición. Wiley. New York.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17(4): 331-340.

Fujioka M, Fujii T (1997). Maxillary growth following atelocollagen implantation on mucoperiosteal denudation of the palatal process in young rabbits:

implications for clinical cleft palate repair. *Cleft Palate Craniofac J* 34(4): 297-308.

Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M (2009). In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res* 44(5):588-597.

García JV (1984). Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 6(4): 219-225.

García López J (1982). Criopreservación: Estado actual y perspectivas futuras. *Biol Clín Hematol* 4: 137-144.

Grossmann M, Santaló J (1991). Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol* 42: 87-108.

Hans SB, Yang HK, Shin YJ, Wee WR (2012). Toxicity of voriconazole on corneal endothelial cells in an animal model. *Br J Ophthalmol* (Epub ahead of print).

Ikada Y (2006). Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 3(10): 589-601. Review.

Inoue K, Arikawa H, Fujii K, Shinohara N, Kawahata N (1985). Viscoelastic properties of oral soft tissue. A method of determining elastic modulus of oral soft tissue. *Dent Mater J* 4(1):47-53.

Isenberg BC, Willians C, Tranquillo RT (2006). Endothelialization and folw conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng* 34: 971-985.

Izumi K, Feinberg SE, Terashi H, Marcelo CL (2003). Evaluation of transplanted tissue-engineered oral mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice. *Tissue Eng* 9(1): 163-174.

Izumi K, Song J, Feinberg SE (2004). Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side. *Cells Tissues Organs* 176(1-3): 134-152.

Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J (2002). Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 9 (10): 642-647.

Knight MA, Evans GR (2004). Tissue engineering: progress and challenges. *Plast Reconstr Surg* 114(2): 26E-37E.

Kubo K and Kuroyanagi Y (2005). The possibility of long-term cryopreservation of cultured dermal substitute. *Artif Organs* 29(10): 800-805.

Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H (2003). Manufacturing and banking system for allogeneic cultured dermal substitute (Regenerative Medical Millennium Project of the Ministry of Health, Labor and Welfare). *Jpn J Burn Injuries* 29: 28-38.

Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H (2004). Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs* 28: 13-21.

Kutty JK, Webb K (2009). Tissue engineering therapies for the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng* 15: 249-262.

Langer B, Langer L (1985). Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 48: 151-155.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110): 920-926. Review.

Lauer G, Schimming R, Gellrich NC, Schmelzeisen R (2001). Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient sites. *Plast Reconstr Surg* 108(6): 1564-1575.

Lavik E, Langer R (2004). Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(1):1-8. Review.

Luitaud C, Laflamme C, Semlali A, Saidi S, Grenier G, Zakrzewski A, Rouabhia M (2007). Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83(2):554-561.

Llames SG, del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escámez MJ, Jorcano JL, López E, Holguín P, Meana A (2004). Human plasma as a scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 77: 350-355.

Llames SG, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank* 7(1): 47-53.

Larson RG (1999). *The structure and rheology of complex fluids*. Oxford University Press.

Lovelock JE (1953). The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10:414-426.

Macosko CW (1994). *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. VCH Publisher, inc.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(2): 7634-7638.

Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353 (6346): 750-752.

Mazur P (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47: 347-369.

Mazur P (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: C125-142.

Meyers MA, Chen PY, Lin AYM, Saki Y (2008). Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*. 1(3): 208-226.

Meryman H (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8(2):173-183.

Miller CS, Damm DD (1992). Incidence of verapamil-induced gingival hyperplasia in a dental population. *J Periodontol* 63(5): 453-456.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(10): 5807-5812.

Montalvo A (2008). Evaluación genética y microanalítica de las células madre de la gelatina de wharton para su utilización en Ingeniería Tisular. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

Meana A, Iglesias J, del Río M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martín C, San Román F, Tevar F (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a termal matriz based on live fibroblasts containing fibrin gels. *Burns* 24: 621-630.

Palsson BO, Bhatia SN (2004). *Tissue engineering*. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, D'Archivio D, Lisanti L, Di Luccio A, Perinetti G (2002). Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *J Periodontol* 73(11): 1299-1307.

Pegg DE, Wang L and Vaughan D (2006). Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: the liquidus tracking method. *Cryobiology* 52: 360-368.

Pegg DE (2007). Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 368: 39-57.

Peretti GM, Xu JM, Bonassar LJ, Kirchhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA (2006). Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng* 12: 1151-1168.

Pini Prato G, Tinti C, Vincenzi G, Magnani C, Cortellini P, Clauser C (1992). Guided tissue regeneration versus mucogingival surgery in the treatment of human buccal gingival recession. *J Periodontol* 63(11): 919-928.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.

Porcu E (2001). Oocyte Criopreservation. En: *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. Eds. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. UK: Martin Dunitz Ltd, London.

Pretuzzelli GJ, Jhonson JT, Myers EN, Kline JM (1992). Histomorphometric analysis of oncological reconstruction. *Ann Plast Surg* 47(3): 293-298.

Prósper F (2004). Verfaillie. Células madre adultas: fuentes, características y perspectivas sobre su uso terapéutico. En: *Investigación con células troncales, Monografías Humanitas*. Barcelona: 7-22.

Raff M (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 1-22.

Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.

Rana K (1995). Preservation of gametes. Broodstock management of egg and larval quality. En: *Blackwell Scientific Publications*. Eds. Bromage N y Roberts R, Oxford: 53-73.

Reichl S, Bernarz J, Muller-Goymann CC (2004). Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 88: 5608.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359(6395): 550-551.

Rheinwald JG, Green H (1977). Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265(5593): 421-424.

Rodriguez IA (2005). Efecto Citotóxico de los Sistemas Adhesivos Dentales. Estudio Microscópico y Microanálítico. Tesis Doctoral.

Rodriguez IA, Fernandez-Segura E, Ceballos, G, Arrebola F, Sanchez-Quevedo MC, Campos A (2008). Hybrid cell death induced by exposure to 2-Hydroxyethyl-methacrylate (HEMA): An ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent* 10: 105-111.

Rodríguez IA, López-López MT, Oliveira ACX, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M, Durán JDG (2011). Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* (En prensa, 2011)

Roodenburg JLN, ten Bosch JJ, Borsboom PCF (1990). Measurement of the uniaxial elasticity of oral mucosa in vivo after CO₂ -laser evaporation and surgical excision. *Int J Oral Maxillofac Surg* 19:181-183.

Rosenthal E, Carroll W, Dobbs M, Scott Magnusson J, Wax M, Peters G (2004). Simplifying head and neck microvascular reconstruction. *Head Neck* 26(11): 930-936.

Ross MH (2007). Pawlina W. Tejido conjuntivo. En: *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Ed. Lippincott Williams JB & Wilkins. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires: 160-196.

Sallum EA, Casati MZ, Caffesse RG, Funis LP, Nociti Júnior FH, Sallum AW (2003). Coronally positioned flap with or without enamel matrix protein derivative for the treatment of gingival recessions. *Am J Dent*. 16(5): 287-291.

Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* 22(6): 631-640.

San Martín S, Alaminos M, Zorn T, Sanchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodríguez IA, Campos A (2011). The effects of fibrin and fibrin-agarose in the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* (En prensa, 2011)

Schoop VM, Miracea N, Fusenig NE (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112: 343-353.

Seidel GE Jr (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65: 228-235.

Shah JP, Patel SG (2004). Cirugía Reconstructora. En: Cirugía y Oncología de Cabeza y Cuello 3a edición. Ed. Shah JP, Patel SG. Elsevier. España, Madrid, 2004: 589-631.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(23): 13726-13731.

Spoerl G, Mai R, Klingner E, Gedrange T, Lauer G (2008). Cryopreserved tissue engineered mucosa. *Folia Histochem Cytobiol* 46(4): 541-544.

Tal H, Moses O, Zohar R, Meir H, Nemcovsky C (2002). Root coverage of advanced gingival recession: a comparative study between acellular dermal matrix allograft and subepithelial connective tissue grafts. *J Periodontol* 73(12): 1405-1411.

Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guerin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L (2006). Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 12: 65-75.

Tanaka H, Maeda K, Okita Y (2003). Transplantation of the cryopreserved tracheal allograft in growing rabbits. *J Pediatric Surg* 38: 1707-1711.

Teixeira AI, Nealey PF, Murphy CJ (2004). Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates. *J Biomed Mater Res A* 71(3): 369-376.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145-1147.

Trounson A, Mohr L (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707-709.

Trounson A (1986). Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 46: 1-12.

Urken ML (1995). Free flap. Radial forearm. En: *Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction*. Ed. Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H. Raven Press, New York: 261-290.

Vacanti CA (2006.) The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 10(3): 569-576. Review.

Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE (2003). Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol* 28: 165-172.

Vila L, García J (1983). Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol* 5: 135-142.

Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Owaki H, Ono K, Yasui N (1989). Repair of rabbit articular surfaces with allografts of chondrocytes embedded in collagen gels. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 63(5): 529-538.

Wang X, Hua TC, Sun DW, Lui B, Yang G, Cao Y (2007). Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology* 55: 60-65.

Webb K, Kutty JK (2009). Tissue engineering therapies for the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng B* 15: 249-262.

Weissman IL, Anderson DJ, and Gage F (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 387-403.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972). Survival of Mouse embryos frozen to -196 C and -269 C. *Science* 178: 411-414.

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48: 146-156.

Xiong X, Jia J, He S, Zhao Y (2010). Cryopreserved lip mucosa tissue derived keratinocytes can fabricate tissue engineered palatal mucosa equivalent. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 94(1):165-170.

Yatabe M (1991). Study on measurement of dynamic viscoelasticity of maxillary mucosa. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 58(1):74-94.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2(6): 477-488.