



**CARACTERIZACIÓN DE TEJIDO GINGIVAL SANO Y CON ENFERMEDAD  
PERIODONTAL. ESTUDIO IN VITRO**

**JUAN SEBASTIÁN GOMEZ SOLÓRZANO**

Residente de Periodoncia

**CARLOS HUMBERTO VALENCIA**

Director

**JORGE ENRIQUE SOTO**

Co-Director

**SANDRA AMAYA SÁNCHEZ**

Asesora metodológica

**Agosto 12 de 2018**

**Santiago de Cali**

**CARACTERIZACIÓN DE TEJIDO GINGIVAL EN PACIENTES SANOS Y CON  
ENFERMEDAD PERIODONTAL. ESTUDIO IN VITRO**

**Alumno:**

JUAN SEBASTIÁN GOMEZ SOLÓRZANO

**Trabajo de Grado para Optar por el Título de:**  
ESPECIALISTA EN PERIODONCIA

**Director**

Carlos Humberto Valencia Llanos

Od, Implantólogo oral

PhD Ciencias Biomédicas

**Co-Director**

Jorge Soto

Od Periodoncista

**Asesora Metodológica**

Sandra Amaya Sánchez

Odontóloga, Periodoncista

MSc. Ciencias Odontológicas

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA  
FACULTAD DE SALUD  
POSGRADO DE PERIODONCIA**

**Santiago de Cali, Julio 2019**

## HOJA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

---

**Director del Jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

## **DEDICATORIA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por todo el apoyo brindado.

A mis docentes, que sin su guía y ayuda no hubiera sido posible.

## **CONTENIDO**

|  |    |
|--|----|
| ABREVIACIONES  | 6  |
| RESUMEN  | 7  |
| INTRODUCCIÓN   | 8  |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA   | 9  |
| JUSTIFICACIÓN  | 9  |
| MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE  | 11 |
| Fibroblasto gingival .....   | 11 |
| Biomateriales sintéticos .....   | 14 |
| Quitosano .....  | 14 |
| Ácido Poliláctico .....  | 15 |
| Membranas de colágeno.....   | 17 |
| Matriz dérmica acelular .....  | 19 |
| OBJETIVOS  | 24 |
| Objetivo principal .....   | 24 |
| Objetivos específicos .....  | 24 |
| METODOS Y MATERIALES   | 24 |
| Diseño del estudio.....  | 24 |
| Criterios de inclusión .....   | 25 |
| Procesamiento de la muestra .....  | 27 |
| Obtención de las imágenes.....   | 28 |
| Análisis de imágenes .....   | 28 |
| Recolección de la Información .....  | 28 |
| Procesamiento de la información.....                                       | 29 |
| CONSIDERACIONES ÉTICAS   | 29 |
| RESULTADOS   | 30 |
| Muestra de paciente sano.....  | 30 |
| Muestra de paciente con enfermedad periodontal activa .....                | 31 |
| Muestra de paciente estable con antecedente de enfermedad periodontal..... | 33 |
| DISCUSIÓN  | 34 |
| CONCLUSIÓN   | 37 |
| RECOMENDACIONES  | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA   | 39 |
| ANEXOS   | 45 |

## **ABREVIACIONES**

**PLA:** Ácido poliláctico

**PGA:** Ácido poliglicólico

**BG:** Biovidrios

**CS:** Quitosano

**PMNs:** Polimorfonucleares

**CaP:** Fosfato cálcico

**ePTFE:** Politetrafluoroetileno expandido

## RESUMEN

**Introducción:** Tradicionalmente en la odontología se han aplicado membranas de origen natural o sintético en los tratamientos periodontales, el tejido gingival está conformado por una red de fibras, células y vasos sanguíneos en una distribución multicapa. **Objetivo.** Caracterizar el tejido gingival sano, con estabilidad periodontal y con enfermedad periodontal activa. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio experimental, in vitro en el laboratorio de histología de la Escuela de Ciencias Básicas de la Universidad del Valle. Se tomó muestras de tejido gingival de 1 paciente sano, 1 paciente con estabilidad periodontal después de tratamiento periodontal y 1 paciente con enfermedad periodontal. Se realizó análisis histológico para identificar la arquitectura tisular y la posibilidad de replicar está en el diseño de andamios para ingeniería de tejidos periodontales. **Resultados.** se observó que en general los tejidos provenientes de pacientes sanos y enfermos conservan la misma arquitectura, diferenciándose únicamente en los contenidos de infiltrado inflamatorio. **Conclusión:** En tejido gingival sano, se encuentran células inflamatorias (linfocitos y polimorfonucleares) sin desencadenar una respuesta inflamatoria. En tejido estable con antecedente de enfermedad periodontal se observan células inflamatorias, similares al tejido gingival sano, lo que indica compatibilidad con salud clínica.

## **INTRODUCCIÓN**

Las diferentes aplicaciones de la Ingeniería de tejidos han llevado al desarrollo del concepto de matrices extracelulares sintéticas, estas son estructuras poliméricas de origen natural o sintético donde un grupo de células ha depositado su matriz extracelular, en condiciones de laboratorio.

El grupo biomateriales dentales de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle ha incursionado en la obtención de matrices sintéticas para diferentes aplicaciones de Ingeniería de tejidos(1–6), en este trabajo se quiso realizar una aproximación a la ingeniería de tejidos periodontales para lo cual se buscó caracterizar histológicamente el tejido gingival sano y afectado para en un futuro desarrollar andamios que al ser cultivados con fibroblastos gingivales pudieran actuar como matrices celulares sintéticas y ayudar en los tratamientos regenerativos a nivel de tejidos blandos periodontales.

Inicialmente se realizó una búsqueda de tópicos relacionados con la regeneración periodontal, luego se captó el tejido blando de tres pacientes uno sano, uno que presentó enfermedad periodontal, pero estaba estable al momento de la cirugía y un tercero con enfermedad periodontal.

Las muestras de tejido fueron analizadas mediante técnicas histológicas encontrando que todas poseían la misma estructura de malla colágena que soporta células y vasos sanguíneos, en una distribución multicapa.

Para la realización de este trabajo se contó con el aval del Comité de Revisión de ética en humanos de la Universidad del Valle.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las técnicas descritas en la actualidad se basan en el uso de biomateriales para la regeneración tisular o regeneración ósea. Numerosos biomateriales se han descrito con efectos favorables en la ganancia de tejido óseo. Sin embargo, actualmente se encuentran pocos reportes en la literatura acerca de la regeneración de fibroblastos gingivales mediante el uso de matrices o andamios (scaffolds) que permitan su crecimiento y diferenciación de manera más rápida.

De igual manera, es necesario la caracterización del tejido a regenerar, con el fin de evitar el crecimiento de poblaciones celulares diferentes a las deseadas. Esto puede deberse a las condiciones del tejido en condiciones de salud o enfermedad.

## **JUSTIFICACIÓN**

El uso de matrices o andamios (scaffolds) es bastante amplio en la preservación de rebordes alveolares y en regeneración ósea guiada, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, aún no están claros los beneficios del uso de estos andamios en la regeneración de tejido gingival. Con el paso de los años, se ha implementado el concepto de regeneración tisular y regeneración ósea; esto con el fin de reparar y resarcir las secuelas que ocasionan el progreso de la enfermedad periodontal, aunque no se limita únicamente a este factor etiológico(7). La regeneración ósea también es usada en casos de trauma, donde pacientes han perdido dientes y como consecuencia de la pérdida dental, resorción ósea como proceso fisiológico.

En las últimas décadas, las investigaciones realizadas se han enfocado principalmente en cómo recuperar el tejido óseo, introduciendo el término de

regeneración tisular guiada, la cual consiste en utilizar una membrana que actúa como barrera para impedir la migración de células diferentes a las que se quiere regenerar(8).

Posteriormente, se han desarrollado diversos materiales para conseguir el mismo objetivo, pero con mayores ventajas que los materiales convencionales. Entre los materiales que se han desarrollado se encuentran el ácido poliláctico (PLA) y el quitosano (CS); los cuales han demostrado gran eficacia en la regeneración ósea, por sus propiedades biológicas como adhesión celular, proliferación, diferenciación, apoptosis(9), fuerza mecánica, propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, biocompatibilidad, y nula toxicidad (10)(11).

Esta investigación pretende encontrar alternativas a la terapia de regeneración tisular, dado que se ha descrito la utilidad de estos materiales en la regeneración tisular cuando se aplica con fibroblastos(9). Las potenciales ventajas de esta investigación aplicadas al área clínica son: menor tiempo en el tratamiento, comodidad para el paciente al tener una sola área quirúrgica, disminución de costos para el paciente.

## **MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

### **Fibroblasto gingival**

El fibroblasto es la célula principal del tejido conectivo, abarca alrededor del 65% del total de la población celular. Está relacionado con la producción de varios tipos de fibras que se encuentran en el tejido conectivo; y además es fundamental en la producción de la matriz del tejido conectivo. En microscopía electrónica, el fibroblasto tiene una forma de huso, o de célula estrellada con un núcleo ovalado. En su núcleo se puede observar uno o más nucléolos. Adicionalmente, tiene un retículo endoplásmico rugoso bien definido, un aparato de Golgi de tamaño considerable y numerosas mitocondrias de gran tamaño. De igual manera, adyacente a la membrana celular, se pueden encontrar numerosas vesículas alrededor de toda la periferia(12).

El fibroblasto, a pesar de ser la célula principal del tejido conectivo, presenta diferencias morfológicas dependiendo del tejido en donde se encuentre. Se ha descrito que el fibroblasto del ligamento periodontal tiene diferencias fenotípicas en comparación con el fibroblasto gingival. Se han identificado 4 subtipos de fibroblastos gingivales. Una subpoblación presentaba numerosos pseudópodos que le conferían la capacidad de migración a los fibroblastos de ligamento periodontal(13). Adicionalmente, se han identificado ramificaciones en bandas de microfilamentos de tipo contráctil y alto contenido de glucógeno en estas células.

En los fibroblastos gingivales, se han encontrado tres morfotipos distintos en fibroblastos clonados de tejido sano e inflamado; los cuales se caracterizan por tener una forma de espiral, estrellada y especializada en tejido sano, mientras que

en tejido inflamado se encontró que solo había células estrelladas y elongadas (13). Igualmente, se ha descrito que el 35% de la población de fibroblastos gingivales no es capaz de realizar captación de ciclosporina A, lo que sugiere y refuerza la existencia de una población que responde ante el estímulo de ciclosporina A y una población que no.

Borden y Page describen 2 sub poblaciones de fibroblastos gingivales a partir de la expresión de receptor C1q en la membrana celular de los fibroblastos, usando anticuerpos anti-C1q. Ellos describieron las dos subpoblaciones tomando en cuenta que una expresó un receptor C1q con capacidad de adhesión a un dominio globular C1q, y la otra expresó un receptor de baja afinidad con potencial de unión a C1q mediante su dominio colágeno(13).

A través de los años, el objetivo de reparar los daños tisulares ocasionados por varios factores ha sido tema de investigación por varios autores. La implementación de andamios (scaffolds) sintéticos para la reparación de dichos daños ha ido en aumento junto con la investigación de dichos materiales(7). A comienzos de la década de los 90, se empezó a hablar de la regeneración tisular; específicamente Buser y cols. (1993) introdujeron el término “regeneración tisular guiada”, describiendo el aumento de tejido óseo soportado por una membrana que actúa como barrera(8). Para que el andamio pueda ser utilizado, este debe cumplir una serie de requisitos como: debe ser compatible con las células(7), el material debe mimetizar las condiciones fisiológicas para la migración, proliferación y diferenciación celular(14).

Los fibroblastos gingivales poseen características muy similares a los fibroblastos del ligamento periodontal: ambos tienen una forma alargada y estrellada, observados al microscopio óptico. No obstante, los fibroblastos del ligamento periodontal poseen lagunas de glucógeno en su citoplasma que albergan múltiples bandas de microfilamentos de tipo contráctil, los cuales no se encuentran en los fibroblastos gingivales. En estudios in vitro, se ha demostrado que el fibroblasto gingival tiene una tasa de proliferación más rápida en comparación con el fibroblasto del ligamento periodontal(13).

En cuanto a la composición de su matriz extracelular, las poblaciones de fibroblastos de ligamento periodontal presentan mayor homología en la producción de colágeno y fibronectina. Se ha descrito que los fibroblastos gingivales poseen una expresión débil de colágeno tipo I y III en comparación con los fibroblastos del ligamento periodontal, el cual tiene una capacidad de síntesis de 1.5 a 2 veces mayor que la del fibroblasto gingival. Giannopolou describió la capacidad de adhesión de ambos tipos celulares, donde encontró que los fibroblastos gingivales se adhieren mejor al colágeno tipo I y IV que los fibroblastos del ligamento periodontal(13).

Esto refuerza lo reportado por Soto y cols, quienes en el 2000 tenían la hipótesis de que en el tejido gingival se encontraban varias poblaciones de fibroblastos con fenotipos diferentes(15)

El papel de la matriz, es proveer un espacio tridimensional para el crecimiento y la adhesión celular. Después de un tiempo la matriz debe degradarse / reabsorberse dejando en su lugar el tejido neo formado, y ningún material extraño.

En ingeniería tisular, una de las funciones cruciales de las matrices 3D es proveer un templado temporal con características biomecánicas de la matriz extracelular nativa hasta que el tejido regenerado madure. Adicionalmente, la matriz debe actuar como un estimulador biológico que regule la adhesión celular, crecimiento, migración, diferenciación, organización tisular y remodelado de la matriz(16).

## **Biomateriales sintéticos**

### **Quitosano**

El quitosano (CS) es un amino polisacárido (poli-1 4D glucosamina) derivado de la quitina por de-acetilación. Al no ser tóxico, por el contrario, con propiedades biocompatibles, es ampliamente usado en el campo de la medicina como apósito para heridas y como sistema de entrega de medicamentos. Adicionalmente, tiene grupos amino e hidroxilo reactivos que se pueden modificar de una manera sencilla y cuya modificación puede promover el crecimiento y proliferación celular(17).

Al ser un biopolímero hidrofílico, se ha recomendado el uso del quitosano como un adecuado material de andamio para la regeneración tisular, debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, no antigenicidad y propiedades de absorción. Numerosas investigaciones se han concentrado en el uso del quitosano en términos de adhesión celular, proliferación, diferenciación y apoptosis como un sustrato para el cultivo de células y dispositivo de transporte de medicamentos. Así mismo, se ha encontrado que el andamio a base de quitosano es útil en el mantenimiento de la regeneración tisular cuando se aplica con fibroblastos(9).

## **Ácido Poliláctico**

En un estudio, se desarrolló un novedoso polímero híbrido de ácido hialurónico basado en quitosano como material de matriz para ingeniería de ligamento-tendón. El estudio demostró que la fibra híbrida dio excelentes resultados en cuanto a soporte para adhesión celular y producción de colágeno tipo I de los fibroblastos cultivados(16).

Se ha descrito el uso de ácido poliláctico (PLA) como soporte para la regeneración ósea. La matriz a base de ácido poliláctico puro se puede usar; así como el uso de ácido poliláctico cubierto y materiales compuestos a base de PLA también se ha descrito. La FDA ha aprobado el uso de PLA para varias aplicaciones, y se han demostrado adecuadas propiedades osteoinductivas y osteoconductoras, en usos netamente en tejido óseo. También se ha demostrado que varios tipos de células de humanos y animales tienen la habilidad de unirse a las matrices a base de ácido poliláctico(10).

Los polímeros sintéticos basados en ácido láctico (polilácticos) son los más estudiados y es permitido su uso clínico. Las matrices de ácido poliláctico se caracterizan por su extremadamente alta fuerza mecánica y biocompatibilidad, además de ser bio reabsorbible y no ser tóxico(11).

El ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA) son polímeros sintéticos con excelentes características que son dependientes de la habilidad de controlar su síntesis la cual influencia las características finales. Son degradados en el cuerpo por procesos químicos y por procesos no mediados por células. Se degradan en sus respectivos monómeros (ácido láctico y ácido glicólico, respectivamente), y son

eliminados a través de diferentes vías metabólicas. La rápida degradación es una desventaja, pues pueden fracasar el injerto. Adicionalmente, la degradación de cualquier ácido puede inducir a una respuesta inflamatoria. Para reducir la inflamación, se han creado matrices híbridas, combinando el ácido poliláctico y ácido poliglicólico con biovidrios (BG) y fosfato cálcico (CaP). Estos polímeros al ser combinados traen consigo una serie de desventajas, como disminución en la fuerza mecánica, dificultades en la producción, y reacciones no específicas con las células. El ácido poliglicólico se degrada más rápido que el ácido poliláctico, sin embargo, ambos se degradan demasiado rápido para la regeneración ósea. Por esta razón, nunca se usan individualmente, sino que se usa una forma combinada de ambos: ácido polilactico-poliglicólico (18)(19)

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero semicristalino con buena fuerza mecánica, plasticidad térmica, procesabilidad y un alto módulo de Young. Es un poliéster relativamente hidrofóbico inestable en condiciones de humedad y puede someterse a una disrupción en la cadena en el cuerpo humano y degradarse en ácido láctico, dióxido de carbono y agua, supproductos que no son tóxicos que son eliminados a través del ciclo de Krebs y la orina. Las nanofibras de PLA se han usado ampliamente en varias aplicaciones biomédicas incluyendo transporte de medicamentos e ingeniería de matrices o andamios para piel y fracturas óseas internas. El PLA también se ha usado para ingeniería vascular en forma de vaso mediante la realización un proceso de separación de fases inducida por difusión (DIPS), luego sembrando la matriz con células endoteliales, la cual mostró capacidad de adhesión y proliferación celular(20).



La ingeniería de tejidos se apoya en los desarrollos de las ciencias naturales y de las ingenierías, para crear estructuras que de alguna forma simulan la matriz extracelular y permiten a las células realizar una primera interacción (guiada) sobre estos dispositivos artificiales.

La ingeniería de tejidos da la posibilidad de utilizar materiales para conformar estructuras tridimensionales, con una macro estructura y microestructura parecidas a la del tejido biológico, y con la posibilidad de obtener crecimiento celular y tisular en ellos a expensas de unas células y/o algunas sustancias biológicas que han sido previamente incorporadas

### **Membranas de colágeno**

Un estudio realizado por Kasaj y col(21). Donde se estudió diferentes tipos de membranas de colágeno reabsorbibles y de ePTFE de diferentes casas comerciales. En el estudio, los investigadores recolectaron células del ligamento periodontal proveniente de terceros molares extraídos con fines ortodóncicos. Se extrajeron fibroblastos gingivales del tejido gingival que estuviera suelto y libre de epitelio. Dividieron los tipos de membranas en reabsorbibles y no reabsorbibles, y a cada grupo se le asignaron 3 marcas de membranas, en las que se cultivaron las células. Las casas comerciales que usaron fueron: ACE (AC) (PTFE no texturizado, ACE Surgical Supply Co., Brockton, USA); Cytoplast Regentex GBR-200 (CT) (PTFE de alta densidad) Oraltronic® Dental Implant Technology GmbH, Bremen Germany; Tef-Gen-FD (TG) (PTFE nanoporoso) Lifecore Biomedical GmbH, Alfter, Germany; Resodont (RD) (Colágeno tipo I equino) Resorba®, Nurnberg, Germany; BioGuide (BG) (colágeno tipo I y III de origen porcino) Geistlich Biomaterials,

Wolhusen, Switzerland; TutoDent (TD) (colágeno tipo I de origen bovino) Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen, Germany. El grupo control fueron células en cajas de Petri.

Dentro de los resultados se encontró que de las 6 membranas que se usaron en el estudio, TD y RD demostraron la más alta tasa de proliferación de fibroblastos gingivales humanos en 1 hora y a las 48 horas, en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$ ). Las membranas BG, CT, TG, y AC presentaron menor número de células en todos los puntos de tiempo.

El uso de estos biomateriales no sólo se ha enfocado en tratar las secuelas de la enfermedad periodontal, sino que también han sido empleados para corregir alteraciones estéticas de los tejidos blandos (recesiones gingivales). Köseoglu y col(22) Realizaron un estudio en el que compararon la eficacia de una membrana de colágeno sembrada con fibroblastos gingivales autólogos (CM+GF) y membrana de colágeno con colgajo posicionado coronal (CM+CAF), en el cubrimiento de recesiones gingivales. En los resultados de este estudio, los autores encontraron que hubo una disminución significativa de la profundidad de la recesión y en los niveles de inserción clínica en ambos grupos. Sin embargo, en la comparación intergrupo, no hay diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, el porcentaje de cubrimiento fue mayor y más estable durante el tiempo en el grupo test. Los autores concluyen que el uso combinado de una membrana de colágeno con fibroblastos gingivales, puede ser una alternativa de tratamiento, sin involucrar un segundo sitio quirúrgico.

## **Matriz dérmica acelular**

La matriz dérmica acelular surgió como solución al autoinjerto de piel para el tratamiento de quemaduras de tercer grado, o de segundo grado profundas. La dermis está compuesta principalmente por proteínas de la matriz extracelular y colágeno, lo que va a contribuir en la durabilidad, elasticidad y estética de la piel (23).

En odontología, se ha ampliado el uso de la matriz dérmica acelular, principalmente para cirugías de cubrimiento radicular. Estos procedimientos generalmente requieren del uso de tejido conectivo, el cual es extraído del paladar o de zonas edéntulas. Sin embargo, la obtención del injerto requiere un segundo sitio quirúrgico, que deriva no solo en mayor incomodidad para el paciente, sino en complicaciones adicionales postquirúrgicas, como hemorragia del sitio donante, necrosis de la tapa de epitelio que queda después de tomar el injerto, entre otras.

Harris y cols(24) en su estudio compararon el uso de una matriz dérmica acelular versus tejido conectivo, en el cual no encontraron diferencias significativas entre ambos materiales para el cubrimiento radicular. Adicionalmente, se evidenció la disminución de la profundidad al sondaje, aumento de la encía queratinizada. 3 meses posterior al cubrimiento radicular, realizaron una biopsia del área injertada y encontraron una completa incorporación de la matriz dérmica al tejido nativo.

Jhaveri y cols(25) realizaron un estudio en el cual se cultivó una matriz dérmica acelular con fibroblastos gingivales autólogos para el cubrimiento radicular. Brevemente, los investigadores utilizaron diez pacientes con recesiones gingivales clase I y II de Miller en el maxilar superior, que fueran mayores o igual a 2 mm,

bilaterales. Después de realizar una exhaustiva historia clínica, y diligenciamiento de consentimiento informado, se tomó una biopsia de un sitio diferente al donante, que incluyera tejido conectivo y epitelio. La biopsia se tomó de encía adherida. Inmediatamente se llevó a un medio de cultivo con suero fetal bovino al 10% (FBS), antibióticos (penicilina/estreptomicina) en un tubo estéril. El sitio de la biopsia no requirió puntos de sutura, se realizó hemostasia con gasa a presión. La muestra de tejido se lavó con PBS y se colocó en un frasco con preparación enzimática que consistió en 0.2% de dispasa, y 0.1% colagenasa tipo I. Se colocó en una incubadora agitadora y el sobrenadante con contenido celular se transfirió a un frasco con FBS al 10% e incubado a 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizó cambio de medio cada dos semanas. Se observaron los fibroblastos en un microscopio de contraste de fase y las células se subcultivaron a una confluencia de 80-85% por tripsinización. Posteriormente, rehidrataron la matriz dérmica acelular de 10x10 mm según las indicaciones del fabricante, y la cultivaron con los fibroblastos a una densidad de 4.0 a 8.0 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Se observaron las células con microscopía de contraste de fase y se confirmó la presencia de fibroblastos con microscopía electrónica de barrido. Adicionalmente, se hicieron pruebas con marcadores de superficie. En el procedimiento quirúrgico, se realizaron los dos cubrimientos en la misma cita, y utilizaron la técnica descrita por Langer y Langer, realizando incisiones relajantes. El injerto cultivado con células se colocó en el sitio receptor y se estabilizó con sutura reabsorbible 5-0 al tejido gingival adyacente. El colgajo se desplazó coronal y se suturó con sutura no reabsorbible 5-0. En el sitio control se realizó exactamente la misma técnica, sólo que se extrajo un injerto de tejido conectivo del paladar. Las variables de medición fueron índice de placa,

profundidad al sondaje (PD), profundidad de la recesión, nivel de inserción clínica (CAL), cantidad de encía queratinizada (KT) y grosor de encía adherida (AG). Los resultados se registraron en el baseline, 3 meses y 6 meses. Los autores encontraron que hubo menor inflamación en el grupo test que en el grupo control a la semana ( $p=0.002$ ), 2 semanas ( $p=0.009$ ) y 3 semanas ( $p=0.027$ ). Adicionalmente, encontraron que hubo una reducción significativa de la profundidad de la recesión, incremento de la banda encía queratinizada, el nivel de inserción clínica, y la encía adherida. Sin embargo, en la comparación intergrupo no hubo diferencias significativas. El porcentaje de cubrimiento radicular promedio para ambos grupos al final de los 6 meses fue de 83.33%. Los autores concluyen que el nuevo tratamiento haciendo uso de la ingeniería tisular tiene resultados prometedores en el tratamiento de las recesiones gingivales clase I y II de Miller. Debido a que la matriz dérmica acelular es de igual modo avascular, el cultivo de la matriz dérmica con fibroblastos gingivales puede resultar en una revascularización temprana, disminuyendo así el tiempo de cicatrización, inflamación, menor contracción de la matriz y mejor cicatrización de la herida.

Un estudio realizado por Maia y cols(26) tuvo como objetivo si la matriz dérmica acelular puede funcionar como un andamio en 3D para el crecimiento interno de fibroblastos gingivales y células cancerígenas. Así mismo, quisieron verificar si el medio de cultivo afecta el comportamiento celular. De manera muy breve, los autores tomaron fibroblastos gingivales de perros del maxilar superior. La muestra se tomó de sitios donde la encía queratinizada estuviera sana, fibroblastos gingivales de humanos sanos que requirieran cirugía periodontal donde estuviera

indicado la remoción de tejido gingival, y las células cancerígenas fueron tomadas de manera comercial y cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con suero bovino fetal al 10% (FBS), y 100 u/mL de penicilina/estreptomicina. Los autores evaluaron la morfología celular y distribución en la matriz dérmica acelular a las 12 horas, 7 días y 14 días; viabilidad celular y viabilidad celular en un medio de cultivo condicionado en una matriz dérmica acelular. En los resultados, los autores establecen que en los ensayos morfológicos los fibroblastos gingivales humanos y caninos eran adherentes y con forma poligonal con núcleo redondo a las 12 horas. A los 7 y 14 días las células estaban dispersas, elongadas con núcleo oval. Los ensayos de epifluorescencia se observó que las células eran adherentes en la superficie de la matriz dérmica acelular en baja densidad para los tres tipos celulares. Los fibroblastos gingivales caninos se distribuyeron de manera desigual en la superficie de la matriz dérmica acelular formando una capa celular discontinua. Los fibroblastos gingivales humanos formaron una capa simple uniforme en la superficie de la matriz dérmica. Las células cancerígenas de la línea de melanoma murino se organizaron en agregados celulares sobre la superficie de la matriz dérmica a los 7 días. A los 14 días hubo una monocapa confluyente de células, sin embargo, aún se encontraban agregados celulares. Hubo algunas células dentro de la matriz dérmica, cerca de la superficie y en áreas de poca densidad de fibras colágenas. En cuanto a número de células, se observó que el número de fibroblastos gingivales humanos fue mayor a los 14 días en comparación a los 7 días ( $P < 0.05$ ). Las células cancerígenas tuvieron un incremento en número desde las 12 horas hasta los 7 días ( $P < 0.05$ ), sin diferencias estadísticamente significativas entre los 7 días y los 14 días. Las células que tuvieron menor incremento en número fueron los fibroblastos

gingivales caninos. A los 14 días, las células cancerígenas y los fibroblastos gingivales humanos tenían mayor número de células en comparación con los fibroblastos gingivales caninos ( $P < 0.05$ ). Se observó también que hubo mayor viabilidad celular en las muestras cultivadas con fibroblastos gingivales humanos comparado con las muestras de fibroblastos gingivales caninos a los 7 y 14 días ( $P < 0.024$ ). Los autores concluyen que la matriz dérmica acelular no funciona como un andamio 3D para el crecimiento interno de los fibroblastos. Los fibroblastos gingivales humanos, y células altamente proliferativas como las de la línea de mieloma murino sólo pueden ubicarse superficialmente en la matriz dérmica acelular.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Caracterizar el tejido gingival sano, con estabilidad periodontal y con enfermedad periodontal activa

### **Objetivos específicos**

- Determinar las características del epitelio gingival sano, estable periodontalmente y enfermo mediante cortes histológicos con tinción de hematoxilina-eosina.
- Describir las características del epitelio, del tejido conectivo subepitelial del tejido gingival sano, estable periodontalmente, y enfermo por medio del análisis de cortes histológicos con tinción de hematoxilina-eosina.

## **METODOS Y MATERIALES**

### **Diseño del estudio**

Se realizó un estudio experimental, in vitro, para caracterizar histológicamente el tejido gingival de 3 pacientes con las siguientes características clínicas: un paciente sano periodontalmente, un paciente con periodontitis activa y un paciente estable periodontalmente con antecedente de enfermedad periodontal y tratamiento previo.

Se realizó el análisis histológico utilizando técnica de tinción de hematoxilina-eosina para identificar presencia de células inflamatorias, características de fibroblastos y otros hallazgos y por medio de microscopio Leica DM 750 con una cámara Leica



DFC 295 y el software de imágenes Application Suite versión 4.12.0 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) se determinaron las características celulares.

### **Criterios de inclusión**

Para la toma de muestra clínica del tejido gingival se tuvo en cuenta:

- Tejido sano: Ausencia de sangrado al sondaje, profundidad al sondaje entre 0 y 3 mm.
- Tejido con enfermedad periodontal activa: Presencia de sangrado al sondaje, profundidad de bolsa mayor a 6 mm indicado para raspaje y alisado radicular a campo abierto con técnica de colgajo de Widman modificado.
- Tejido estable con antecedente de enfermedad periodontal: Sin signos de inflamación clínica (sangrado al sondaje), con indicación de cuña mesial/distal.

### **Criterios de exclusión**

- Cortes histológicos no adecuados para el análisis.
- Pacientes con enfermedad sistémica y/ tratamiento con Aines. Corticoides y antibioticos

### **Obtención de la muestra**

La muestra clínica se obtuvo de pacientes con indicación para cirugía periodontal y la cirugía se realizó en la clínica del posgrado de Periodoncia de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle; con previa autorización en el consentimiento informado por el paciente, y con historia clínica sustentada y

aprobada por el docente especialista en Periodoncia. Se obtuvieron muestras de 3 tipos de pacientes:

**Muestra 1:** Tejido sano

En el paciente sano, la indicación quirúrgica fue alargamiento coronal pre protésico de canino superior izquierdo (23).

**Muestra 2:** Tejido con enfermedad periodontal activa.

Para el paciente con enfermedad periodontal activa, la indicación fue raspaje y alisado radicular a campo abierto a colgajo con técnica de Widman modificado del segundo molar inferior izquierdo (37).

**Muestra 3:** Tejido estable periodontalmente con antecedentes de enfermedad periodontal.

Para el tejido estable con antecedente de enfermedad periodontal, la indicación fue cuña mesial o distal del segundo molar inferior derecho con previo raspaje y alisado a campo cerrado (47).

Para la recolección de la muestra, en el acto quirúrgico se usó anestésico local (lidocaína al 2% + epinefrina 1:80.000) y técnica infiltrativa. Para los pacientes de alargamiento coronal y Widman modificado, se realizó una incisión a bisel interno con hoja de bisturí N° 15c en el diente a intervenir, posteriormente una incisión intrasurcular. En el caso de la cirugía de cuña mesial/distal, se realizó una incisión en cuña con forma de “V” y se retiró el tejido gingival. El tejido extraído de los pacientes se llevó a un vial con formol al 10%, rotulado con el grupo de estudio: paciente sano, estable con antecedentes de enfermedad periodontal, enfermedad

periodontal activa. Una vez tomada la muestra, se envió al laboratorio de histología de la Escuela de Ciencias Básicas de la Universidad del Valle.

### **Procesamiento de la muestra**

Una vez obtenidas las muestras, se fijaron en formol bufferado por tres días y se procesaron para análisis histológico de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Deshidratación en soluciones de alcohol de concentración ascendente (70%, 80%, 95% y 100%), Diafanizado con Xilol e Infiltrado con parafina utilizando una procesadora de tejidos Leica™ (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania)
2. Inclusión de la muestra en bloques de parafina colocándolas de forma perpendicular al portaobjetos con una angulación de 15°, utilizando el equipo Thermo Scientific™ Histoplast Paraffin™
3. Realización de cortes a 4 µm utilizando un micrótopo Autotechnicon Tissue Processor™ (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).
4. Tinción para análisis histológicos por hematoxilina y eosina y técnicas de tricrómica de Masson, mediante protocolos estandarizados para esta técnica, disponibles en el laboratorio de Ingeniería de tejidos de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle
5. Análisis de las imágenes para estudiar la arquitectura tisular mediante un microscopio Leica DM 750 con una cámara Leica DFC 295 y el software de imágenes Application Suite versión 4.12.0 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

## **Obtención de las imágenes**

Después de obtenidas las placas con las muestras, se llevaron al microscopio óptico y se tomaron fotografías con diferentes aumentos: 4x, 10x, 40x, 100x. A partir de 10x, se obtuvieron imágenes de sitios tomados aleatoriamente.

## **Análisis de imágenes**

Una vez obtenidas las imágenes, se realizó la organización de éstas por tipo de muestra, nombre del archivo jpg, tipo de aumento de la imagen y las características del tejido observables en la imagen. El análisis se realizó por el investigador principal y el co director de la investigación.

Se observó:

- Queratinocitos (Presencia-características dentro del tejido)
- Fibroblastos (Presencia-Ausencia)
- Neutrófilos (Presencia-ausencia)
- Macrófagos (Presencia-ausencia)
- Fibras de colágeno (Presencia, organización)
- Tejido sano (Si/no)
- Tejido inflamatorio (Si/no)

## **Recolección de la Información**

Como instrumento de recolección, se usó un cuadro en Excel, donde se organizaron las imágenes, nombre del archivo, tipo de aumento y observaciones, como se observa a continuación

| <b>Muestra 1: Paciente sano</b>  |                    |         |               |
|--|--------------------|---------|---------------|
| Imagen   | Nombre del archivo | Aumento | Observaciones |
| <b>Muestra 2: Paciente con enfermedad periodontal activa</b>                 |                    |         |               |
| Imagen   | Nombre del archivo | Aumento | Observaciones |
| <b>Muestra 3: Paciente estable con antecedente de enfermedad periodontal</b> |                    |         |               |
| Imagen   | Nombre del archivo | Aumento | Observaciones |

**Tabla 1. Instrumento de recolección y análisis de datos.**

### **Procesamiento de la información**

Con la información obtenida en el instrumento de recolección, se realizó un cuadro en Excel con las variables dependientes e independientes para realizar el análisis de los resultados.

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

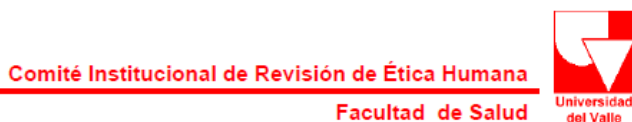
En esta investigación no se utilizaron sujetos experimentales humanos, sin embargo se usó tejido gingival proveniente de humanos, donado por pacientes odontológicos indicados para procedimientos de alargamiento coronal, raspaje y alisado radicular a campo abierto con técnica de Widman modificado y cuñas mesial/distal; de acuerdo a la literatura especializada el diente puede ser considerado como un órgano y en ese sentido de acuerdo 1805 del 4 de agosto del año 2016, en el artículo 2 que modifica al artículo 1 de la Ley 73 de 1988, para la utilización del tejido gingival fue necesario el uso de un consentimiento informado. Todos los pacientes aceptaron ingresar a la investigación. Se les realizó una explicación del objetivo de la misma, se les explicó que la investigación no representa un riesgo para la salud del paciente adicional al riesgo inherente al procedimiento quirúrgico al que fue sometido. No se realizó ningún tipo de incentivo material o en especie para participar

en el estudio. Esta investigación cuenta con el aval N° 014-019 del Comité de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle.

## RESULTADOS

### Muestra de tejido sano

Se obtuvieron en total 20 imágenes, 3 con aumento de 4x, 4 con aumento de 10x, 8 con aumento de 40x y 5 con aumento de 100x. En las imágenes obtenidas los



#### ACTA DE APROBACIÓN N° 004 - 019

Proyecto: "DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MATRIZ EXTRACELULAR SINTÉTICA PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO GINGIVAL. ESTUDIO IN VITRO"

Sometido por: JUAN SEBASTIAN GOMEZ SOLÓRZANO / CARLOS HUMBERTO VALENCIA / JORGE ENRIQUE SOTO

Código Interno: 014-019 Fecha en que fue sometido: 04 03 2019

hallazgos histológicos fueron:

- se observa un tejido epitelial plano estratificado no queratinizado, en el que se puede distinguir claramente los diferentes estratos del tejido: basal, espinoso, granuloso, córneo. Así mismo, se observan las invaginaciones del epitelio en el tejido conectivo. Se observa gran proporción de tejido conectivo subepitelial. (Imágenes 1-3)
- Al aumentar a 10x se observan invaginaciones del tejido epitelial más definidas, junto con el tejido conectivo en la porción reticular en donde se observan fibras de colágeno con orientación perpendicular al estrato basal del epitelio. En el tejido conectivo se observa abundante población de fibroblastos. Hay presencia de pocas células inflamatorias. (Imágenes 4-7)

- En las imágenes a 40x, se observa con mayor detalle tanto el tejido epitelial como el tejido conectivo. En el epitelio, se observa claramente la estratificación del tejido, donde en el estrato basal se observan abundantes células epiteliales cúbicas, y van proliferando hacia los estratos más externos del tejido. En el estrato granuloso se observan las células epiteliales aplanadas, con el núcleo pigmentado. Se observa una capa de queratina delgada, sin presencia de algún tipo celular. En el tejido conectivo se observa la forma alargada de los fibroblastos. Las fibras de colágeno se encuentran dispersas, y no se observa infiltrado inflamatorio. (Imágenes 8-15)
- A 100x se observa claramente las células del tejido tanto epitelial como conectivo. En el tejido epitelial se observa el queratinocito bien definido, dependiendo del estrato donde se encuentre. De igual manera, los fibroblastos se observan bien definidos, con forma alargada o en forma estrellada, con un núcleo bien pigmentado. Se observan fibras de colágeno compactadas en algunos sitios y en otros se observan más desordenadas. (Imágenes 16-20)

En esta muestra, las características histológicas observadas son compatibles con un estado de salud gingival, a pesar de que en algunos sitios hay presencia de células inflamatorias, clínicamente es compatible con salud. (añadir fotos y explicar)

### **Muestra de tejido con enfermedad periodontal activa**

Se obtuvieron 11 imágenes en total, 1 con aumento de 4x, 2 con aumento de 10x, 4 con aumento de 40x y 4 con aumento de 100x.

- Al análisis de las imágenes se puede observar el epitelio plano estratificado no queratinizado, junto con el tejido conectivo subepitelial. Se observa en el tejido

conectivo una disminución de los espacios intercelulares, y un abundante infiltrado inflamatorio a lo largo del tejido. Se observa una mayor basofilia en la lámina reticular, que corresponde a la mayor concentración de células inflamatorias. (Imagen 21)

- A 10x, se observa claramente el tejido conectivo infiltrado con células inflamatorias, principalmente neutrófilos. Se logra percibir algunos vasos sanguíneos en el tejido conectivo. Las células inflamatorias van adquiriendo una dirección hacia el tejido epitelial, concretamente hacia el estrato basal. De igual manera, se observa una disminución en el número de fibroblastos en el tejido conectivo. (Imágenes 22-23)
- A 40x se observa de forma más clara los diferentes tipos celulares dentro del tejido conectivo. Se logra percibir un gran número de neutrófilos principalmente, macrófagos, y una disminución de fibroblastos. Adicionalmente, se observan las fibras de colágeno de manera desorganizada. Los espacios intercelulares se encuentran disminuidos. (Imágenes 24-27)
- Al observar las imágenes a 100x se observa claramente el núcleo basófilo de los neutrófilos dentro del tejido conectivo y cómo han ido migrando hasta el epitelio. De igual forma, se observa en un corte histológico cómo el neutrófilo se encuentra en proceso de diapédesis, saliendo del vaso sanguíneo para incorporarse al tejido conectivo. Los fibroblastos se observan de forma alargada, con fibras de colágeno a su alrededor. (Imágenes 28-31)

En esta muestra, se encontró claros signos de infiltrado inflamatorio, compuesto por neutrófilos principalmente y con presencia de macrófagos.



### **Muestra de tejido estable con antecedente de enfermedad periodontal**

En este grupo se obtuvieron 17 imágenes en total, 5 con aumento de 4x, 3 con aumento de 10x, 2 con aumento de 40x y 7 con aumento de 100x.

- En el análisis de las imágenes se observa una gran cantidad de tejido epitelial plano estratificado no queratinizado, con poco tejido conectivo subepitelial. En el epitelio se observan claramente los diferentes estratos bien diferenciados. Hay escasas invaginaciones del epitelio en el tejido conectivo. No se observa infiltrado de células inflamatorias. (Imágenes 32-36)
- A 10x se observa de manera más clara el tejido conectivo con alta población de fibroblastos. No se observa infiltrado inflamatorio, aunque si se observan pocas células inflamatorias. (Imágenes 37-39)
- En las imágenes a 40x, se observa gran confluencia de células epiteliales en el estrato granuloso. En el tejido conectivo se observan las fibras de colágeno, junto con una gran población de fibroblastos cuyos núcleos se observan ovalados alargados y redondos. (Imágenes 40-41)
- A 100x se observan los núcleos celulares de los queratinocitos principalmente. Adicionalmente, hay presencia de algunas células claras dentro del tejido epitelial. En el tejido conectivo, se observan los fibroblastos alargados, y algunos con núcleo redondo. Hay presencia de fibras de colágeno en relación con los fibroblastos. Adicionalmente, se observan múltiples zonas de basofilia en el tejido conectivo, de menor tamaño en comparación con los fibroblastos y con las células epiteliales. (Imágenes 42-48)

Se observó en este tejido que las características celulares y de la matriz extracelular, presencia de infiltrado inflamatorio, son similares a las muestras del tejido sano.

|                       | <b>Muestra 1</b> | <b>Muestra 2</b> | <b>Muestra 3</b> |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Neutrófilos</b>    | Pocos            | Presentes        | Pocos            |
| <b>Queratinocitos</b> | Presentes        | Presentes        | Presentes        |
| <b>Fibroblastos</b>   | Abundantes       | Pocos            | Presentes        |
| <b>Macrófago</b>      | Pocos            | Presentes        | Pocos            |
| <b>Colágeno</b>       | Presente         | Presente         | Presente         |
| <b>Linfocitos</b>     | Pocos            | Abundantes       | Presentes        |

**Tabla 2. Comparación de poblaciones celulares y componente orgánico en las diferentes muestras**

## **DISCUSIÓN**

En la presente investigación, se encontró que en las muestras de tejido sano los fibroblastos estaban presentes en gran número, con núcleos ovalados alargados bien definidos, matriz extracelular abundante en colágeno que se observan dispersas en el tejido conectivo. En algunos cortes, no se observaron células asociadas a un proceso inflamatorio, pero en la mayoría de ellos se observó presencia de neutrófilos, células circulantes como primera línea ante un proceso inflamatorio. Se observan fibroblastos dispersos en el tejido conectivo (40x). Esto concuerda con los resultados de Page y Schroeder(27), Listgarten(28), Brex y Schlegel(29), Chapple(30), Lang(31). En un paciente clínicamente sano, sin presencia de sangrado, sin bolsas periodontales, aunque las características

histológicas corresponden a un estado de salud periodontal, hay presencia de células inflamatorias, confirmando la evidencia científica previa y actual.

En la actualización de la clasificación de enfermedad periodontal, se agrega como diagnóstico la salud periodontal, en donde se describe la estabilidad de los tejidos en ausencia de signos clínicos de inflamación. No obstante, histológicamente en los tejidos periodontales se encuentran células inflamatorias dentro de los tejidos sin que haya una respuesta inflamatoria. Los resultados de este estudio corroboran los descritos por Lang y cols(31).

En la muestra de tejido con enfermedad periodontal activa se encontró el tejido conectivo con infiltrado de células inflamatorias abundante, principalmente de linfocitos y macrófagos. Adicionalmente, se encontró una disminución en la cantidad de fibroblastos dentro del tejido conectivo. En algunos cortes histológicos se observan fibras de colágeno, mientras que, en otros cortes, más concretamente en la lámina basal, se observó una disminución de las fibras de colágeno. Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Mackler y cols(32), Seymour(33), y Seymour y cols(34). También se observó un aumento en los espacios intercelulares en el tejido epitelial, lo que favorece la migración de bacterias y otros patógenos hacia el tejido conectivo. Estos resultados concuerdan con los descritos por Page y Schroeder(27), donde se establecieron las diferentes fases del desarrollo de la gingivitis y periodontitis. En un paciente con signos clínicos de inflamación, bolsas periodontales presentes con sangrado al sondaje, e histológicamente el tejido presenta un infiltrado inflamatorio, con disminución de fibroblastos en el tejido

conectivo, aumento en el espacio intersticial de las células del epitelio, reafirma la evidencia previa y actual de la lesión periodontal establecida(35).

Los resultados obtenidos de la muestra del paciente estable con antecedentes de enfermedad periodontal, muestran que en el tejido conectivo no se encuentra infiltrado inflamatorio en comparación con la muestra del paciente con enfermedad periodontal activa. Sin embargo, si se observa algunas células inflamatorias, principalmente linfocitos. Estos resultados concuerdan con los descritos por Mahanonda y cols(36), quienes encontraron que, en pacientes sanos, hay células B de memoria en el tejido conectivo y representa una baja respuesta inflamatoria, aunque las células se encuentran activas, con capacidad de secretar anticuerpos IgA e IgG. En la muestra se observó también un aumento en el número de fibroblastos en comparación con la muestra del paciente con enfermedad periodontal activa, lo que indica un resultado positivo en cuanto a reparación y cicatrización. Estos resultados corroboran los obtenidos por Brex y cols(29), quienes observaron un aumento del 57.7% al 71% en 6 meses en pacientes sanos bajo un estricto régimen de control de placa bacteriana. Los autores infieren que los pacientes presentaron episodios de gingivitis antes de iniciar el estudio, lo que pudo haber contribuido al aumento de células inflamatorias, principalmente neutrófilos y linfocitos, y a la disminución de fibroblastos. En un paciente con antecedente sin signos clínicos de inflamación, ausencia de bolsas periodontales, con antecedentes de enfermedad periodontal, histológicamente presenta células B de memoria, PMNs circundantes y un aumento en el número de fibroblastos, hallazgos similares con los

de un paciente sano periodontalmente. Estos resultados confirman y apoyan la literatura contemporánea y la evidencia previa.

## **CONCLUSIÓN**

Este estudio muestra las características histológicas de un paciente sano, con enfermedad periodontal activa y un paciente estable con antecedente de enfermedad periodontal.

- En un paciente sano, sin signos clínicos de inflamación, histológicamente se encuentran células inflamatorias (PMNs, linfocitos) en el tejido conectivo, y es compatible con salud periodontal. El número de fibroblastos no se ve alterado en estado de salud periodontal.
- En un paciente con enfermedad periodontal activa, se observa un gran infiltrado inflamatorio, principalmente de linfocitos, junto con macrófagos y PMNs. La población de fibroblastos se ve disminuída en condiciones inflamatorias crónicas.
- En un paciente estable periodontalmente, con antecedentes de enfermedad periodontal, hay presencia de PMNs y de linfocitos; características histológicas similares a las del tejido sano. El número de fibroblastos aumenta, como signo de reparación en condiciones de salud clínica.

## **RECOMENDACIONES**

Para futuros estudios, se recomienda aumentar el número de la muestra, y realizar seguimiento a los pacientes involucrados en futuras investigaciones. Se sugiere la implementación de técnicas de inmunohistoquímica para determinar si hay otros tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio, y si están presentes en salud periodontal. También es recomendable, no separar las ciencias básicas de la clínica, pues es una forma valiosa de comprender aún mejor los procesos biológicos de reparación y de homeostasis en pacientes con enfermedad periodontal ya que hay un gran potencial investigativo en la clínica de periodoncia de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle, lo cual sería un gran aporte al campo de la investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Valencia Zapata ME, Mina Hernandez JH, Grande Tovar CD, Valencia Llano CH, Diaz Escobar JA, Vázquez-Lasa B, et al. Novel Bioactive and Antibacterial Acrylic Bone Cement Nanocomposites Modified with Graphene Oxide and Chitosan. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2938.
2. Ruiz S, Tamayo JA, Ospina JD, Porras DPN, Zapata MEV, Hernandez JHM, et al. Antimicrobial films based on nanocomposites of chitosan/poly(Vinyl alcohol)/graphene oxide for biomedical applications. *Biomolecules.* 2019;9(3).
3. Tamayo Marín JA, Londoño SR, Delgado J, Navia Porras DP, Valencia Zapata ME, Mina Hernandez JH, et al. Biocompatible and Antimicrobial Electrospun Membranes Based on Nanocomposites of Chitosan/Poly (Vinyl Alcohol)/Graphene Oxide. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2987.
4. Humberto Valencia C. Hydrolytic degradation and in vivo resorption of poly-L-lactic acid-chitosan biomedical devices in the parietal bones of Wistar rats. *J Int Med Res.* 2019;47(4):1705–16.
5. Valencia C, Valencia CH, Zuluaga F, Valencia ME, Mina JH, Grande-Tovar CD. Synthesis and application of scaffolds of chitosan-graphene oxide by the freeze-drying method for tissue regeneration. *Molecules.* 2018;23(10):2–6.
6. Tenorio DL, Valencia CH, Valencia C, Zuluaga F, Valencia ME, Mina JH, et al. Evaluation of the biocompatibility of cs-graphene oxide compounds in vivo. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7).
7. Chung TW, Wang SS, Wang YZ, Hsieh CH, Fu E. Enhancing growth and

- proliferation of human gingival fibroblasts on chitosan grafted poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films is influenced by nano-roughness chitosan surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(1):397–404.
8. Buser D. Localized Ridge Augmentation Using Guided Bone Regeneration. I. Surgical Procedure in the Maxilla Simultaneous approach of GBR Staged approach of GBR. *Ijprd*. 1993;13(1):29–47.
  9. Lotfi G, Shokrgozar MA, Mofid R, Abbas FM, Ghanavati F, Bagheban AA, et al. A clinical and histologic evaluation of gingival fibroblasts seeding on a chitosan-based scaffold and its effect on the width of keratinized gingiva in dogs. *J Periodontol* [Internet]. 2011;82(9):1367–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284548>
  10. Guduric V, Metz C, Siadous R, Bareille R, Levato R, Engel E, et al. Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2017;28(5):78. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-017-5887-6>
  11. Rodina A V., Tenchurin TK, Saprykin VP, Shepelev AD, Mamagulashvili VG, Grigor'ev TE, et al. Proliferative and Differentiation Potential of Multipotent Mesenchymal Stem Cells Cultured on Biocompatible Polymer Scaffolds with Various Physicochemical Characteristics. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2017;162(4):488–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-017-3646-9>
  12. Lindhe, J; Lang N. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 6th ed. Berglund, T; Giannobile, W; Sanz M, editor. Wiley Blackwell; 2015. 1429p.
  13. Acosta Gómez AP. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y



- heterogeneidad dentro del periodonto. *Univ Odontológica*. 2006;25:26–33.
14. Gassling V, Hedderich J, Açil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(3):320–8.
  15. Soto Franco JE, Parra Patiño B, Contreras Rengifo A. Cultivo y Caracterización In Vitro de una Línea Celular de Fibroblastos Gingivales Humanos. *Rev Estomatol / Univ del Val*. 2000;9(1):27–32.
  16. Sawaguchi N, Majima T, Funakoshi T, Shimode K, Harada K, Minami A, et al. Effect of cyclic three-dimensional strain on cell proliferation and collagen synthesis of fibroblast-seeded chitosan-hyaluronan hybrid polymer fiber. *J Orthop Sci*. 2010;15(4):569–77.
  17. Chiou SH, Wu WT, Huang YY, Chung TW. Effects of the characteristics of chitosan on controlling drug release of chitosan coated PLLA microspheres. *J Microencapsul*. 2001;18(5):613–25.
  18. Ceccarelli G, Presta R, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Lupi SM, Rodriguez y Baena R. Emerging Perspectives in Scaffold for Tissue Engineering in Oral Surgery. *Stem Cells Int* [Internet]. 2017;2017:1–11. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/4585401/>
  19. Zhang H, Mao X, Du Z, Jiang W, Han X, Zhao D, et al. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2016;17(1):136–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14686996.2016.1145532>

20. Marei NH, El-Sherbiny IM, Lotfy A, El-Badawy A, El-Badri N. Mesenchymal stem cells growth and proliferation enhancement using PLA vs PCL based nanofibrous scaffolds. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;93:9–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.053>
21. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med*. 2008;4(1):1–8.
22. Köseoğlu S, Duran İ, Sağlam M, Bozkurt SB, Kırtıloğlu OS, Hakkı SS. Efficacy of Collagen Membrane Seeded With Autologous Gingival Fibroblasts in Gingival Recession Treatment: A Randomized, Controlled Pilot Study. *J Periodontol* [Internet]. 2013;84(10):1416–24. Available from: <http://www.joonline.org/doi/10.1902/jop.2012.120529>
23. Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafó W, Heimbach D, et al. Clinical Evaluation of an Acellular Allograft Dermal Matrix in Full-Thickness Burns. Vol. 17, *Journal of Burn Care and Rehabilitation*. 1996. p. 124–36.
24. Harris R. A comparative study of root coverage obtained with an acellular dermal matrix versus a connective tissue graft: Results of 107 recession defects in 50 consecutively treated patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20:51-59.
25. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller PD. Acellular Dermal Matrix Seeded With Autologous Gingival Fibroblasts for the Treatment of Gingival Recession: A Proof-of-Concept Study. *J*

- Periodontol [Internet]. 2010;81(4):616–25. Available from:  
<http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2009.090530>
26. Maia LP, Novaes AB, Souza SLS, Grisi MFM, Taba M, Palioto DB. In Vitro Evaluation of Acellular Dermal Matrix as a Three-Dimensional Scaffold for Gingival Fibroblasts Seeding. J Periodontol [Internet]. 2011;82(2):293–301. Available from:  
<http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2010.100121>
  27. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest. 1976. 33: 235-249.
  28. Listgarten MA. Nature of periodontal diseases : Pathogenic mechanisms. J Periodontal Res. 1987;22:172–8.
  29. Brex MC, Schlegel K, Gehr P, Lang NP. Comparison between histological and clinical parameters during human experimental gingivitis. J Periodontal Res. 1987;22:50–7.
  30. Chapple ILC, Mealey BL, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol. 2018;45(Suppl 20):S68–S77.
  31. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. J Clin Periodontol. 2018;45(May 2017):S9–16.
  32. Mackler, B. F., Frostad, K. B., Robertson, P. B. and Levy, B. M. (1977), Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. Journal of Periodontal Research, 12: 37-45.

doi:[10.1111/j.1600-0765.1977.tb00107.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1977.tb00107.x)

33. G. J. Seymour HMD& JSG. Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease. Clin Exp Immunol. 1978;32(1):169–78.
34. Seymour, G. J. and Greenspan, J. S. (1979), The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. Journal of Periodontal Research, 14: 39-46. doi:[10.1111/j.1600-0765.1979.tb00216.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1979.tb00216.x)
35. Mehrotra N, Singh S. Periodontitis. [Updated 2019 May 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126/>
36. Rangsin Mahanonda, Chantrakorn Champaiboon, Keskanya Subbalekha Noppadol Sa-Ard-Iam, Warattaya Rattanathammatada, Saranya Thawanaphong, Pimprapa Rerkyen, Fuminobu Yoshimura, Keiji Nagano, Niklaus P. Lang, and Pichyangkul S. Human Memory B Cells in Healthy Gingiva, Gingivitis, and Periodontitis. J Immunol. 2016;197:715–25.

## ANEXOS

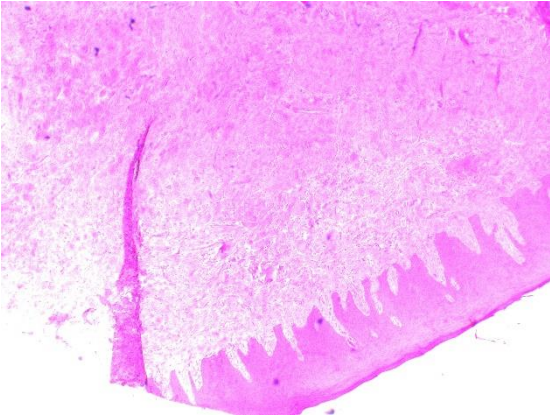
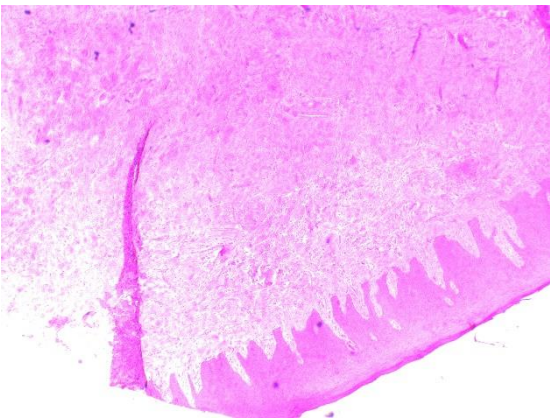


imagen 1



Imágen 2

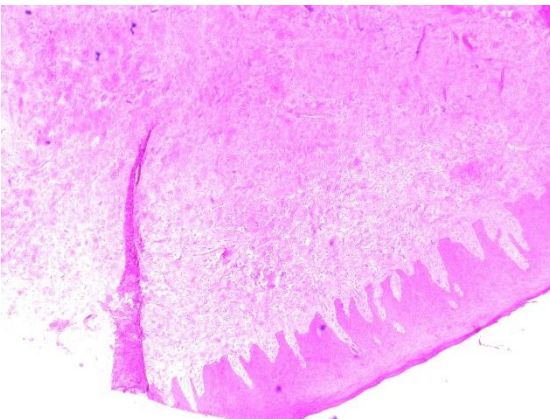


Imagen 3

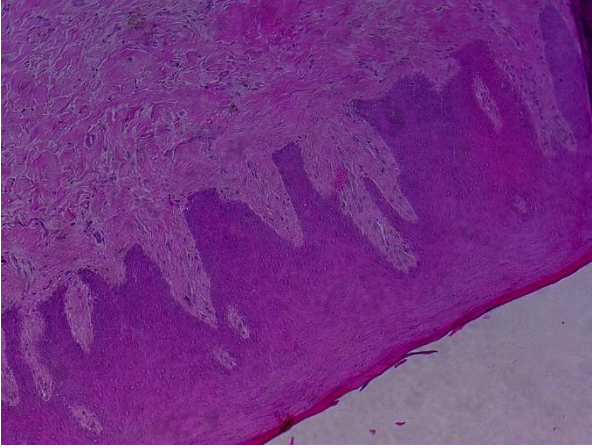


imagen 4

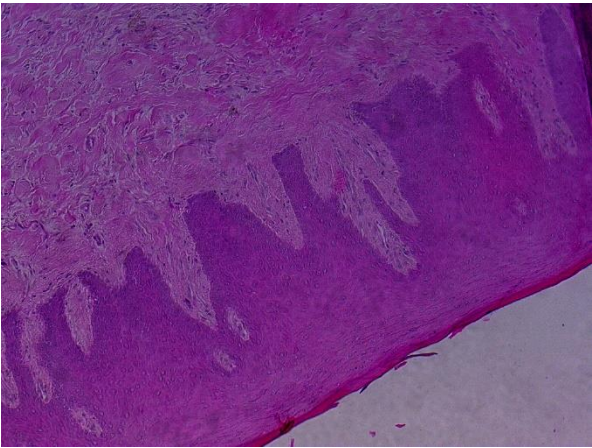


Imagen 5

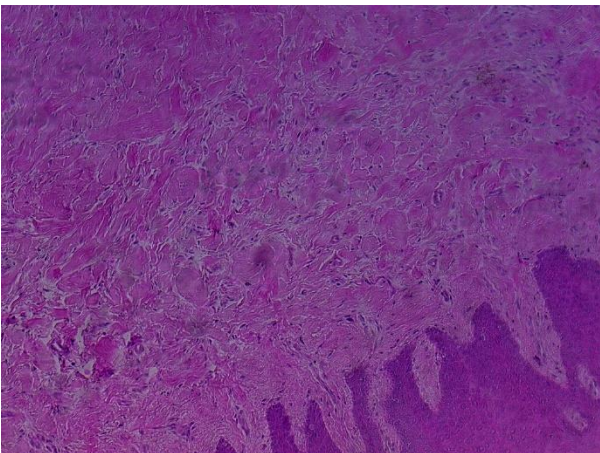
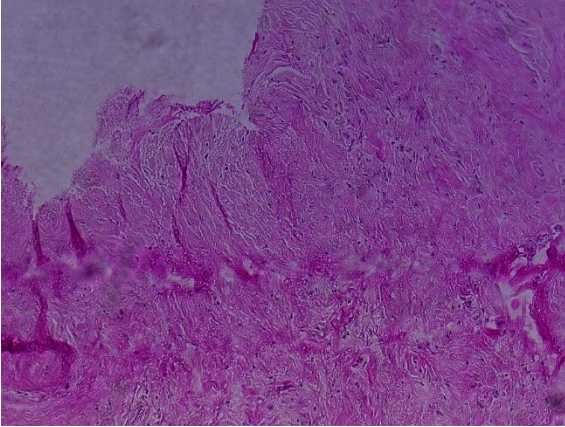


Imagen 6





Imágen 7

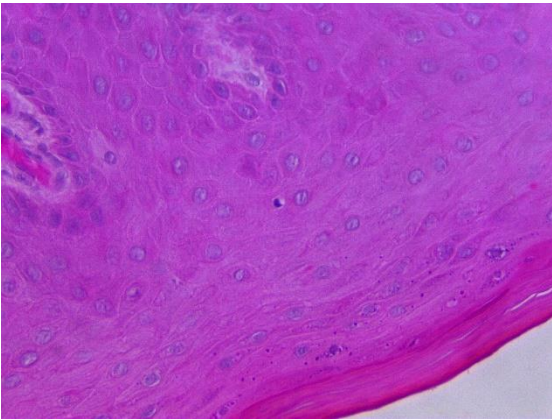


Imagen 8

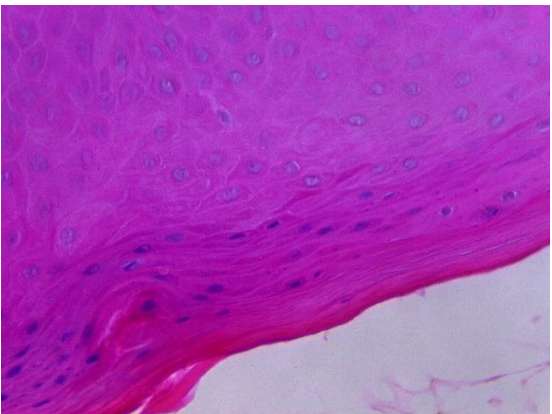


Imagen 9

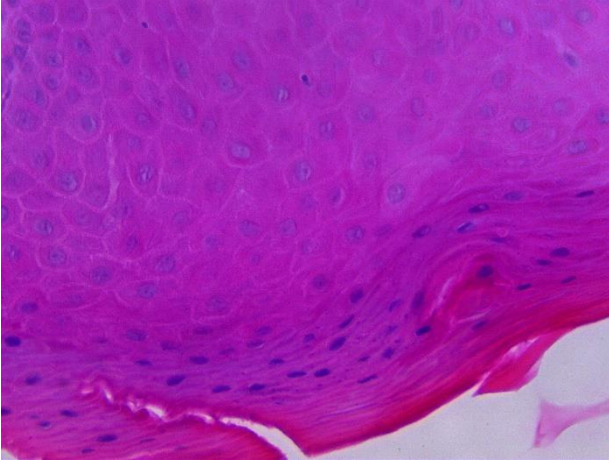
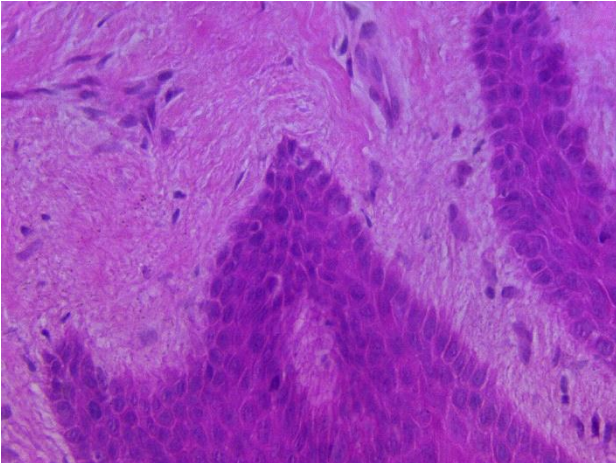


Imagen 10



Imágen 11

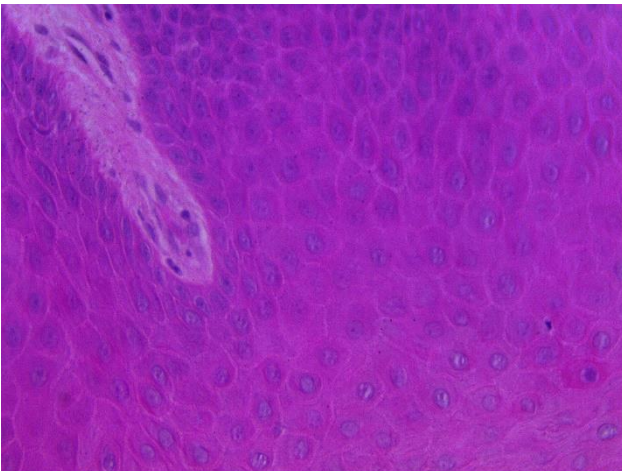


Imagen 12



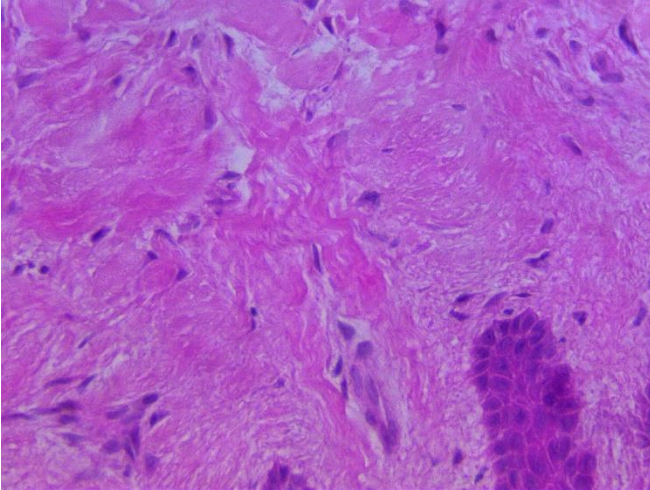


Imagen 13

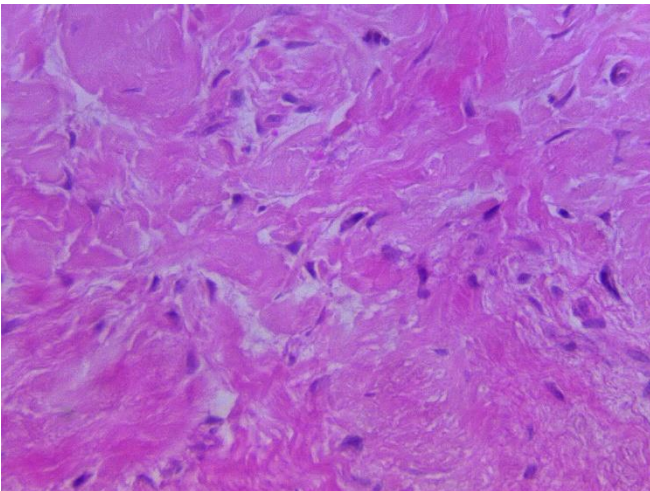


Imagen 14

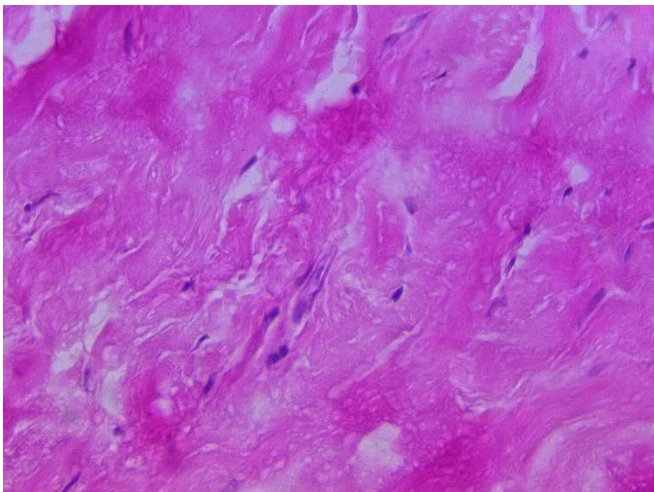


Imagen 15

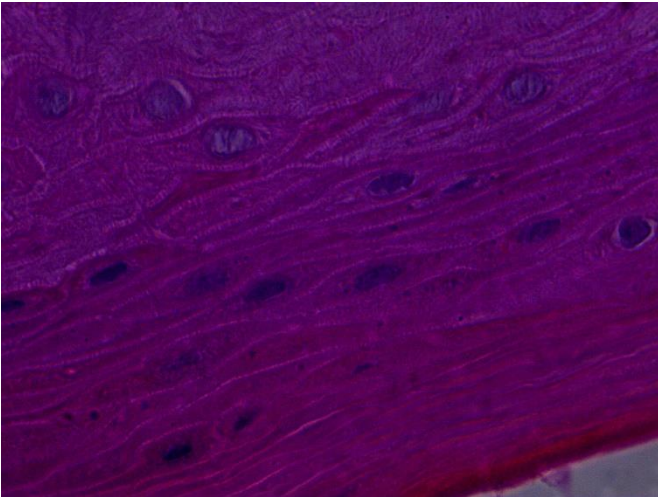


imagen 16

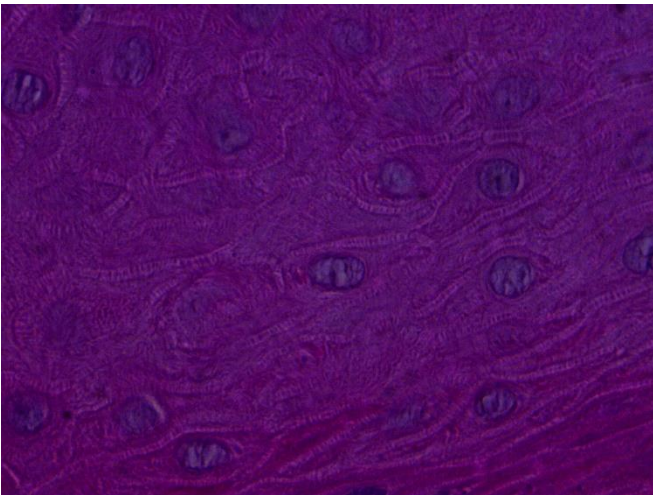


Imagen 17

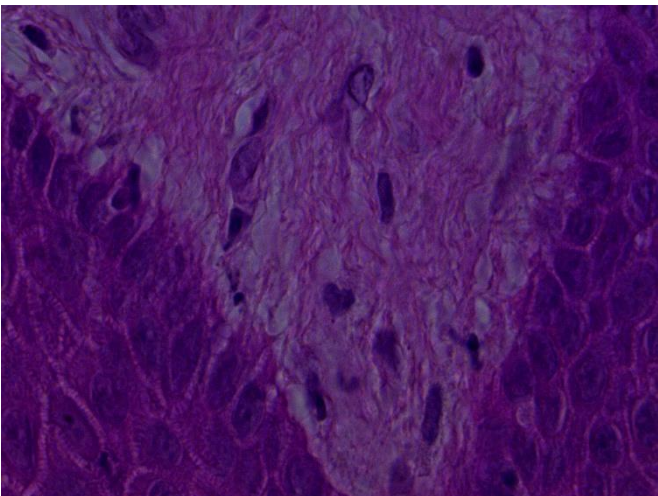


imagen 18

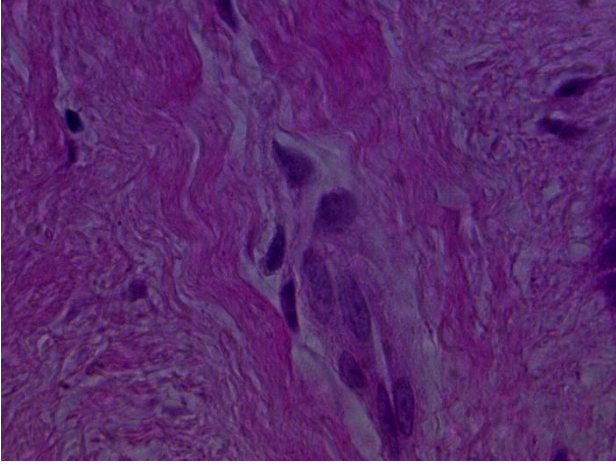


imagen 19

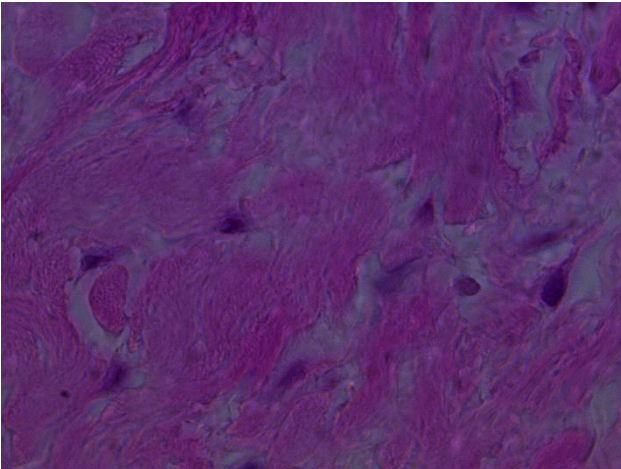
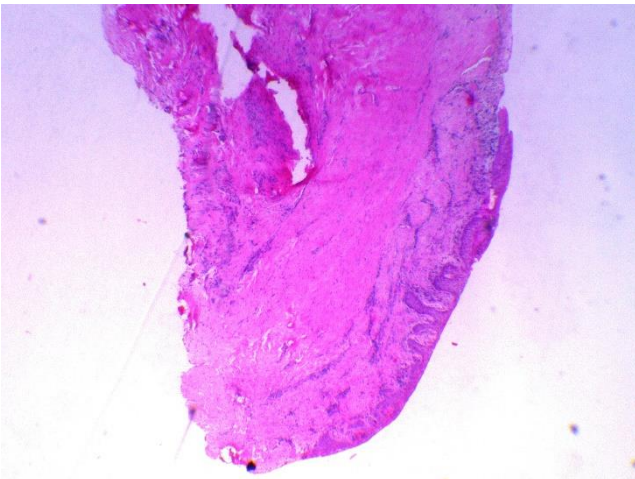


Imagen 20



Imágen 21



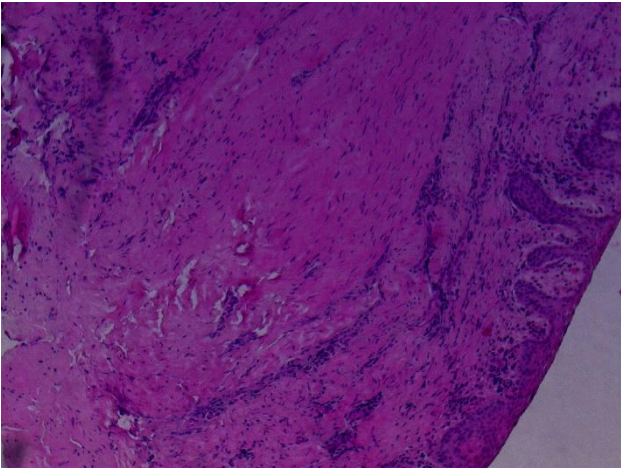


imagen 22

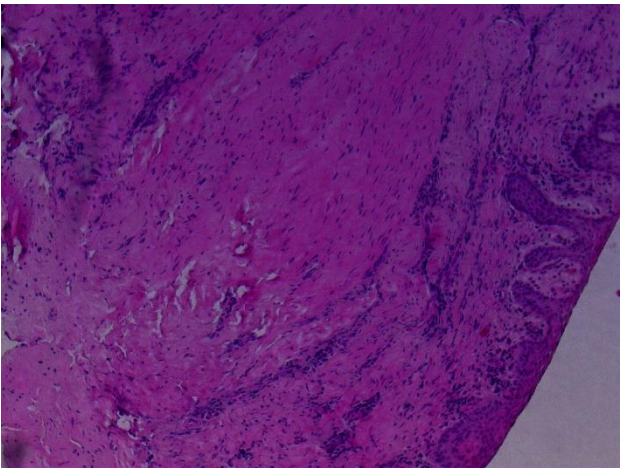


Imagen 23

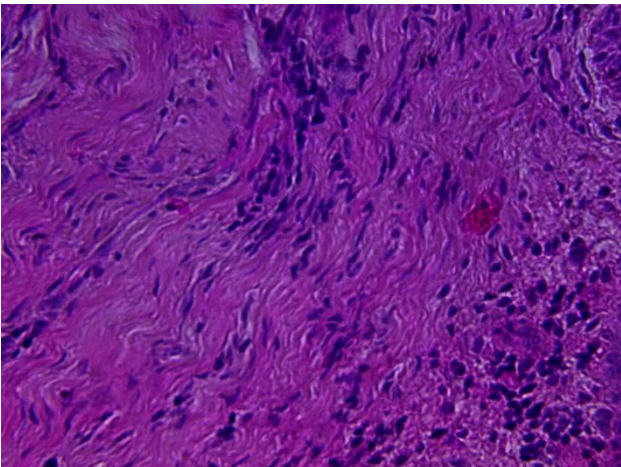


Imagen 24

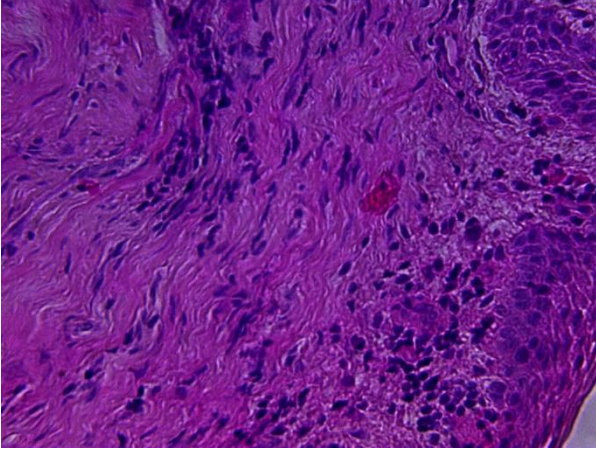


Imagen 25

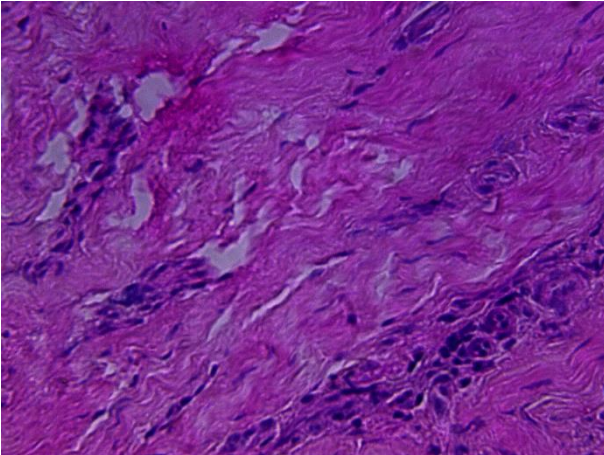


Imagen 26

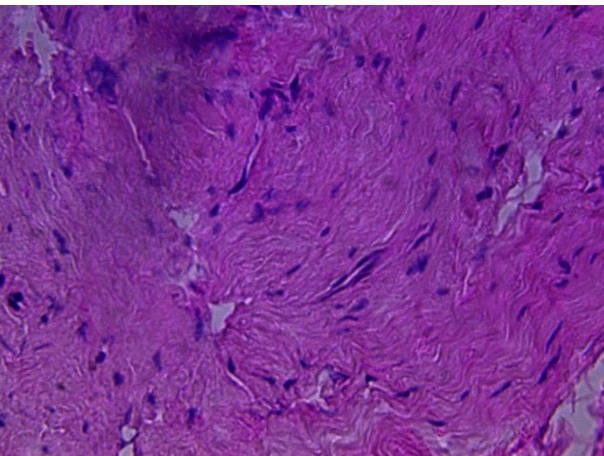


Imagen 27



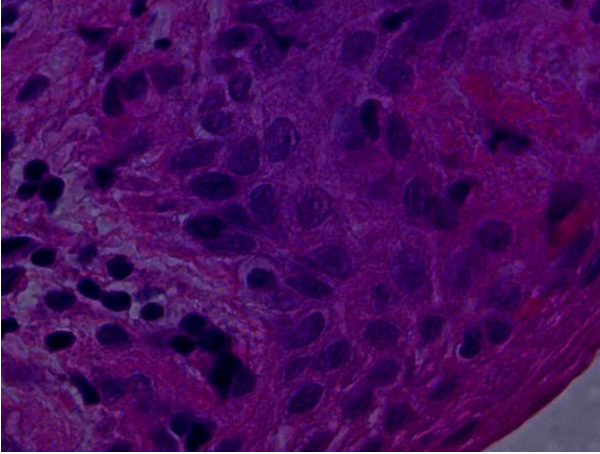


Imagen 28

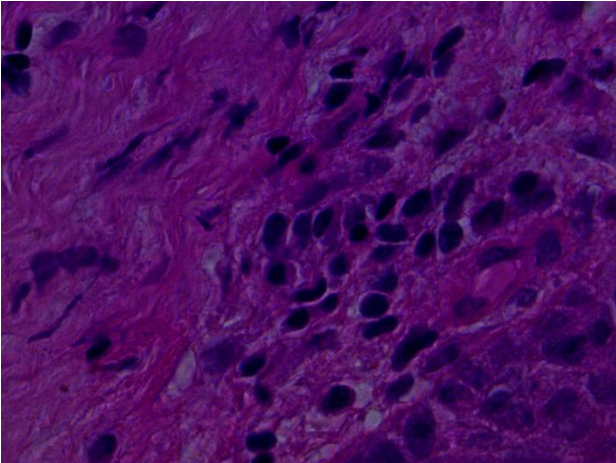


Imagen 29

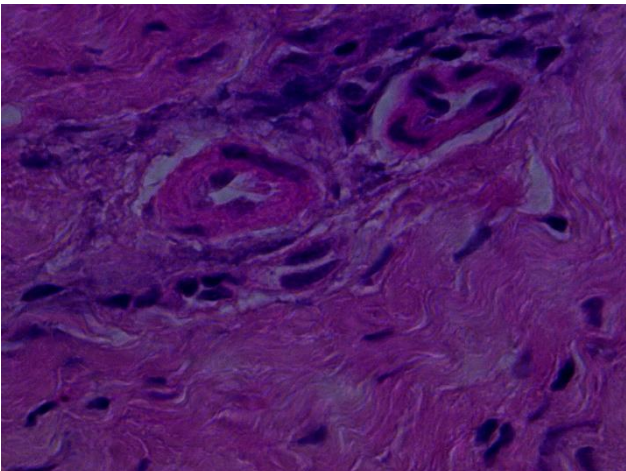


Imagen 30

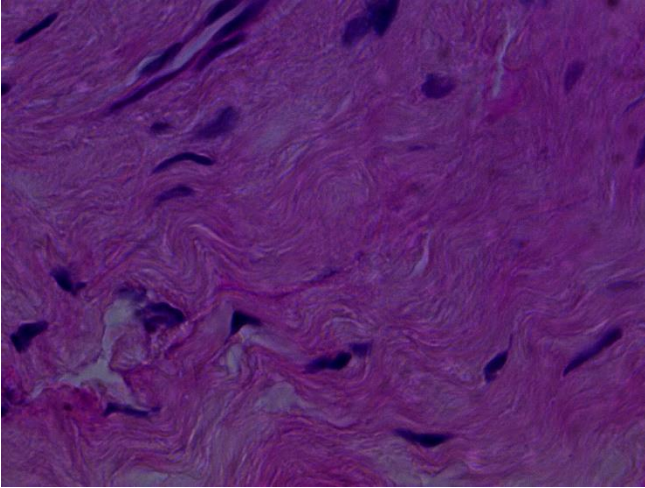


Imagen 31



Imagen 32

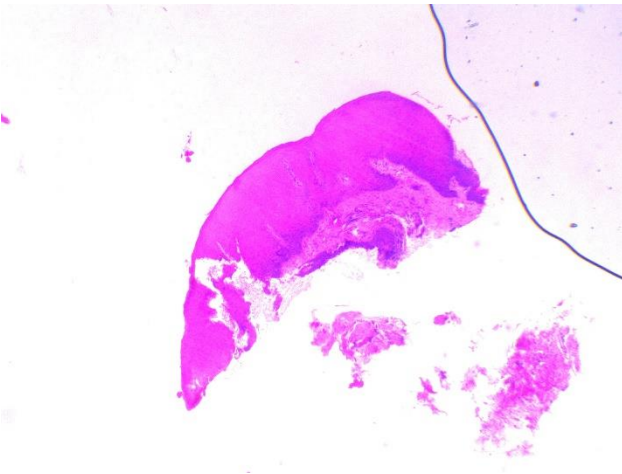


Imagen 33

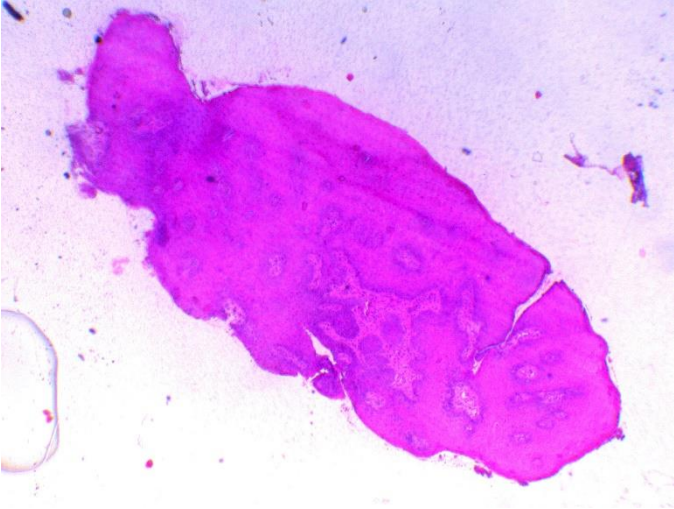


Imagen 34

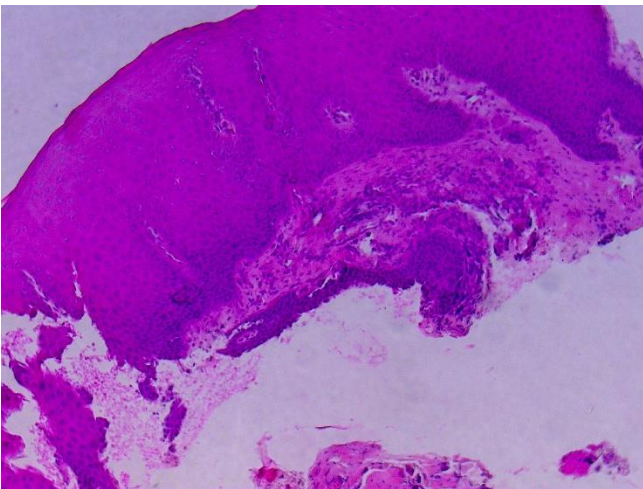


Imagen 35

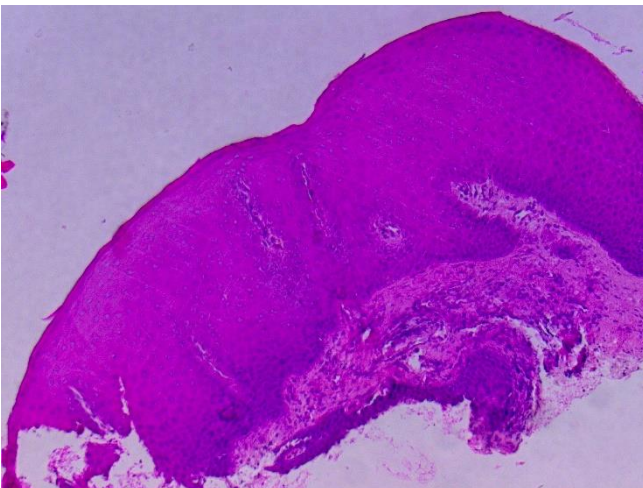


Imagen 36



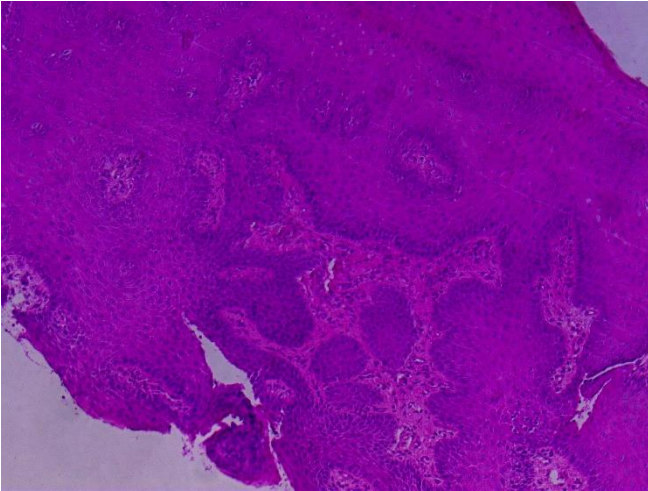


Imagen 37

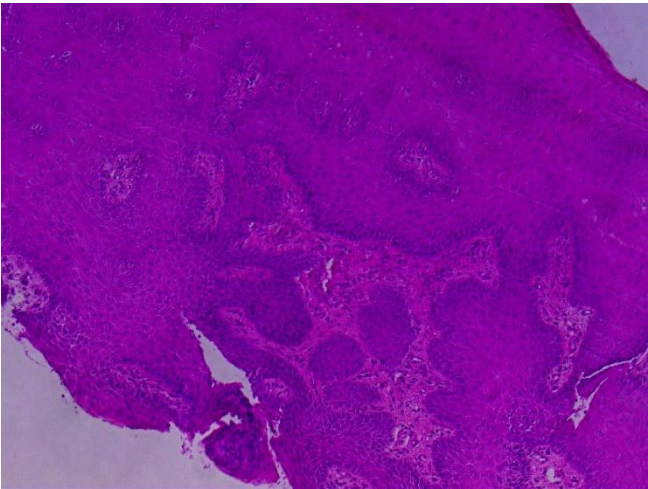


Imagen 38

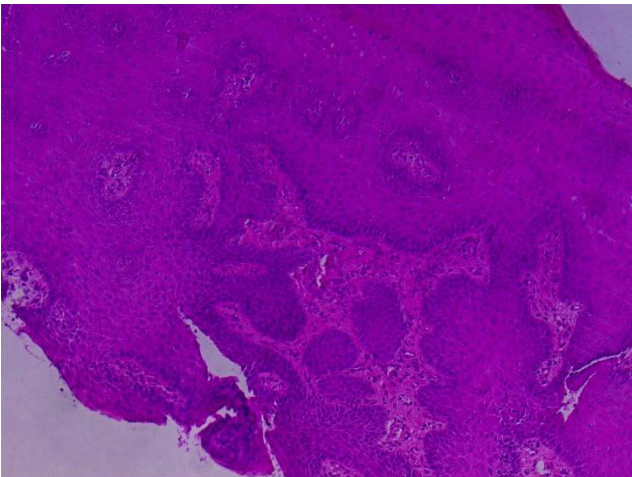


Imagen 39

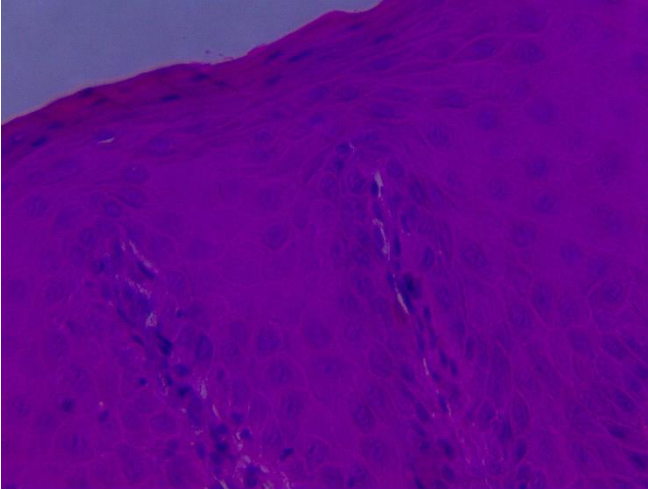


Imagen 40

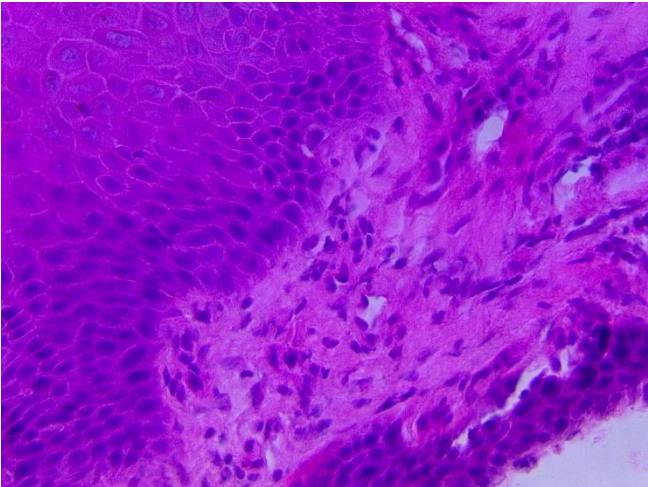


Imagen 41

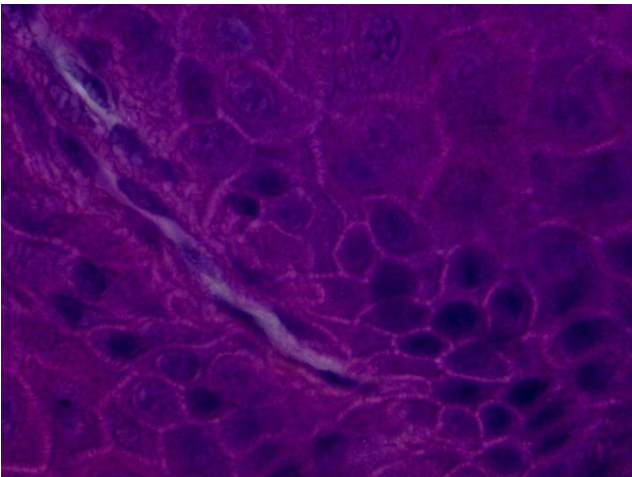


Imagen 42

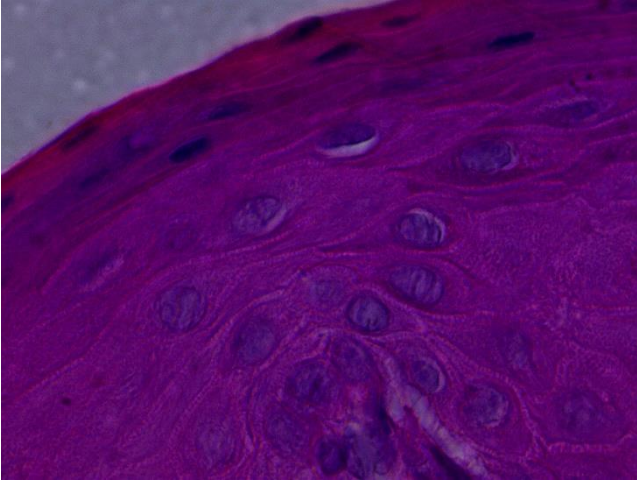


Imagen 43

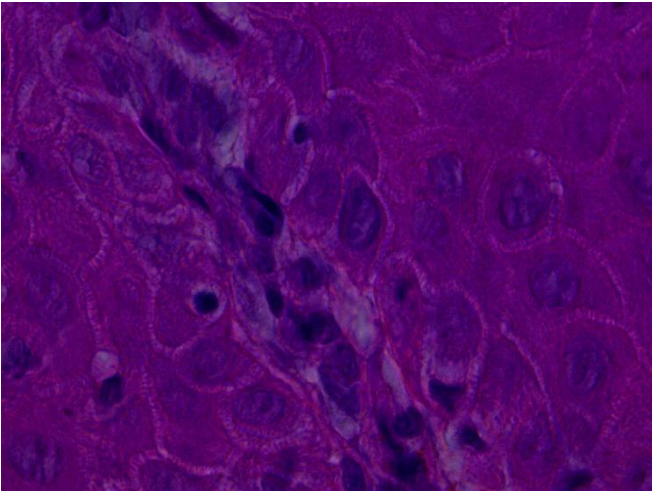


Imagen 44

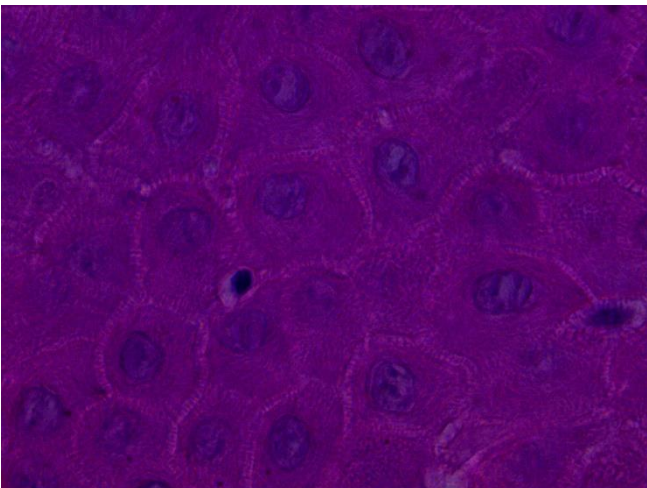


Imagen 45



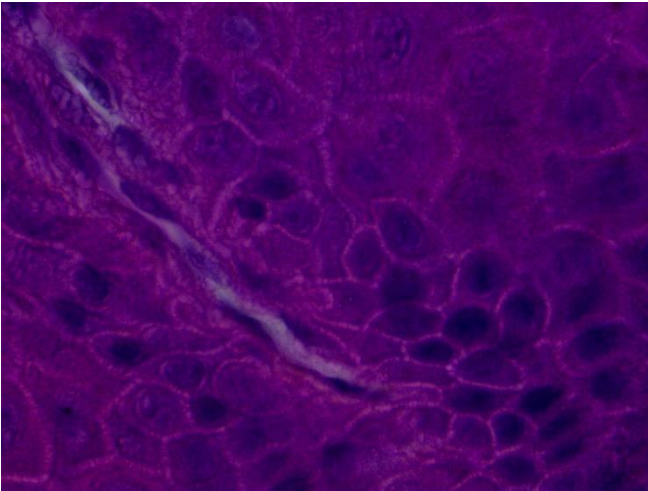


Imagen 46

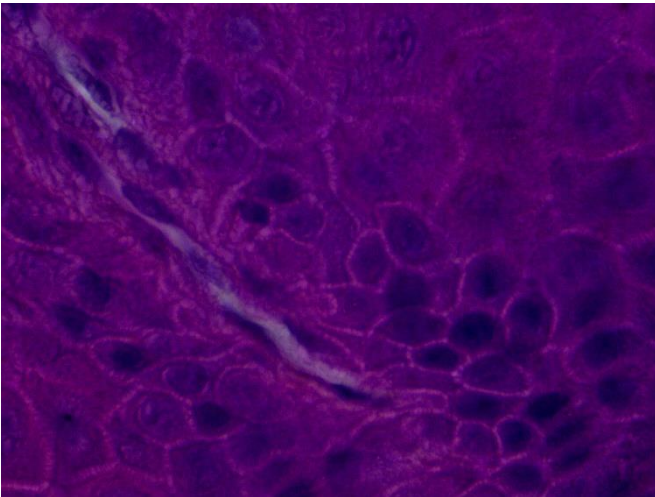


Imagen 47

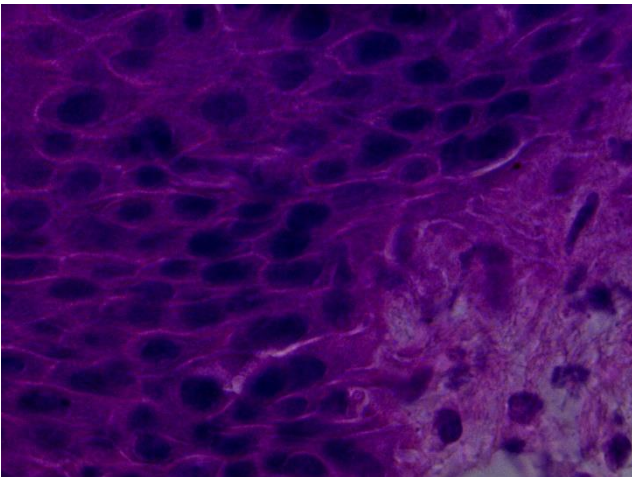


Imagen 48