



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TÍTULO:

“Estandarización de un método para el cultivo de
células osteoblásticas: Estudio *in vitro*”

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

Paulino González Ángel David



TUTOR: Mtra. Gabriela Vilar Pineda

ASESOR: Dr. René García Contreras

LEON, GTO. 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

1	Dedicatoria.....	4
2	Agradecimientos.....	5
3	Resumen.....	7
4	Introducción.....	9
	CAPÍTULO 1.....	11
5	Marco teórico.....	12
5.1	Generalidades.....	12
5.1.1	Cultivos celulares.....	12
5.2	Osteoblastos.....	13
5.3	Medios de cultivo.....	14
5.3.1	α - MEM.....	15
5.3.2	DMEM.....	16
5.4	Composición α - MEM y DMEM.....	17
6	Antecedentes.....	19
	CAPÍTULO 2.....	26
7	Planteamiento del problema.....	27
8	Justificación.....	28
9	Objetivos.....	29
9.1	General.....	29
9.2	Específicos.....	29
10	Hipótesis.....	30
10.1	Hipótesis de investigación.....	30
10.2	Hipótesis Nula.....	30
	CAPÍTULO 3.....	31
11	Marco Metodológico.....	32
11.1	Universo de estudio/ Muestra.....	32
11.2	Criterios de Selección de la muestra:.....	32
11.2.1	Criterios de inclusión.....	32

11.2.2	Criterios de exclusión:	32
11.2.3	Criterios de eliminación	33
11.3	Variables de estudios	33
11.3.1	Variables dependientes	33
11.3.2	Variables independientes:	33
11.4	Diseño experimental.....	34
12	Materiales y Métodos	36
12.1	Materiales.....	36
12.2	Muestra	36
12.3	Instrumental	36
12.4	Insumos.....	36
12.5	Autorización	37
12.6	Implicaciones Éticas.....	37
13	Desarrollo de la metodología.....	39
13.1	Obtención de muestras	39
13.2	Almacenamiento y tratamiento de las muestras.....	39
13.3	Cultivo Primario	39
13.4	Subcultivo Celular	41
13.5	Recuento celular de la proliferación exponencial	42
13.6	Criopreservación de las células	43
14	Análisis y representación de datos	44
CAPÍTULO 4		45
15	Resultados.....	46
16	Discusión	51
17	Conclusiones	53
18	Bibliografía.....	54
ANEXOS		57

1 Dedicatoria

A mis padres y a mis hermanos, por su cariño, enseñanzas y apoyo incondicional.

A mis abuelos por todos sus cuidados y cariño.

A todos mis amigos y compañeros.

A todos los profesores que compartieron conmigo sus conocimientos a lo largo de estos 4 años.

2 Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por regalarme un sinfín de bendiciones, por ser mi guía, mi fuerza y por acompañarme en todos los momentos.

A mi mamá por ser la mejor mamá del mundo, por su amor, por creer en mí y enseñarme innumerables cosas que construyeron lo que hoy soy, porque es una bendición y un privilegio ser tu hijo.

A mi papá porque me enseñó muchas cosas, tal vez sin darse cuenta; extraño ir a trabajar contigo.

A mis hermanos, porque siempre están conmigo y aprendo mucho de ustedes, por quedarse en casa con mis papás cuando yo estoy lejos.

A la Universidad Nacional Autónoma De México y a la Escuela Nacional De Estudios Superiores, Unidad León, por darme la oportunidad de estudiar en la mejor Universidad del país.

Al programa de becas SBEI- PUIC-UNAM por su valioso y fraternal apoyo a lo largo de estos cuatro años y durante la realización del presente trabajo.

A mi tutora. Mtra. Gabriela Vilar Pineda por confiar en mí para realizar este proyecto, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo. A mi asesor Dr. René García Contreras por su invaluable apoyo, tiempo y múltiples enseñanzas y por generar un ambiente que impulsa la pasión por siempre querer saber más.

Al proyecto PAPIIT IA204516. Efectos fotocatalíticos antibacteriales de las NPs de TiO_2 y su impacto biológico en cultivo de células orales: Innovación en biomateriales dentales (2016-2017).

A dos personas excepcionales y especiales, a las cuales valoro mucho Mtro. Fernando Tenorio Rocha y Mtra. Paola Campos Ibarra; nunca olvidaré todo lo que hicieron por mí.

A todos mis profesores de licenciatura; en especial a la Esp. Trilce Melannie Virgilio Virgilio y Esp. Abraham Mendoza Quintanilla; por todas sus enseñanzas y ánimos.

A Elizabeth por siempre darme ánimos y echarme porras; por todas las veces que me dijo que lo lograría, por todo su cariño.

A las personas con las que pase más tiempo en estos 4 años que con mi familia, de los cuales aprendí mucho y disfruté su compañía y cada momento compartido mis grandes amigos: Itzel Luna, Neftalí, Jessica, Paola, Diana Gutierrez, Selina, Diana Lara, Isela, Alejandra, Edgar, Jorge y Luis.

A todos mis pacientes y al personal de las clínicas y biblioteca.

3 Resumen

Introducción: Los cultivos celulares son fundamentales para la investigación científica, establecen modelos de estudio sobre los procesos fisiológicos celulares y permiten una amplia gama de posibles y diversas aplicaciones en la ingeniería de tejidos. La posibilidad de aislar y cultivar células osteoblásticas obtenidas de hueso de maxilares es una alternativa real. **Objetivos:** Establecer un protocolo estandarizado en la ENES, UNAM Unidad León para el cultivo de células osteoblásticas *in vitro* de tejido óseo de maxilares. **Materiales y Métodos:** Explantes de 1x1 mm de hueso de maxilares obtenidas de cirugías de terceros molares fueron lavadas tres veces con PBS, agitadas, incubadas con tripsina al 0,025% durante 60 min a 37°C, cultivadas con medio α -MEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB, sin inactivar por calor), glutamax (1%), antibiótico (1%) e incubadas por 7 días a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, al alcanzar una confluencia mayor al 80% las células fueron desprendidas enzimáticamente y subcultivadas en platos de cultivo celular. La capacidad de proliferación celular fue evaluada con dos diferentes medios de cultivo: α -MEM y DMEM, y su proliferación a las 72 y 96 h fue confirmada por ensayo de MTT a 72 para determinar viabilidad celular. La criopreservación a -80°C se realizó cuando existió una confluencia superior al 80% en un pasaje celular menor a 4 PDL. Los datos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y pruebas de *t*-student y *t*-student pareada. La significancia estadística fue fijada con un $p < 0.05$. **Resultados:** Se observó una disgregación celular emigrando desde los explantes con células dispuestas de forma dispersa y adherida al fondo del plato, mostrando morfología de osteoblasto posterior a los 7 y 14 días de incubación y una confluencia mayor al 80% posterior a los 21 días. Las células cultivadas en medio DMEM mostraron una mayor capacidad proliferativa a las 72 y 96 horas ($p < 0.05$), confirmado por el ensayo de MTT. La criopreservación fue exitosa para futuras investigaciones. **Conclusiones:** El medio de cultivo α -MEM resultó una excelente opción para los cultivos celulares primarios de osteoblastos humanos de muestras de tejido óseo de maxilares, no obstante las células muestran un mejor comportamiento y capacidad proliferativa en el medio DMEM una vez establecido el cultivo primario.

Palabras clave: Proliferación, medio, técnica, adhesión, viabilidad.

Abstract

Introduction: Cell cultures are fundamental for scientific research, establish models of study on cellular physiological processes to have a wide range of possible and diverse applications in tissue engineering. The possibility of isolating and culture osteoblastic cells obtained from jaw bone is a real alternative.

Objectives: To establish a standardized protocol in the ENES, UNAM Leon Unit for the in vitro osteoblast cell culture of bone tissue of the jaws. **Materials and**

methods: Bone tissue of 1x1 mm explants obtained from third molar surgeries were washed three times with PBS, shaken, incubated with 0.025% trypsin for 60 min at 37 ° C, cultured with α -MEM medium supplemented with 20% Fetal bovine serum (FBS, not heat inactivated), glutamax (1%), antibiotic (1%) and incubated for 7 days at 37 ° C, 5% CO₂ and 95% humidity, reaching a confluence greater than 80%, cells were enzymatically detached and subcultured in cell culture plates The cell proliferation was evaluated with two different culture media: α -MEM and DMEM, MTT assay was used to confirm the cell proliferation at 72 and 96 hours to determine cell viability. The cryopreservation at -80 ° C was executed after a confluence reached more than 80% in a cell passage less than 4 PDL. The data were analyzed by Shapiro-Wilk normality test, t-student tests and paired t-student test. The significance was fixed at $p < 0.05$. **Results:** A cell disintegration was observed emigrating from the explants with cells dispersed and adhered to the bottom of the dish, showing osteoblast morphology after 7 and 14 days of incubation and a confluence greater than 80% after 21 days. Cells cultured in DMEM medium showed increased proliferative capacity at 72 and 96 hours ($p < 0.05$), the MTT method confirmed the cell proliferation. The cryopreservation was successful for future researchs. **Conclusions:** The α -MEM culture medium was an excellent choice for the primary cell cultures of human osteoblasts of samples of bone tissue of the jaw, although the cells showed a better behavior and proliferative capacity in DMEM medium once the primary culture was established ..

Key words: Proliferation, medium, technique, adhesion, viability.

4 Introducción

Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica actual, ya que permiten establecer modelos de estudio acerca de los componentes estructurales, así como los fenómenos biológicos, moleculares y el comportamiento celular. Estudiar los procesos fisiológicos que ocurren en las células nos permite tener una amplia gama de posibles y diversas aplicaciones en la ingeniería de tejidos. ⁽¹⁾

Cada año aumenta la demanda de procedimientos para tratar de restablecer la funcionalidad posterior a lesiones como fracturas óseas, lesiones quirúrgicas, degenerativas, patológicas y traumáticas que pueden resultar incapacitantes para los pacientes. ⁽²⁾

Sin embargo, el constante crecimiento y desarrollo de la ciencia y la tecnología permite llevar a cabo estudios de cultivos celulares con la finalidad de conseguir nuevos métodos que tengan la viabilidad de ser utilizados como alternativas terapéuticas. ⁽³⁾

La posibilidad del cultivo de células osteoblásticas obtenidas de hueso de los maxilares es una alternativa real para la regeneración ósea. ⁽⁴⁾

Se han diseñado distintos protocolos para el cultivo de dicha línea celular con resultados positivos; utilizando principalmente medios como el *Eagle's minimal essential medium (MEM)* o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*. ⁽⁵⁾ Consideramos el método de gran interés en investigación en el ámbito médico particularmente en la regeneración ósea, con fundamento en el análisis del potencial inductor en estudios *in vitro* de dichas células en el proceso de mineralización. ⁽⁶⁾

La factibilidad de esta propuesta se fundamenta en estudios previos y consideramos que los resultados que se obtengan de este proyecto pueden proponer un mejor entendimiento de la función de estas células para ofrecer alternativas terapéuticas en la regeneración de tejidos mineralizados.

Si bien esta propuesta es viable; el objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método estandarizado en la ENES UNAM Unidad León, para el cultivo de células osteoblásticas *in vitro*, identificando las condiciones, ambientales y nutricionales para el establecimiento de dicha línea celular; así como la cuantificación de la proliferación de la misma.⁽⁷⁾

CAPÍTULO 1

5 Marco teórico

5.1 Generalidades

5.1.1 Cultivos celulares

La importancia de los cultivos celulares radica en obtener modelos que puedan replicar la fisiología celular; permitiendo una detallada observación y comprensión de los distintos fenómenos biológicos, moleculares y estructurales y en base a dichos estudios desarrollar métodos innovadores acorde a las necesidades actuales en el ámbito de la medicina, ofreciendo con ello nuevas alternativas terapéuticas. ⁽⁸⁾

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables entre las cuales podemos citar:

- Permiten un control preciso del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de CO₂) y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular). ⁽⁹⁾
- Caracterización y homogeneidad de la muestra. Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación. ⁽¹⁰⁾
- Economía. Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo. ⁽¹¹⁾
- Motivaciones éticas. La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo “in vivo” pero es una alternativa válida en muchas

situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos. ⁽⁶⁾

5.2 Osteoblastos

Los osteoblastos pertenecen a uno de los cuatro tipos celulares elementales en el hueso que incluye además, a las células osteoprogenitoras, osteocitos y osteoclastos. ⁽¹²⁾

Los osteoblastos son células formadoras de hueso, que sintetizan y secretan matriz ósea sin mineralizar, llamada también osteoide, es una célula totalmente diferenciada por lo cual ya no puede entrar de nuevo en el ciclo mitótico de división celular, se les encuentra en las superficies óseas de crecimiento, se distinguen de las células osteogénicas por ser de mayor tamaño y de contorno redondo, además de poseer un núcleo excéntrico. El citoplasma de los osteoblastos es extremadamente basófilo, debido a la presencia de nucleoproteína de ribosa, que se relaciona probablemente con la síntesis de componentes orgánicos de la matriz ósea (colágena y glucoproteínas). Contienen abundante fosfatasa alcalina que se encuentra involucrada en el proceso inicial de calcificación, los niveles séricos de fosfatasa alcalina reflejan el nivel de neo-osteogénesis independientemente del tipo de estímulo. Sintetizan y secretan procolágeno que posteriormente será transformado en colágeno Tipo 1, proteínas no-colágenas de la matriz; también osteocalcina, osteonectina, proteoglicano específico del hueso, factores de crecimiento específicos, prostaglandinas E₁, E₂, colagenasa y activador del plasminógeno. Los osteoblastos tienen receptores para la hormona paratiroidea (HPT), otros componentes biológicos que se tiene conocimiento afectan a los osteoblastos son: la calcitonina, estrógenos, vitamina A, vitamina C, glucocorticoides, insulina y prostaglandinas⁽¹²⁻¹⁴⁾

5.3 Medios de cultivo

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello consideraremos que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos: la naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio, la naturaleza y composición de la fase gaseosa y las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.⁽¹³⁾

Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo, en muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el mantenimiento del cultivo.⁽¹⁴⁾

5.3.1 α - MEM

La modificación α - MEM es uno de los medios sintéticos más utilizados para el cultivo celular, principalmente de células de ratón, que contiene aminoácidos esenciales y no esenciales, piruvato de sodio y vitaminas adicionales. La formulación contiene la adición de desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos.^(15,26)



Figura 1 Medio de cultivo α -MEM. Fuente directa.

5.3.2 DMEM

Muchas modificaciones del medio de Eagle se han desarrollado desde que la formulación original apareció en la literatura. Entre los más utilizados de estas modificaciones es el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). DMEM es una modificación del medio basal de Eagle (BME) que contiene una concentración cuatro veces más alta de aminoácidos no esenciales y vitaminas comparada con α -MEM, así como componentes suplementarios adicionales como el bicarbonato y no contiene piruvato de sodio. La fórmula original DMEM contiene 1,000 mg/L de glucosa y se informó primero para el cultivo de células de ratón embrionarias. (15,25,26)

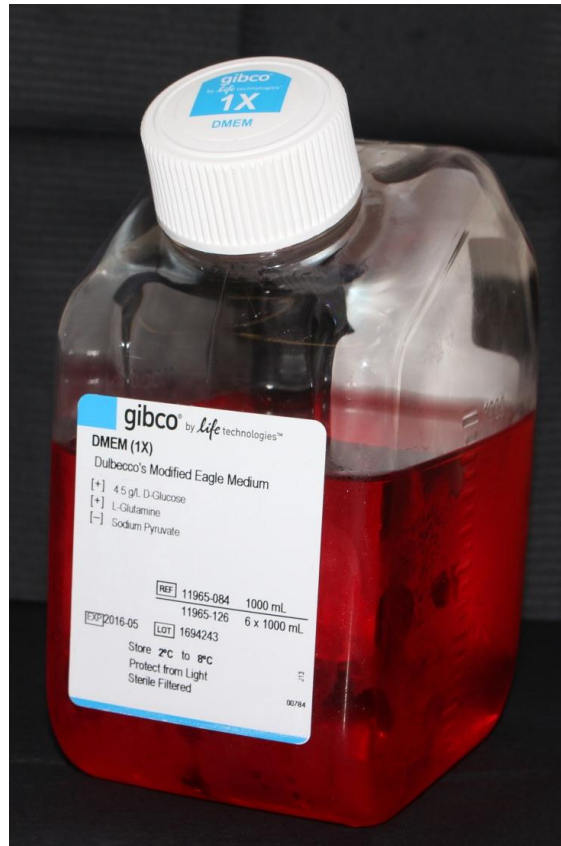


Figura 2 Medio DMEM. Fuente directa

5.4 Composición α - MEM y DMEM

Tabla 1. Composición DMEM. Fuente. URL: <http://sigmaaldrich.com/catalogo/productos/sigma>

COMPONENTE	g/L
Sales Inorgánicas	
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.2
MgSO ₄	0.09767
KCl	0.4
NaHCO ₃	2.2
NaCl	6.8
Na ₂ HPO ₄	0.122
Aminoácidos	
L-Alanina	0.025
L-Arginina • HCl	0.126
L-Asparagina • H ₂ O	0.05
L-Ácido Aspártico	0.03
L-Cisteína • HCl • H ₂ O	0.1
L-Ácido Glutámico	0.075
L-Glutamina	—
Glicina	0.05
L-Histidina • HCl • H ₂ O	0.042
L-Isoleucina	0.052
L-Leucina	0.052
L-Lisina • HCl	0.0725
L-Metionina	0.015
L-Fenilalanina	0.032
L-Serina	0.025
L-Treonina	0.048
L-Triptofano	0.01
L-Tirosina • 2NaH ₂ O	0.0519
L-Valina	0.046

Vitaminas	g/L
L-Ácido Ascórbico • Na	0.05
D-Biotina	0.0001
Cloruro de colina	0.001
Ácido Fólico	0.001
<i>myo</i> -Inositol	0.002
Niacinamida	0.001
Piridoxal • HCl	0.001
Riboflavina	0.0001
Tiamina • HCl	0.001
Otros	
Adenosin	0.01
Citidina	0.01
2'-Desoxiadenosina	0.01
2'-Desoxicitidina • Hcl	0.011
2'-Desoxiguanosina	0.01
Glucosa	1.0
Guanosina	0.01
Rojo fenol • Na	0.011
Ácido Piruvico	0.11
Ácido Tioctico	0.0002
Timidina	0.01
Uridina	0.01
Adiciones	
L-Glutamina	0.292
NaHCO ₃	—

Tabla 2. Composición α -MEM. Fuente URL: <http://sigmaaldrich.com/catalogo/productos/sigma>

COMPONENTE	g/L
Sales Inorgánicas	
CaCl ₂	0.265
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0.0001
MgSO ₄	0.09767
KCl	0.4
NaHCO ₃	3.7
NaCl	6.4
Na ₂ HPO ₄	0.109
Aminoácidos	
L-Alanil-L-Glutamina	—
L-Arginina • HCl	0.084
L-Cisteina • 2HCl • H ₂ O	0.0626
L-Glutamina	—
Glicina	0.03
L-Histidina • HCl • H ₂ O	0.042
L-Isoleucina	0.105
L-Leucina	0.105
L-Lisina • HCl	0.0146
L-Metionina	0.03
L-Fenilalanina	0.066
L-Serina	0.042
L-Treonina	0.095
L-Triptofano	0.016
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.12037
L-Valina	0.094

Vitaminas	
Cloruro de colina	0.004
Ácido Fólico	0.004
myo-Inositol	0.0072
Niacinamida	0.004
D- Ácido Pantoténico • ½Ca	0.004
Piridoxal • HCl	-
Piridoxina • HCl	0.00404
Riboflavina	0.0004
Tiamina • HCl	0.004
Otros	g/L
D-Glucosa	4.5
HEPES	-
Rojo fenol • Na	-
Ácido Pirúvico	-
Adiciones	
Glucosa	-
L-Glutamina	0.584
NaHCO ₃	—

6 Antecedentes

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Las técnicas de cultivos celulares han aportado un valioso método analítico para el estudio del comportamiento biológico de las células.⁽¹⁶⁾

Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. En tanto, en 1907, el zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales.⁽¹⁷⁾

Harrison fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.⁽¹⁸⁾

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.⁽¹⁹⁾

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.⁽¹²⁾

Roux y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.⁽¹⁷⁾

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal (embrión de pollo), durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste, mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años.⁽²⁰⁾

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones; entre las que podemos destacar:

- 1948. Earle y col. aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.^(19,20)
- 1952. Gry y col.. establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.⁽²¹⁾
- 1955. Eagle realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares, etc.)⁽²²⁾
- 1961. Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.⁽¹⁷⁾
- 1964. Peck y col.. Reconocen la posibilidad de aislar y cultivar células óseas utilizando la técnica de digestión con colagenasa.⁽²³⁾
- 1974. Wong utiliza una secuencia de digestión con colagenasa para obtener una población homogénea de osteoblastos.⁽²⁴⁾

- 1985. Termine utiliza un método donde las muestras de hueso son pretratadas con colagenasa para remover todas las células, excepto en la zona de donde se obtendrán las células para cultivo.⁽²⁵⁾
- 1986 Bellows describe por primera vez la formación de nódulos mineralizados en cultivos de células osteoblásticas.⁽²⁶⁾

Desde 1976, los cultivos celulares han conocido una revolución tecnológica que pasa por la incorporación de las técnicas de ingeniería genética, el desarrollo de reactores para cultivos masivos, producción de vacunas virales, el desarrollo de nuevas superficies de cultivo en monocapa de alta adherencia, sustitutos de suero, robotización de las manipulaciones de cultivo, etc.⁽²⁷⁾

En la actualidad, entre las áreas de aplicación en las que el cultivo celular *in vitro* es una herramienta básica cabe destacar:

- El Cáncer, que se puede considerar como una enfermedad del ciclo celular. Los defectos en el control del ciclo pueden conducir a una proliferación celular anormal o a alteraciones cromosómicas como las que se observan en las células cancerosas. Se están estudiando las relaciones entre la regulación del ciclo celular y el cáncer, así como el papel específico de dos tipos de genes, los oncogenes y los genes supresores de tumores, presentes en las células normales y cuyas alteraciones pueden conducir precisamente a la aparición del cáncer.⁽²⁸⁾
- La reproducción y diferenciación celular. Sus aplicaciones se refieren, por una parte, a la llamada “reproducción asistida” y al controvertido tema de la clonación y por otra, a la medicina regenerativa en la que, a partir de células madre o troncales, se forman o reconstruyen tejidos que sustituyen a otros dañados por diversos procesos.⁽⁷⁾
- La medicina regenerativa, que pretende conseguir la regeneración, total o parcial, de los tejidos que han perdido masa celular, utilizando técnicas de trasplante celular para implantar células troncales o células madre.⁽²⁹⁾

La historia muestra que los queratinocitos fueron de las primeras células en ser cultivadas *in vitro* con la intención de diferenciarlas a un fenotipo osteoblástico y con ello un análisis de los diferentes estados de diferenciación y maduración del linaje osteoblástico.⁽¹⁷⁾

A partir de los primeros estudios de Peck y cols. en 1964; que reconocieron la posibilidad de aislar y cultivar células óseas, se han descrito diferentes técnicas para tal fin: digestión enzimática con colagenasa, clonación y aislamiento mecánico.⁽²³⁾

Estos estudios han permitido una mejor comprensión de los diversos mecanismos de la fisiología celular, el ambiente propicio para su cultivo, desarrollo y mantenimiento; con la finalidad de una subsecuente aplicación a los diversos ámbitos de la medicina, en particular de la ingeniería tisular y medicina regenerativa.⁽⁴⁾

Los cultivos de células osteoblásticas se han realizado tanto de especies animales como de humanos. Los linajes animales provienen principalmente de distintos sitios donantes de ratones y conejos; siendo los principales la calota, la tibia y cresta ilíaca.⁽¹⁹⁾

Actualmente se realizan también cultivos de células estromales de la médula ósea con la finalidad de diferenciarlas a un fenotipo osteoblástico.⁽³⁰⁾

La preocupación por obtener un material de injerto óseo que nos asegure la calidad y cantidad del tejido neoformado, ha sido el objetivo de los investigadores relacionados en este campo en los últimos años. La regeneración ósea es la respuesta que consigue el organismo a la restitución íntegra de tejido tras una lesión a diferencia de la reparación, donde el tejido se forma por un tejido cicatrizal con características diferentes al original.⁽⁸⁾

En el área de cirugía reconstructiva contamos con opciones terapéuticas basadas en injertos óseos que han mostrado ser útiles, sin embargo todavía se puede hacer algo más por obtener un mejor material de reconstrucción que los

aloinjertos. En el caso de los autoinjertos a pesar de ser una excelente opción y el “estándar de oro” las complicaciones asociadas a las intervenciones quirúrgicas adicionales necesarias para su obtención resultan los principales puntos en contra los cuales pueden ser evitados mediante el uso de los injertos osteoinductivos. ⁽⁹⁾

Los aloinjertos tienen un potencial regenerativo disminuido lo que significa un mayor tiempo de recuperación que no en todos los casos es sinónimo de calidad y cantidad del tejido óseo neoformado. ⁽²⁾

Continuamente, se realizan esfuerzos por encontrar materiales con las características adecuadas para la restauración o sustitución del tejido óseo en seres humanos. Esta necesidad ha determinado no sólo el interés de encontrar tales materiales, sino que se elaboren constantemente nuevas tecnologías para que cumplan con las exigencias en este campo. ⁽⁶⁾

El cultivo de células osteoblásticas ofrece un modelo de estudio con un gran potencial ya que brinda la posibilidad de conocer y examinar los diversos mecanismos que llevan a la regeneración ósea. ⁽³⁰⁾

Los primeros reportes de cultivos de células humanas con fenotipo osteoblástico exitosos fueron mediante la desmineralización y digestión con colagenasa por Bard (1972); en tanto que Mills (1979) utiliza la técnica alternativa de explantes. ⁽³¹⁾

Un método exitoso y viable para ser reproducible es el siguiente:

Al obtener un explante óseo debe ser transportado en una solución salina de buffer fosfato (PBS), en el mínimo de tiempo, de preferencia el mismo día. Todo el trabajo realizado debe efectuarse en la campana de flujo laminar con material estéril. ⁽²⁴⁾

Se deben remover los excesos de otros tejidos de la superficie del explante, posterior a esto se transfiere a una caja Petri que contendrá un pequeño volumen de PBS (5- 20mL) dependiendo del tamaño del espécimen. Los fragmentos deben medir aproximadamente 3-5 mm de diámetro. ⁽³²⁾

Las muestras se depositan en un contenedor universal estéril de 30ml con 15-20 ml de PBS. El tubo se lleva 10s al vortex 3 veces y se deja en el contenedor 30s. ⁽²⁶⁾

Se debe tener cuidado de no dejar células hematopoyéticas, por ello se debe cambiar el PBS y repetir el proceso con el vortex. ⁽³²⁾

El proceso se debe repetir un mínimo de 3 veces o hasta que no queden remanentes visibles de tejido hematopóyetico y los fragmentos óseos tengan una apariencia clara o blanquecina. ⁽¹⁶⁾

Los explantes se lavan a una densidad de 0.2-0.6/ 100 mm de diámetro de la caja Petri en 10ml del medio de cultivo. ⁽⁵⁾

Se dejan a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 93% y con 7% de CO₂. ⁽³³⁾

Los cultivos se dejan inalterados durante 7 días periodo tras el cual se sustituye el medio con un volumen igual al primero con las debidas precauciones para no desalojar los explantes. ⁽³¹⁾

Se debe cambiar de nuevo a los 14 días y a partir de ahí 2 veces por semana. ⁽²⁴⁾

La primera evidencia de proliferación celular en la superficie de los explantes puede observarse a los 5-7 días después de la siembra, a los 7-10 días se puede observar la migración desde los explantes hacia la superficie de la placa de cultivo y la confluencia mayor de los cultivos se observa en un lapso de 4-6 semanas con un grado de saturación que por lo regular es de 29000 ± 9000 células/ cm^2 , esto dependerá del propio donante. ⁽³²⁾

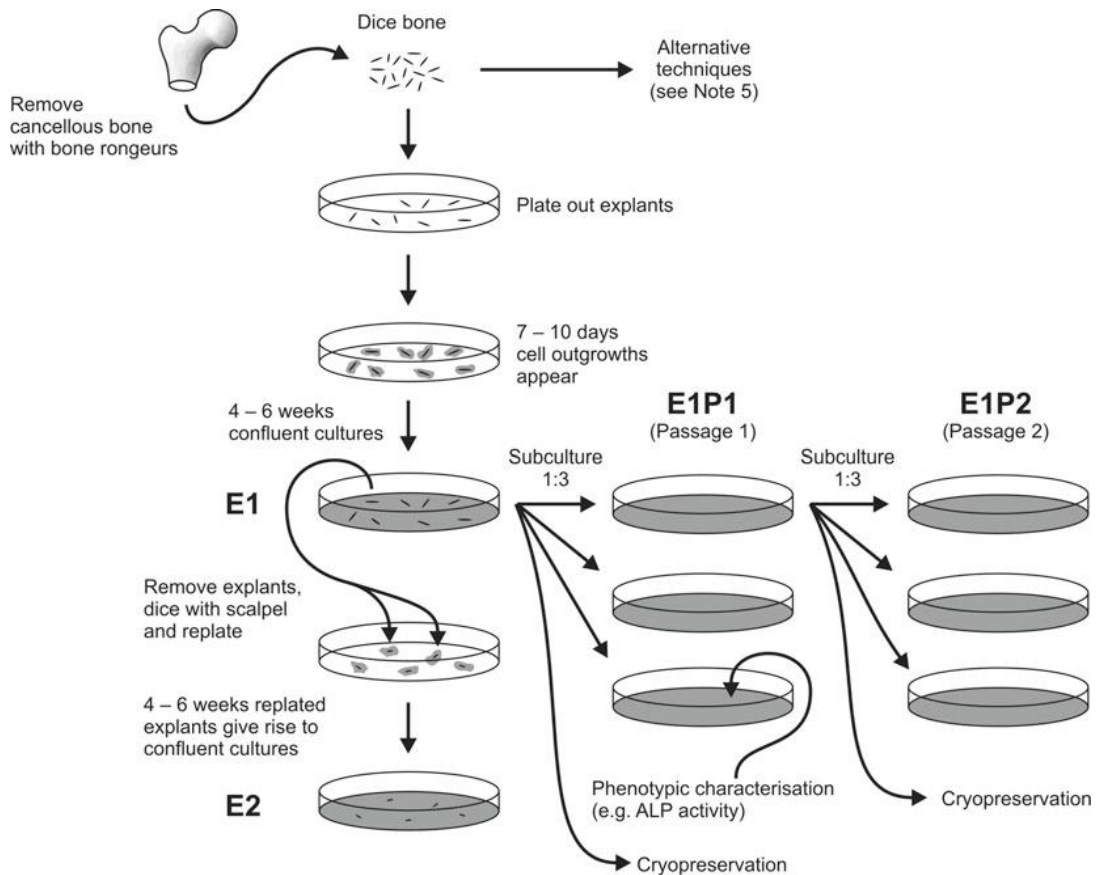


Figura 3 Esquema para el establecimiento de cultivos primarios de osteoblastos. Fuente. Gartland, A. Human cells culture protocols. 2012.Springer. Vol.86.

CAPÍTULO 2

7 Planteamiento del problema

Los procedimientos de colocación de injertos, aplicación de biomateriales e ingeniería tisular han aumentado exponencialmente cada año.⁽³⁴⁾

Los estudios de vanguardia se enfocan principalmente a los experimentos basados en células; esto abre un panorama que permite el desarrollo de nuevas terapias con el apoyo del avance tecnológico.⁽³⁵⁾

La Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León de la UNAM, realiza diversos estudios con distintas líneas de investigación; no obstante a la fecha no se cuenta con un protocolo para la obtención, aislamiento, cultivo y caracterización de células osteoblásticas.⁽²⁶⁾

El problema a resolver radica en proponer un método idóneo y eficaz así como un protocolo estandarizado para el cultivo primario de células osteoblásticas humanas para la ENES León, UNAM que sienta las bases para el desarrollo de futuras investigaciones en el ámbito de la ingeniería tisular, terapia celular y medicina regenerativa.⁽³⁶⁾

Con base a la problemática prevalente es posible generar la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible realizar un protocolo estandarizado para la ENES, León; para el cultivo primario de células osteoblásticas humanas que en un futuro sirvan como base para el establecimiento de diversas líneas de investigación sobre regeneración ósea a nivel institucional?

8 Justificación

Diversas técnicas se han utilizado con el objetivo de restituir o regenerar el tejido óseo dañado, una de tales técnicas son los implantes o trasplantes, con los inconvenientes de ser métodos costosos y poco viables en nuestro país. Muchos países han invertido dinero en la búsqueda de nuevos métodos con potencial terapéutico, surgiendo así la ingeniería de tejidos que busca la formación de tejidos *in vitro*.⁽¹³⁾

Una de las células con potencial regenerador de tejidos y con mayor interés de estudio son las células osteoblásticas; para lo cual se han propuesto distintas técnicas y medios de cultivo para determinar las condiciones ideales para llevarlo a cabo.⁽²⁵⁾ Los estudios de vanguardia en relación a la ingeniería de tejidos tienen la finalidad de lograr la regeneración ósea mediante mecanismos que nos brindan la posibilidad de preservar la función y estructura anatómica, minimizando el riesgo de morbilidad teniendo compatibilidad celular y biológica. Por lo anterior, para ser consideradas como una posible alternativa terapéutica clínica el cultivo de células osteoblásticas debe ser altamente estandarizado y efizcamente reproducible. Este protocolo nos permitirá realizar cultivos celulares que en un futuro próximo servirán como base en formulaciones que permitan la regeneración ósea. Contando con un proyecto sustentado en las consideraciones, bioéticas, científicas, tecnológicas y sociales que demanda la investigación del siglo XXI.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

9 Objetivos

9.1 General

Establecer un protocolo y método estandarizado para el cultivo de células osteoblásticas *in vitro* de tejido óseo de maxilares que reúna las condiciones fisicoquímicas precisas y nutricionales para realizar cultivos primarios de células osteoblásticas humanas; así como su preservación en la ENES Unidad León de la UNAM, para en un futuro generar formulaciones que promuevan la regeneración ósea.

9.2 Específicos

1. Comparar las técnicas de cultivo, disgregación enzimática con Tripsina-EDTA o explantes, que muestren mejores resultados para el establecimiento celular hasta lograr una confluencia mayor al 80% de población celular.
2. Identificar el medio de cultivo adecuado para la preservación de cultivos celulares de osteoblastos entre el medio α -MEM y DMEM.
3. Cuantificar de forma exponencial el número de células cultivadas con el medio α -MEM y DMEM.
4. Determinar la capacidad proliferativa y viabilidad celular cultivadas con el medio α -MEM y DMEM mediante el ensayo de MTT a las 72 y 96 horas.
5. Monitorear la adhesión celular focal al plato tras un subcultivo de osteoblastos a 1, 4, 6, 8, 12 y 24 horas.
6. Criopreservar en criotubos los osteoblastos primarios para futuras investigaciones en su división celular menor a 4 PDL y tener biodisponibilidad en stock.

10 Hipótesis

10.1 Hipótesis de investigación

Es viable realizar un protocolo y método estandarizado que cumpla con las características ideales para el cultivo celular primario de osteoblastos humanos en medio de cultivo α -MEM para su establecimiento. Siendo el medio α -MEM, el medio ideal para su proliferación celular en comparación con DMEM en la ENES Unidad León, UNAM.

10.2 Hipótesis Nula

Es viable realizar un protocolo y método estandarizado que cumpla con las características ideales para el cultivo celular primario de osteoblastos humanos en medio de cultivo α -MEM para su establecimiento. Siendo el medio DMEM, el medio ideal para su proliferación celular en comparación con α -MEM en la ENES Unidad León, UNAM.

CAPÍTULO 3

11 Marco Metodológico

Tipo de estudio: Experimental in vitro.

Diseño de estudio: Puro, descriptivo, prospectivo y comparativo.

11.1 Universo de estudio/ Muestra

Muestra: No probabilística.

Método de muestreo: Por cuotas.

Universo de estudio: Pacientes que acudan a la clínica de cirugía bucal ENES, Unidad León.

Tamaño de muestra: 10 pacientes, 5 muestras de tejido óseo por cada tipo de medio de cultivo.

Densidad celular: Número de células óseas establecidas de tejido óseo humano cultivadas para su criopreservación.

11.2 Criterios de Selección de la muestra:

La selección de pacientes se lleva a cabo mediante las siguientes características:

11.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes entre 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM.
- Alveolos sin presencia de infección.
- Pacientes sin enfermedades sistémicas.
- Pacientes sin toxicomanías.

11.2.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes con antecedentes de enfermedades del tejido óseo.

Pacientes que utilicen inmunomodulares, esteroides, o bifosfonatos.

11.2.3 Criterios de eliminación

- Pacientes que se nieguen a firmar el consentimiento informado para la participación en el estudio.
- Muestras que entren en contacto con otra superficie antes de ser depositadas en la solución transportadora.

11.3 Variables de estudios

11.3.1 Variables dependientes

VARIABLE	DEFINICIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	ESCALA Y UNIDAD DE MEDICION
Proliferación celular	Es el incremento del número de células por división celular ⁽²²⁾	Se utilizó el método de conteo celular por hematocitómetro y se complementó con el método de cuantificación automática.	Cuantitativa discreta	De razones 0-n células/ ml

Tabla 3. Variables dependientes del muestreo.

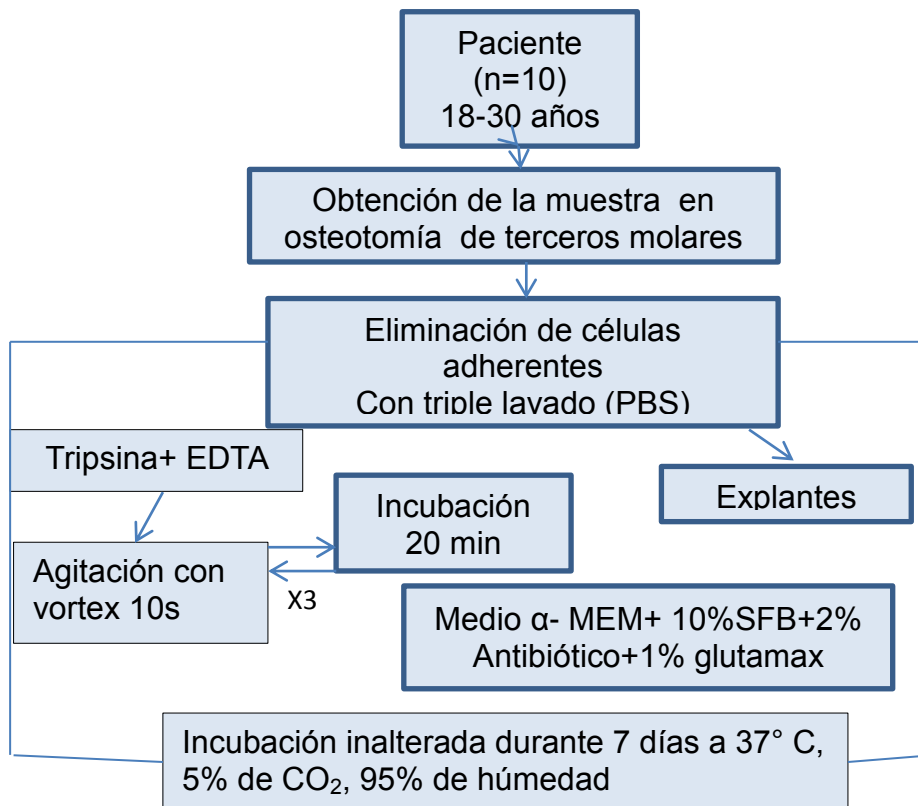
11.3.2 Variables independientes:

Variables	Definición	Definición Operacional	Tipo	Escala Y Unidad De Medición
Tipo de medio de cultivo	Son medios artificiales preparados mediante la mezcla de soluciones orgánicas complejas que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas.	Se utilizaron un medio de cultivo α -MEM y DMEM adicionados con 20% de SFB + 2% de antibiótico +1% de glutamax como análisis variable.	Cualitativa	Nominal 1-DMEM 2- α -MEM

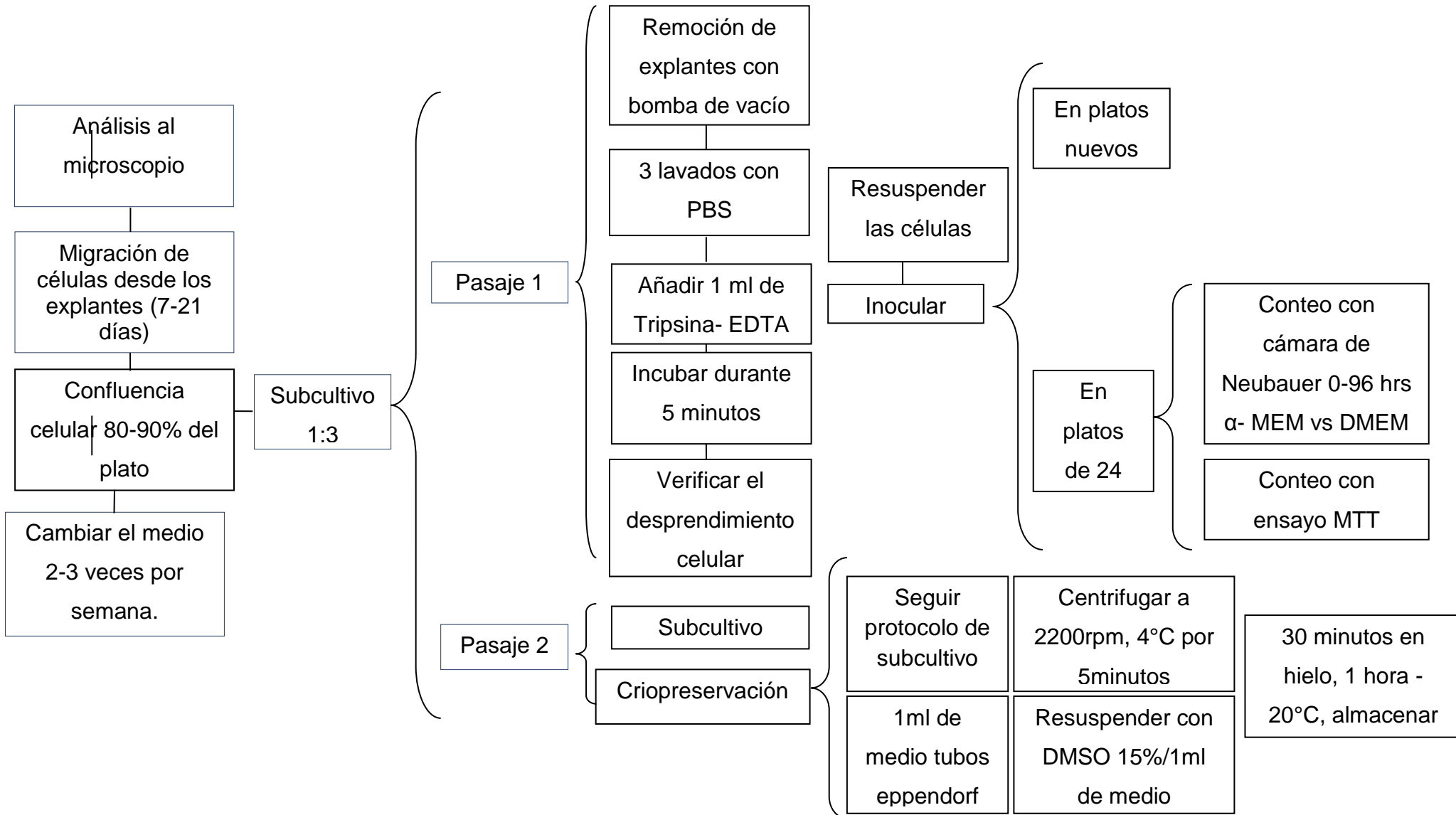
Tiempo de proliferación celular	Incremento del número de células por división celular cuantificadas por medio del conteo celular por hematocitómetro y cuantificación automática.	Rango temporal a partir del cultivo primario a los 4 semanas de incubación.	Cuantitativa discreta	De razones 0-n horas de incubación.
Técnica de cultivo	Procedimientos efectuados para el crecimiento celular.	Explante y digestión enzimática	Cualitativa	Nominal dicotómica 1.-Explante 2.- Digestión enzimática

Tabla 4. Variables independientes del muestreo.

11.4 Diseño experimental



Esquema 1 Metodología para el establecimiento de cultivos primarios de células osteoblásticas.



Esquema 2 Metodología para el subcultivo, criopreservación y conteo celular.

12 Materiales y Métodos

12.1 Materiales

Para aumentar la probabilidad de éxito de nuestro proyecto fue necesario tener un control estricto y minucioso de los materiales, equipos e insumos a utilizar entre los cuales se contemplaron: Equipo: Campana de flujo laminar horizontal (Lumistell^{MR} LH-120, Celaya, Guanajuato, México), Microscopio (Leica AxioCamp MRc, Wetzlar, Alemania), Centrifugadora (Beckman®, J2-MC, Indianápolis, EUA) Incubadora (Binder®, Tuttlingen, Alemania), Ultracongelador (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), Cámara de Neubauer (Boeco®, Alemania), Espectrofotometro (Thermo Sientific®, Finlandia).

12.2 Muestra

Muestras de tejido óseo obtenidas de las osteotomías de las odontectomías quirúrgicas de terceros molares, (n=10).

12.3 Instrumental

Bisturíes no. 20, pinzas de disección, micropipetas (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), frascos de cultivo Falcon® 12.5 cm² (Becton, Dickinson Labware, NJ, EUA), cajas Petri de 10-cm y 6-cm (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA).

12.4 Insumos

Buffer de fosfato (PBS, pH 7.4), suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) al 10% y 20%, , Tripsina al 0,05% (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Penicilina/estreptomicina 10,000UI/ml y 10,000µg/ml (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).



Figura 4 Insumos: a) Suero Fetal Bovino, b) Antibiótico Penicilina/Estreptomicina, c) Tripsina-EDTA. Todos de Gibco. Fuente Directa.

12.5 Autorización

El protocolo fue evaluado por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, UNAM. Los pacientes que participaron en el estudio autorizaron previo consentimiento informado (Anexo 1 y 2), la donación del tejido óseo de la tuberosidad del maxilar tras haber realizado odontectomías quirúrgicas de terceros molares superiores.

12.6 Implicaciones Éticas

El proceso de obtención de las muestras se llevó a cabo previo el consentimiento informado aprobado por la Comisión de Bioética y Seguridad de la ENES Unidad León, entregado a cada paciente previo a cada intervención en el que se explicaron de manera clara, breve y concisa los propósitos de la investigación.

Dicho consentimiento se realizó en concordancia con la versión revisada de la declaración de Helsinki (2008) y en estricto apego a las Leyes y reglamentos vigentes en nuestro país promulgados en el Reglamento de la Ley general de salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres humanos (1984) y La ley general de salud en materia de investigación para la salud (1984).

Teniendo como ejes rectores el respeto a cada individuo que desee participar en el proyecto así como la protección a la integridad física y psicológica de los

pacientes, la confidencialidad de los datos proporcionados y el uso adecuado de las muestras obtenidas para fines de investigación y docencia.

De acuerdo al reglamento de la ley general de salud y al Título Segundo: De los aspectos éticos de la Investigación en Seres Humanos, Artículo 13, en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar; para esta investigación prevalecerá lo antes mencionado de los pacientes que aceptaron donar sus dientes y tejidos orales. El Artículo 16: En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice. Artículo 17: Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Categoría II: II. Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva; colección de excretas y secreciones externas, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, entre otros.

Para esta investigación, se basó en los aspectos bioéticos antes mencionados ya que la investigación se clasifica dentro de un riesgo mínimo para el paciente.

13 Desarrollo de la metodología

13.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron 10 muestras de pacientes de 18 a 30 años de edad, realizadas en la clínica de cirugía bucal de la ENES Unidad León. Estas muestras se obtuvieron de la tuberosidad del maxilar superior después de las odontectomías de terceros molares superiores, realizando osteotomía con fresa quirúrgica 702 L y se tomó la muestra con pinzas Kelly, para su posterior colocación en el medio de transporte con PBS adicionado con el 1% de Penicilina/estreptomicina 10,000UI/ml y 10,000µg/ml.

13.2 Almacenamiento y tratamiento de las muestras.

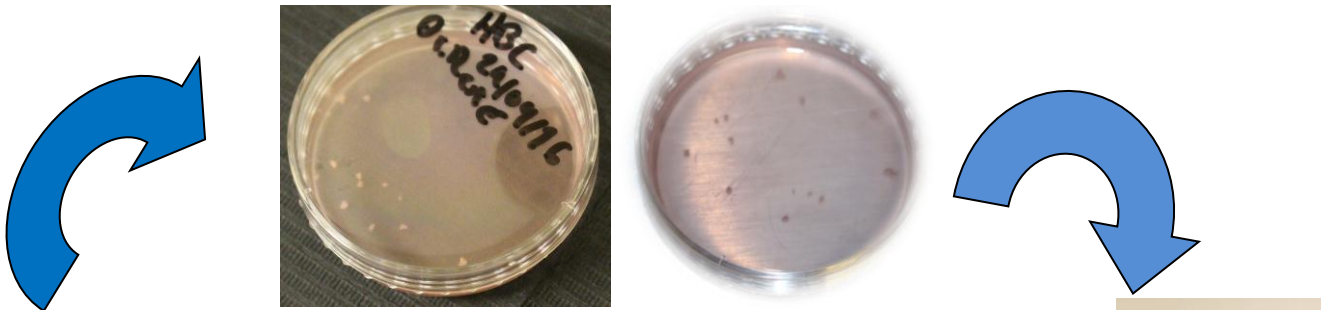
Las muestras depositadas en el medio de transporte se llevaron al Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria; Área de Nanoestructuras y Biomateriales con el menor retardo posible, preferiblemente con una hora como máximo posterior a la obtención de la muestra; se realizó un triple lavado en PBS con el fin de eliminar restos de células hematopoyéticas y células adherentes de tejido blando, hasta observar la apariencia blanquecina de la muestra.

13.3 Cultivo Primario

Las muestras se procesaron por dos métodos: (i) digestión o disgregación enzimática (n=5) y (ii) explantes (n=5). Para la técnica de (i) disgregación enzimática se realizaron explantes de hueso esponjoso, separando el hueso trabecular del cortical, de 1x1 mm , aproximadamente, y se depositaron en tubos falcon de 15 ml a los cuales se les agregó 1 ml de tripsina al 0.05% y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 60 minutos con agitación en Vortex (micro-centrifuge II MC-110, The Griffin Group INC, Sylvania Ohio, EUA) cada 20 minutos durante 1 min. La técnica (ii) explantes consistió en colocar las muestras en una caja Petri estéril (Thermo ScientificRochester,NY,EUA) de 60x15mm, donde se realizaron explantes de 1x1 mm, aproximadamente, con una hoja de bisturí nº 20. Para ambas técnicas, las muestras se inocularon en medio de cultivo α -MEM suplementado con 20% de SFB, sin inactivación por calor, antibiótico al 2% +1% de Glutamax (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) y se incubaron a 37°C con el 5% de CO₂ y en atmósfera

húmeda del 95%. El plato se dejó inalterado durante 7 días, posterior a este periodo se realizó la visualización de la migración de células adherentes sobre la caja de Petri y se procedió a reemplazar el medio inicial por un volumen igual de medio fresco, prestando especial cuidado en no desalojar los explantes. Tras la semana inicial y el primer cambio del medio de cultivo éste fue reemplazado dos veces por semana. Cuando las células proliferaron en la totalidad de la superficie de la placa, de aproximadamente el 80%, se consideró que ya estaba formada la monocapa de células (Diagrama 1).

Diagrama 1 Secuencia de la Técnica por disgregación enzimática.



Figuras 5 y 6 Explantes óseos. Fuente Directa

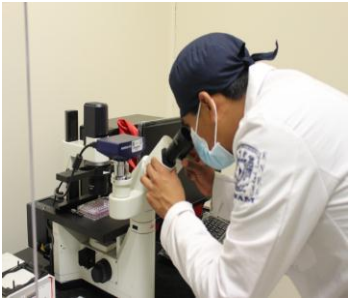


Figura 10 Análisis Microscópico . Fuente directa

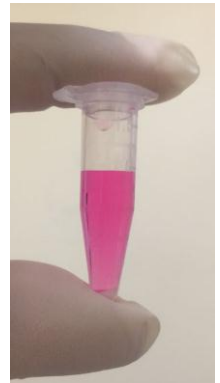


Figura 7 Adición de tripsina Fuente Directa



Figura 9 Incubación durante 7-14 días. Fuente Directa



Figura 8 Inoculación en platos de 6mm. Fuente Directa.

13.4 Subcultivo celular

Para evitar la muerte celular por sobrepoblación, fue necesario realizar subcultivos o pasajes celulares para lo cual se removieron todos los explantes con la bomba de vacío (**Figura 11**), se realizó triple lavado con PBS y se añadió 0.5ml de Trpsina- EDTA (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) y se realizaron desplazamientos manuales durante 20 segundos para asegurar que toda la superficie del plato fuera expuesta a la solución y con ello asegurar un mejor desprendimiento celular, se llevó a la incubadora por un lapso de 5 minutos a 37° C (**Figura 12**).

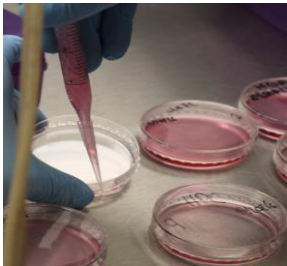


Figura 11 Remoción de explantes con bomba de vacío. Fuente directa.



Figura 12 Incubar con tripsina- EDTA a 37°C por 5 minutos. Fuente directa.

Se removieron los platos de la incubadora para observar el desprendimiento bajo el microscopio, se pudo observar la presencia redondeada y altamente refractante de los cuerpos celulares flotando en la solución de Tripsina-EDTA (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA).

Dependiendo de la confluencia celular se determinó la viabilidad de realizar subcultivos en relación 1:3, para lo cual se realizó un pipeteado con la finalidad de conseguir una resuspensión y arrastre de la mayor cantidad de células (**Figura 13**) para ser depositadas en los platos estériles nuevos, donde fueron inoculadas en razones de 1ml ó 0.500ml en función de los platos a subcultivar (**Figura 14**), a los cuales se les añadió 6-10 ml de medio de cultivo (**Figura 15**). Los platos fueron colocados de nuevo en la incubadora bajo las mismas condiciones iniciales que los cultivos primarios.

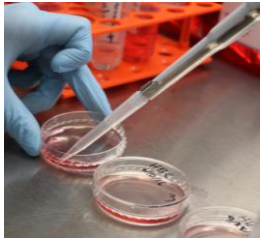


Figura 13 Tomar 1ml de células. Fuente directa.

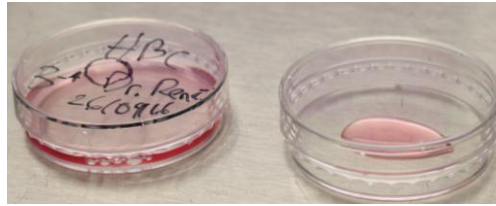


Figura 14 Inoculación. Fuente directa.

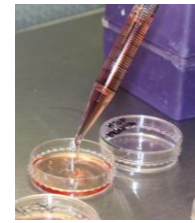


Figura 15 Añadir medio. Fuente directa

13.5 Recuento celular de la proliferación exponencial

Se utilizó como método de recuento celular la cámara de Neubauer (**Figura 16**) con el objetivo de 10 aumentos, que efectúa el recuento de las células en un área de 1mm^2 definida por las triples líneas paralelas de la cámara. Se utilizaron medios de cultivo DMEM o α -MEM adicionados con el 10% de SFB, 2% de antibiótico y 1% de Glutamax. El número de células por mililitro de suspensión permitió calcular el número de células totales en un rango de tiempo de las 0-96 horas de dos muestras de un total de tres experimentos independiente (**Figura 17**).

También se realizó ensayo MTT (Sigma, Basilea, Suiza) para lo cual se preparó con 24 horas de antelación conservándola a 4°C . Se realizó un desprendimiento de las células con Tripsina-EDTa y ajustamos la concentración a 1×10^5 células/ml. Se inocularon 1ml en placas de 24 pocillos para realizar lecturas a las 72 y 96 horas. Después se retiró el medio, se lavó con PBS, se añadieron 100 microlitros de MTT a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37°C . Se retiró el excedente y se añadió DMSO en cada pocillo. Se visualizó al microscopio la formación de cristales previamente formados. El líquido contenido en los pocillos pasó a un color morado, en función de la densidad celular. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 570nm (Thermo Sientific®, Multiscank Go, Finlandia) con el programa XFluor basado en Microsoft Excel®. La absorbancia de cada pocillo es directamente proporcional al número de células viables.



Figura 16 Hematocitómetro. Fuente directa.



Figura 17 Evaluación DMEM vs α -MEM. Fuente directa.

13.6 Criopreservación de las células

Las células fueron lavadas tres veces con solución buffer de fosfatos (PBS, 5 ml) y se agregó 1 ml de tripsina 0.05% de tripsina-0.025% EDTA y se incubaron durante 5 min a 37°, se comprobó el desprendimiento con microscopio observando a las células circulando libremente en la caja de cultivo. Se retiró la caja de la incubadora y se colocó sobre hielo. Se agregó 1 ml de DMEM+10% SFB frío (4°C), se pipeteó y se resuspendió el medio. El contenido celular con el medio se transportó a tubos Eppendorf de 1.5 ml se agregó 1 ml de DMEM que contenga los osteoblastos en el tubo. Las células fueron centrifugadas durante 5 min a 2200 rpm a 4°C (**Figuras 18 y 19**) y se retiró el medio por decantación o aspiración con bomba de vacío (**Figura 20**). Se agregó 1 ml solución criopreservadora DMEM+10% de SFB +15% Dimetil sulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) y se resuspendió usando la micropipeta (**Figuras 21 y 22**). Los tubos fueron almacenados en hielo durante 30 min a 4°C, 1 hora a -20°C y fueron almacenados a -80°C en el ultracongelador para su disposición en stock (**Figura 23**).



Figura 18 Centrifugadora. Fuente directa



Figura 19 Aspecto de los tubos colocados en la centrifugadora. Fuente directa.



Figura 20 Remoción del medio posterior a la centrifugación. Fuente directa.



Figura 21 Dimetilsulfoxido. Fuente directa.



Figura 22 Resuspensión del botón celular. Fuente directa.



Figura 23 Criotubos. Fuente directa.

14 Análisis y representación de datos

Se calculó la media, desviación estándar y porcentajes. Los datos obtenidos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, con una prueba de *t*-student y *t*-student pareada para comparar los tiempos de incubación de la proliferación celular. La significancia estadística fue fijada con un valor de 0,05 y un coeficiente de confiabilidad del 95%. Los datos fueron representados con graficas de polígono de frecuencias.

CAPÍTULO 4

15 Resultados

Aislamiento y crecimiento celular. Las células obtenidas a partir de los explantes procedentes de osteotomías realizadas durante la odontectomía quirúrgica de terceros molares, mostraron un crecimiento en general rápido con el método utilizado sin influir el diámetro del plato de Petri.

Con microscopía óptica, se observó que las células emigraron desde la superficie ósea de los explantes, observándose a los 7 días (**Figura 24a**), células dispersas adheridas al fondo del plato mostrando una morfología característica de osteoblasto, con núcleo central ovalado y con múltiples proyecciones citoplásmicas en toda la superficie de la célula. (**Figura 24b**).

A los 15 días, se observaron conexiones a través de las prolongaciones citoplásmicas de la superficie celular así como una disposición paralela de las células, lo que fue indicativo de los múltiples contactos intercelulares existentes

A los 21 días se observó una alta confluencia celular y un cambio en la morfología de dichas células, adquiriendo una forma más redondeada y con disminución de las proyecciones citoplásmicas, debido a la confluencia observada del 80-90% del plato. (**Figura 24c**) En este periodo se pudo observar también una tendencia a mantener las conexiones entre ellas y seguir una orientación en una misma dirección (**Figura 24d**).

Se observó también un mejor comportamiento y crecimiento celular al utilizar el SFB sin previa inactivación por calor; así mismo la técnica de disgregación enzimática con Tripsina-EDTA mostró mejores resultados en relación a la técnica de explantes para el establecimiento de los cultivos primarios utilizando el mismo medio para ambos casos (α -MEM); logrando éxito en 4 de las 5 muestras procesadas mediante la técnica de disgregación enzimática contrastando notablemente con los 2 éxitos de las 5 procesadas mediante explantes.

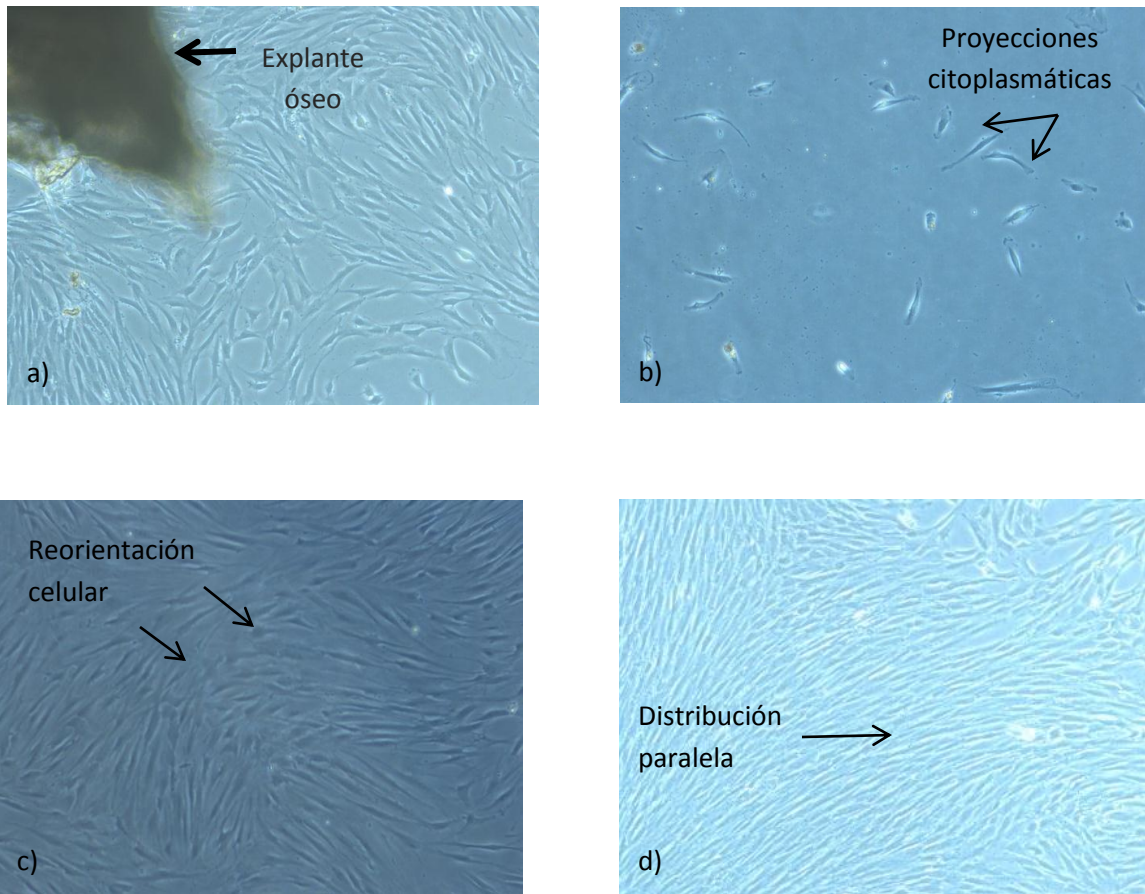


Figura 24 Análisis microscópico de cultivos celulares de células osteoblásticas humanas. a) Migración celular a partir de los explantes a los 7 días. b) formación de colonias aisladas a los 14 días. c y d) reorientación y aspecto celular a los 21 días.

Comparación de la proliferación celular según el medio y la técnica utilizada.

Los datos de proliferación celular mostraron una distribución normal y un crecimiento exponencial con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las células cultivadas con medio DMEM comparadas con α -MEM a las 72 y 96 horas con una $p = 0.04$ y $p = 0.01$ respectivamente.

Los osteoblastos humanos aislados en procedimientos quirúrgicos de terceros molares mostraron mayor proliferación en función del medio utilizado, siendo el medio DMEM el que muestra mayor proliferación celular comparado con el medio α -MEM según los valores del crecimiento exponencial mediante ensayo MTT donde se obtuvo un promedio de 0.65 y 0.87 absorbancia (D.O) a las 72h y 0.95, 1.22 absorbancia (D.O) a las 96 h (**Figura 25a**).

La diferencia entre el número de células de cultivos con α -MEM (16×10^4 células/ml) y DMEM (18×10^4 células/ml) fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$ con la prueba t- student y t-student pareada) (**Figura 25b**), teniendo valores de p de 0.0000256 y 0.0050177 para alfa y 0.0000112, 0.00439483 para DMEM, para los conteos 2 y 3 respectivamente.

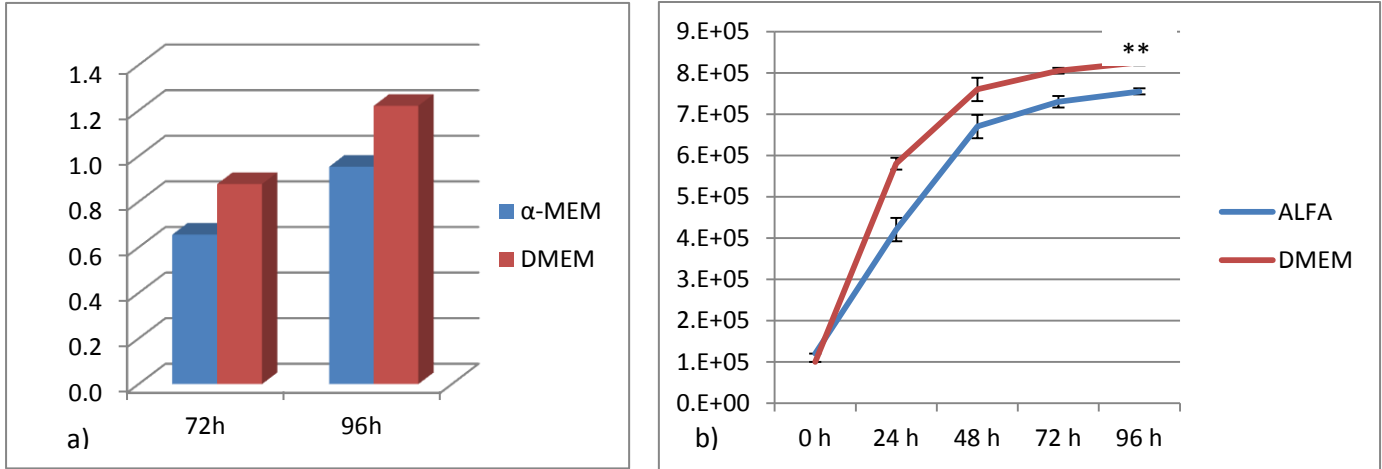


Figura 25 a) Prueba MTT para evaluar la absorbancia media a las 72 y 96 hrs. b) Crecimiento exponencial en conteo con hematocitómetro en medios α - MEM y DMEM donde se observa la diferencia significativa entre ambos medios según las pruebas t-student y t- student pareada.

Adhesión celular focal. Es evidente que los explantes óseos deben permanecer inalterados al menos durante 7 días para lograr el establecimiento de los cultivos, de lo contrario al desplazar el plato repetidamente se impide la adhesión celular al fondo el plato.

Al realizar los subcultivos celulares (**Figura 26**) se observó una adecuada adhesión al fondo del plato a las 24 horas del monitoreo, lo cual evidenció la respuesta favorable a las condiciones nutricionales implementadas, logrando una proliferación exponencial en un lapso de 2-3 días.

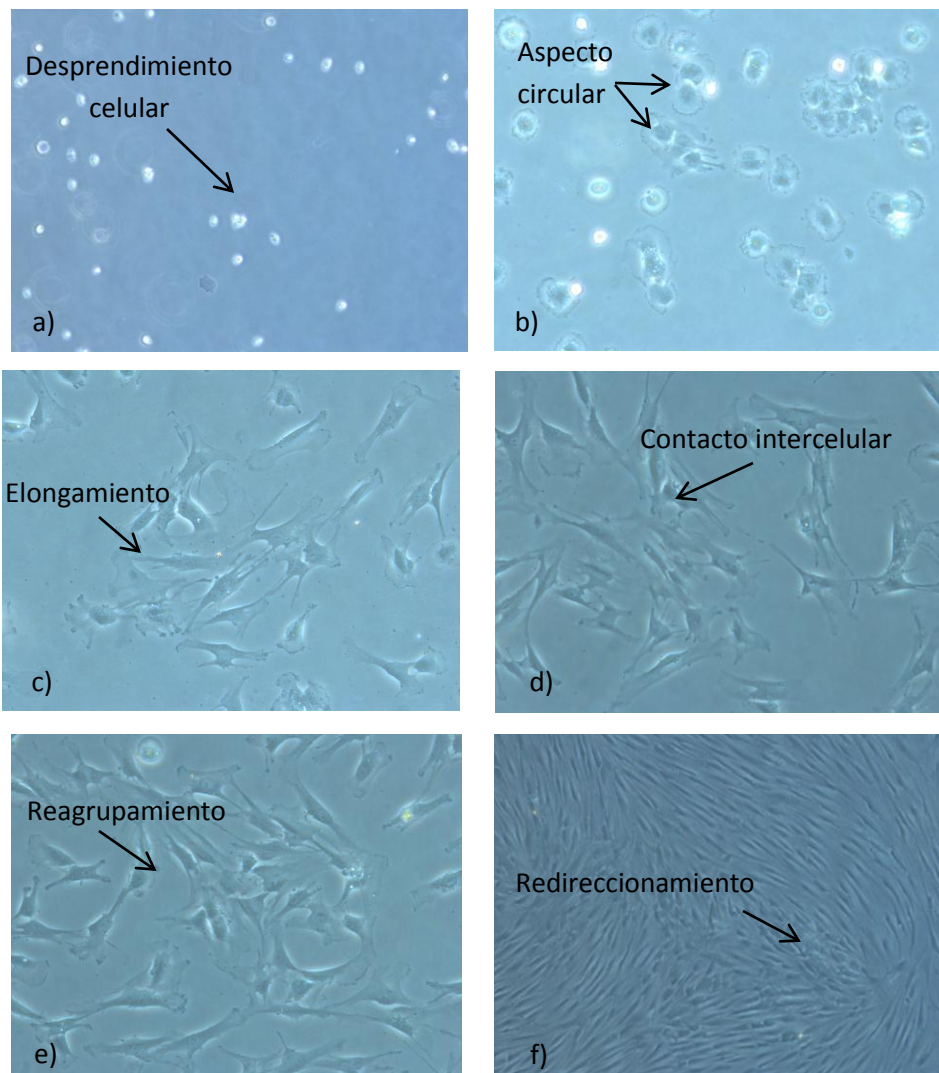


Figura 26 Monitoreo de la adhesión celular focal tras un subcultivo. a) Tripsinización (Nótese el aspecto refractante y circular de las células), b) aspecto a las 4 horas), c) 6 horas, d) 8 horas⁵⁰, e) 12 horas y f) 24 horas.

16 Discusión

En el presente estudio se evaluó la posibilidad de aislar células osteoblásticas humanas como herramienta para la investigación *in vitro* sobre el comportamiento biológico de dicha línea celular.^(15,37) Sin embargo, el cultivo de estas células óseas no es fácil. Muchos estudios han buscado establecer las condiciones óptimas para el establecimiento y mantenimiento *in vitro* de las mismas.⁽³⁸⁾ Astrid y col. señalan que el uso de colagenasa tipo II proporciona un excelente método para el aislamiento y establecimiento de los cultivos primarios, en nuestro trabajo utilizamos solamente Tripsina- EDTA observando buenos resultados.⁽³¹⁾ Gartland y col., Rosa y Beloti reportaron resultados favorables utilizando el SFB inactivándolo por calor; de acuerdo a nuestras observaciones utilizar el SFB sin inactivación por calor muestra mejores resultados.^(30,39) En tanto Dillon y col. señalan que la agitación con vortex en solución PBS permite el desprendimiento de las células desde los explantes, en el presente trabajo combinamos la agitación con vortex de los explantes suspendidos en solución de Tripsina-EDTA.⁽²⁴⁾ En concordancia con estudios previos, en general, la migración de las células desde los explantes ocurre aproximadamente de los 7-14 días, lo cual fue observado en el presente trabajo.^(23,26) Por otro lado, al comparar dos medios de cultivo (DMEM y α -MEM), para células óseas intraorales mediante ensayo MTT, evaluando la proliferación celular exponencial el conteo de las células aisladas y cultivadas en DMEM a la 72 y 96 horas es significativamente mayor que las cultivadas en α -MEM, este hecho no concuerda con estudios previos en los que se señala que no existe diferencia significativa entre ambos; por lo que se sugiere continuar con la evaluación de la viabilidad y proliferación celular según el tiempo y el número de pasajes celulares.^(38,40)

Indudablemente, resultaría de particular interés realizar el monitoreo de los cultivos logrados y el número de pasajes celulares en función de la edad de los pacientes, lo cual fue una limitante en nuestro estudio, ya que solo se consideró el rango de 18-30 años sin considerar cada caso en particular en la relación muestra-cultivo logrado.

También es importante resaltar el hecho de que una investigación futura debe considerar el hecho de evaluar ambos medios no solo para la proliferación celular, si no para el establecimiento de los cultivos primarios.

Es importante que en futuras investigaciones se realice la caracterización de dichos cultivos celulares mediante los métodos más específicos disponibles, siendo los sugeridos para su análisis: tinción con rojo de alizarina, análisis de la actividad de fosfatasa alcalina o análisis de von Kossa.

Lo anterior con la finalidad de evaluar la capacidad de mineralización y determinar la viabilidad de ser utilizadas en formulaciones para la regeneración ósea o bien su inclusión en el campo de los biomateriales.

17 Conclusiones

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que es posible realizar el aislamiento y cultivo primario de células osteoblásticas en la ENES, León.

Al señalar las diferencias existentes en la viabilidad y proliferación celular entre los medios α -MEM y DMEM para las células osteoblásticas aisladas en odontectomías de terceros molares, se evidencia que el medio DMEM muestra mejores resultados.

La confluencia celular en todos los cultivos logrados oscilo entre el 80-95% de la totalidad del plato con un recuento de aproximadamente 18×10^4 células/ml.

La criopreservación celular y almacenamiento es viable en la ENES, UNAM, si se siguen los protocolos estandarizados, observando buenos resultados tras su descongelamiento.

Los datos obtenidos resultan de interés para futuras investigaciones en diversos campos como pruebas farmacéuticas, biomateriales y particularmente en la ingeniería tisular.

El constante cambio en los diversos campos del conocimiento implica una responsabilidad como profesionales de la salud no solo en el estricto sentido clínico, sino en áreas débiles en nuestro país como la investigación que generen y promuevan el desarrollo trans e interdisciplinario.

18 Bibliografía

1. Hayden RS, Glettig DL, Kaplan DL. Article in press. 2016.
2. Pérez-Sánchez MJ, Ramírez-Glendon E, Lledo-Gil M, Calvo-Guirado JL, Pérez-Sánchez C. Biomaterials for bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(3):1–6.
3. Seo D. Modelos de experimentación para estudio. 2004;23(3):107–16.
4. Alvarez Barreto JF. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción Osseous Regeneration through Tissue Engineering: an introduction. *RET Rev Estud Transdiscipl*. 2009;1.
5. Endothelial H, Co-cultures O, Unger RE, Halstenberg S, Sartoris A, Kirkpatrick CJ. Chapter 15. 695(1):229–41.
6. Oliveira FA, Matos AA, Santesso MR, Tokuhara CK, Leite AL, Bagnato VS, et al. Journal of Photochemistry & Photobiology , B: Biology Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. *JPB [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;163:14–21.
7. Peres JA, Lamano T. Strategies for stimulation of new bone formation: A critical review. *Braz Dent J*. 2011;22(6):443–8.
8. Ricardo JH. Cicatrización y regeneración ósea de los maxilares después de una quistectomía : reporte de un caso y revisión de la literatura Healing and Bone Regeneration of the Jaws Cystectomy Post: Case Report and Literature Review. 2011;30(65):71–8.
9. Romagnoli C, Zonefrati R, Galli G, Puppi D, Piroso A, Chiellini F, et al. In Vitro Behavior of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Poly(ϵ -caprolactone) Film for Bone Tissue Engineering Applications. *Biomed Res Int [Internet]*. 2015;2015:323571.
10. Meijden K, Essen HW, Bloemers FW, Schulten EAJM, Lips P, Bravenboer N. Regulation of CYP27B1 mRNA Expression in Primary Human Osteoblasts. *Calcif Tissue Int [Internet]*. Springer US; 2016;99(2):164–73.
11. Prause M, Seeliger C, Unger M, Griensven M Van, Haug AT. Pantoprazole increases cell viability and function of primary human osteoblasts in vitro. *Injury [Internet]*. Elsevier Ltd; 2014;45(8):1156–64.
12. Geneser F. Histología sobre bases biomoleculares. In: tercera ed. 2012.
13. Katari RS, Peloso A, Orlando G. Tissue engineering. *Adv Surg [Internet]*. Elsevier Inc; 2014;48(1):137–54.
14. Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived

- from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(4):509–15.
15. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells : A comparison Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells. 2009;6470(August 2016).
 16. Declercq H, Van Den Vreken N, De Maeyer E, Verbeeck R, Schacht E, De Ridder L, et al. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: Comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials.* 2004;25(5):757–68.
 17. Kaul H, Ventikos Y. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(2):203–17.
 18. Maguire TJ, Yarmush ML. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine : History , Progress , and Challenges* Franc. 2011;
 19. Limb D. (i) Bone - the tissue we work with. *Orthop Trauma [Internet]. Elsevier Ltd;* 2015;29(4):223–7.
 20. Marieb EN, Hoehn K. *Anatomy and Physiology [Internet]. Clinical Engineering. Elsevier Ltd;* 2008. 1048 p.
 21. CarneiroJuan, Uchoa L. *Histología Básica, texto y atlas. 6a edición. Masson, editor. 2000.*
 22. Lynne C. *Células. Segunda. China: McGraw-Hill;* 2012.
 23. Meseguer Olmo L, Bernabeu Esclapez A, Clavel-Sainz M, Nolla J, Muñoz R-S, Ruano García L. Aislamiento y cultivo de células osteoblásticas: Interés para la investigación en cirugía ortopédica y traumatología. *Rev Esp Cir Osteoart.* 1994;29:235–40.
 24. Dillon JP, Waring-green VJ, Taylor AM, Wilson PJM, Birch M, Gartland A, et al. Chapter 1 Primary Human Osteoblast Cultures. 816:3–18.
 25. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med oral, Patol oral y cirugía bucal.* 2006;11(1):47–51.
 26. Walker JM. *Human Cell Culture Protocols. Life Sci [Internet].* 2009;531(1):588.
 27. Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, et al. Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. *Oral Sci Int [Internet]. Japanese Stomatological Society;* 2014;11(2):45–51.

28. Yoshida C, Yamaguchi S, Abe S, Harada K. Property of Human Bone Marrow Stromal Cells Derived From Bone Fragments Removed in Sagittal Split Ramus Osteotomy. *J Craniofac Surg* [Internet]. 2016;00(00):1.
29. Rodríguez-pardo VM, Fuentes-lacouture MF, Aristizabal-castellanos JA, Paul J, Hernandez V. Aislamiento y caracterización de células “ stem ” mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular Introducción. 2010;15:224–39.
30. Rosa AL, Beloti MM. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J*. 2005;16(3):225–30.
31. Bakker AD, Klein-nulend J. *Bone Research Protocols*. 2012;816:643.
32. Taylor SEB, Shah M, Orriss IR. Generation of rodent and human osteoblasts. *Bonekey Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;3(November):1–10.
33. van Griensven M, Zeichen J, Tschernig T, Seekamp a, Pape HC. A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2002;54:25–9.
34. Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo ROC. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;83:363–82.
35. Montjovent M, Burri N, Mark S, Federici E, Scaletta C, Zambelli P, et al. Fetal bone cells for tissue engineering. 2004;35:1323–33.
36. Zárate-kalfópulos B, Reyes-sánchez A. *Artemisa*. 2006;(3):217–22.
37. Bayliss L. Normal bone physiology , remodelling and its hormonal regulation. *Surgery* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;30(2):47–53.
38. Orriss IR, Hajjawi MOR, Huesa C, Macrae VE, Arnett TR. Optimisation of the differing conditions required for bone formation in vitro by primary osteoblasts from mice and rats. 2014;1201–8.
39. Gartland, Alison, Rumney R. Isolation and Culture of Human Osteoblasts. *Methods Mol Biol*. 2012;806(Springer):337–46.
40. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated , over-passaged cell lines: how much more data do we need 2007;43(5).

ANEXOS

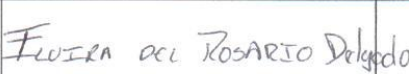

Anexo I. Consentimiento informado

Consentimiento Informado			
Título	“Estandarización de un método para el cultivo de células osteoblásticas”		
Investigador Principal	Alumnos: Méndez Vázquez Alejandra Gisela, Paulino González Ángel David		
Co-Investigador	Dra. Vilar Pineda Gabriela, Dr. García Contreras René		
Lugar	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36969, León, Gto.		
Introducción	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente explicación sobre el estudio de investigación propuesto. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio.		
Propósito	El propósito de esta investigación es los tejidos que le serán extraídos puedan ser donados a uno de los proyectos de investigación de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León		
Población de los participantes	<p>Para participar en esta investigación usted tendrá que:</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: middle;">Paciente sano</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. </td> </tr> </table> <p>No será permitido su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tiene alguna enfermedad de tejido óseo. - Pacientes que utilicen inmunomodulares, esteroides, o bifosfonatos. - Tiene cáncer. - Alérgicos a la Penicilina - Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada. - Si tiene alguna enfermedad sistémica diagnosticada. - Está embarazada o se encuentra bajo lactancia. <p>Si usted califica, usted será uno de los participantes que colaborará en este estudio.</p>	Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento.
Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. 		
Procedimientos (Aproximadamente 20 minutos)	<p>A usted se le pedirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leer y firmar este formulario de Informe de Consentimiento. • Preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio. • Preguntas acerca de su estado actual de salud. • Participar en la toma de muestra de tejido óseo durante el tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores, se administrará anestesia local al paciente, se realizará tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores donde se retirará el tejido óseo como parte del procedimiento y se conservara en Phosphate-buffered saline (PBS). 		

Cultivo de células osteoblásticas ENES-UNAM Unidad León

Riesgos e Inconformidades	Se le informa que la toma de muestra de tejido óseo que se retira durante el tratamiento de odontectomías de terceros molares es considerada una técnica invasiva con riesgo mínimo.
Costos	No hay costo por la cual usted participe en este estudio, otro que su tiempo.
Confidencialidad	El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basado en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1999. Donde solo se accederá al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética, las autoridades sanitarias.
Participación Voluntaria	Su decisión de participar en este estudio es voluntaria.
Consentimiento	<ul style="list-style-type: none">▪ <i>He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas las mismas han sido respondidas satisfactoriamente. Yo voluntariamente acepto participar en este estudio.</i>
Firma del Paciente	

Anexo II: Consentimiento informado (Ejemplo Firmado)

Consentimiento Informado			
Título	"Estandarización de un método para el cultivo de células osteoblásticas para la neoformación ósea: estudio <i>in vitro</i> "		
Investigador Principal	Mtra. Vilar Pineda Gabriela, Dr. García Contreras René		
Co-Investigador	Alumnos: Méndez Vázquez Alejandra Gisela, Paulino González Ángel David		
Lugar	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36969, León, Gto.		
Introducción	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente explicación sobre el estudio de investigación propuesto. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio.		
Propósito	El propósito de esta investigación es los tejidos que le serán extraídos puedan ser donados a uno de los proyectos de investigación de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León		
Población de los participantes	<p>Para participar en esta investigación usted tendrá que:</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 20%;">Paciente sano</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. </td> </tr> </table> <p>No será permitido su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tiene alguna enfermedad de tejido óseo. - Pacientes que utilicen inmunomodulares, esteroides, o bifosfonatos. - Tiene cáncer. - Alérgicos a la Penicilina - Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada. - Si tiene alguna enfermedad sistémica diagnosticada. - Está embarazada o se encuentra bajo lactancia. <p>Si usted califica, usted será uno de los participantes que colaborará en este estudio.</p>	Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento.
Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> - Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM. - No infectados - Sin enfermedades sistémicas - Sin toxicomanías - Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica. - Firmar este Informe de Consentimiento. 		
Procedimientos (Aproximadamente 20 minutos)	<p>A usted se le pedirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leer y firmar este formulario de Informe de Consentimiento. • Preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio. • Preguntas acerca de su estado actual de salud. • Participar en la toma de muestra de tejido óseo durante el tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores, se administrará anestesia local al paciente, se realizará tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares superiores donde se retirará el tejido óseo como parte del procedimiento y se conservará en Phosphate-buffered saline (PBS). 		
Riesgos e Inconformidades	Se le informa que la toma de muestra de tejido óseo se realiza durante el tratamiento de odontectomías de terceros molares, por lo cual los riesgos son los mismos que en el procedimiento quirúrgico ya descrito en el consentimiento informado clínico.		
Costos	No hay costo por la cual usted participe en este estudio, otro que su tiempo.		
Confidencialidad	El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basado en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1999. Donde solo se accederá al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética, las autoridades sanitarias.		
Participación Voluntaria	Su decisión de participar en este estudio es voluntaria.		
Consentimiento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas las mismas han sido respondidas satisfactoriamente. Yo voluntariamente acepto participar en este estudio. 		
Firma del Participante	 		

Anexo III: Constancia de participación oral en el Pre-congreso Expo Aric-Dental

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Escuela Nacional de Estudios Superiores
Unidad León

Otorga la presente

Constancia

A: Paulino González Angel David

Coautores: Mendez Vázquez Alejandra Gisela
Gabriela Vilar Pineda
Rene García Contreras

Por su participación académica con la presentación oral titulada:

Estandarización de un método para el cultivo de células osteoblásticas

en el:

**PRE-CONGRESO ENES UNAM Unidad León,
en el marco de Expo Aric Dental 2016**

12 de octubre de 2016
Guadalajara, Jalisco.

"Por mi raza hablará el espíritu"


Mtro. Javier de la Fuente Hernández
Director


**EDUCACIÓN CONTINUA
U N A M**


Mtra. Gabriela Vilar Pineda
Jefe de División de Educación Continua e
Intercambio Académico

Prohibido alterar este documento. © División de Educación Continua e Intercambio Académico, ENES-UNAM.

Pre-congreso EXPO Aric 2016 ENES UNAM, Unidad León
ID: ENESUNCaOd015
P-101

www.enes.unam.mx