

Elaboración de mallas de colágeno como alternativa de soporte para la siembra de fibroblastos

Resumen

La ingeniería tisular ha permitido crear sustitutos de tejido en el tratamiento de recesiones gingivales, aislando células del conectivo, que pueden ser utilizados como injertos autólogos.

Objetivo: desarrollar membranas de colágeno de origen animal, para ser utilizadas como soporte de crecimiento en la obtención de tejido conectivo gingival.

Metodología: tendones de cola de rata se procesaron para obtener colágeno refinado que se liofilizó obteniendo mallas donde se cultivaron fibroblastos gingivales.

Resultados: se obtuvieron dos mallas de colágeno de color blanco ligeramente amarillento, aspecto poroso y consistencia esponjosa, microscópicamente y por técnicas de inmunofluorescencia se observó un entramado de haces de fibras de colágeno distribuidas irregularmente y de manera entrelazada; asimismo, el reporte histológico de la malla sembrada describe extensas áreas de colagenización, con células fusiformes compatibles con fibroblastos.

Conclusión: es posible desarrollar mallas de colágeno de origen animal, viables como soporte para el cultivo de fibroblastos.

Palabras clave: Ingeniería tisular. Cultivo de tejido. Malla de colágeno.

Summary

Substitute for gingival tissue are being created thanks to the tissue engineering as treatment for gingival recessions, by the isolation of gingival connective cells that could be used as autologous graft.

Purpose: of this study was to develop collagen scaffold from animal origin which can subsequently be used as growth matrix to obtain gingival connective tissue.

Methodology: Rat tail tendons were processed to obtain refined collagen which was lyophilized obtaining scaffold where gingival fibroblasts were cultured.

Results: Two slightly yellowish white collagen scaffold were obtained, with porous and spongy appearance. A reticulum consisting of bundles of collagen fibers were observed by microscopic and immunofluorescence techniques showing an irregular distribution.

Conclusions: Collagen scaffolds can be constructed from animal origin, suitable as a support for fibroblast cell culture.

Key words: Tissue engineering. Tissue grafting. Collagen scaffold.

Introducción

Las recesiones gingivales son alteraciones muy comunes en la práctica clínica periodontal, los diferentes colgajos e injertos como su tratamiento convencional presentan limi-

taciones que han estimulado la búsqueda de alternativas efectivas que eviten principalmente el rechazo inmunológico, las recientes investigaciones se enfocan en crear sustitutos de tejido gingival (aloinjertos), valiéndose para ello de los avances en la biología y la ingeniería de tejidos¹⁻³. Uno de los mayores logros, hasta ahora, ha sido el desarrollo de tejidos semejantes a la piel, se están generando aproximaciones similares en el reemplazo de dentina, pulpa dental, glándulas salivales, mucosa oral y encía; específicamente en periodoncia, una de las alternativas más utilizadas es la matriz dérmica acelular (Alloderm)⁴, pero en vista de su elevado costo, recientes investigaciones plantean el cultivo de fibroblastos orales y su siembra en membranas o soportes, para ser utilizado como injerto en el tratamiento de recesiones gingivales^{5,6}.

A pesar de la gran variedad de mallas de soportes (*scaffolds*) disponibles para el cultivo celular, las investigaciones actuales proponen el uso de materiales de origen natural³, en relación con el cultivo de fibroblastos, se ha utilizado el colágeno como soporte debido a su biocompatibilidad con dichas células, además de su fácil obtención y procesamiento^{1,5}. Es por ello que el objetivo de la presente investigación es desarrollar membranas de colágeno de origen animal para ser utilizadas como soporte ó matriz de crecimiento celular en la obtención de un análogo de tejido conectivo gingival.

Materiales y métodos

Obtención de las mallas de colágeno

Se adaptó el protocolo empleado por Bell, *et al.* (1978)⁷. Se utilizaron 5 colas de rata Wistar, obtenidas en el momento previo al sacrificio, siguiendo las normas de bioéticas establecidas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes, que se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

Las colas fueron descongeladas en etanol al 70% por 20 minutos, empleando un bisturí N° 12, se disecó la piel, se separaron los tendones (Figuras 1a y 1b) y se cortaron en pequeños fragmentos que fueron colocados en un envase plástico con 150 ml de ácido acético, diluido en proporción 1:1000 y se almacenó a 4 °C por 48 horas, tiempo en el

Erica González¹
Karla Padrón²
Lorena Dávila³
Anajulia González⁴
Lisbeth Sosa⁵
María Palacios⁶
Nelly Velasco⁷
Daniela Olávez⁸
Eduvigis Solórzano⁹

¹Odontólogo

²Odontólogo. Grupo de investigaciones Biopatológica/ Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular

³Periodoncista, Cátedra de Periodoncia

⁴Master en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular

⁵Odontólogo.

Cátedra de Periodoncia

⁶Odontólogo. Grupo de investigaciones Biopatológica/

Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular

⁷Master en Patología Bucal

Cátedra de Periodoncia.

Facultad de Odontología

⁸Master en Servicios

Asistenciales en Salud

Cátedra de Estomatología

Facultad de Odontología

⁹Doctor en Antropología Biológica,

Grupo de investigaciones

Biopatológica/ Laboratorio

Integrado de Biología Celular

y Molecular

Universidad de Los Andes

Mérida-Venezuela

Correspondencia:

Eduvigis Solórzano

Edificio del Rectorado

Calle 24, entre Avenidas 2 y 3

Facultad de Odontología

Universidad de Los Andes

Mérida (5101) Venezuela

E-mail: eduvigis@ula.ve

cual los fragmentos de tendón se hidrataron totalmente, obteniéndose una solución de consistencia viscosa que posteriormente se separó en 2 tubos de 50 ml estériles, que se centrifugaron a 10.000 rpm, por 2 horas para obtener

un sobrenadante, que fue filtrado y almacenado por 24 horas a 4 °C, como solución de colágeno crudo (Figura 2a).

El colágeno crudo se mezcló con NaOH 0,1 M en una proporción de 6:1 para neutralizar el ácido acético y se sometió a agitación por 5 minutos en un agitador magnético, luego se centrifugó a 1.500 rpm por 10 minutos. Durante este proceso, el colágeno precipitó, y se procedió a descartar el sobrenadante. Luego se agregaron 150 ml de ácido acético (1:1000) para resolubilizar el colágeno y la solución de colágeno refinado obtenida se almacenó en un envase de vidrio estéril a 4 °C.

La solución resultante fue liofilizada en un *Liofilizador "Dry Sistem / Lyph Lock 4.5"*, obteniéndose a los 3 días dos mallas de colágeno que se evaluaron tanto macroscópica como microscópicamente con un Microscopio de Fase Invertida (MFI), se coloreó con naranja de acridina para el análisis con inmunofluorescencia (MIF).

Siembra

Las mallas de colágeno se sometieron a esterilización de forma individual, una se autoclavó a 120 °C por 1 hora y la otra se irradió con luz ultravioleta (UV-250 nm) por 1 hora. En la malla sometida a luz UV, se sembró un cultivo de fibroblastos que se incubó por 3 semanas en atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 35°C, finalmente se tomó un fragmento de 1mm² de la malla sembrada, se fijó en formol al 10%, procesado con la técnica histológica de rutina y coloreado con hematoxilina-eosina para su análisis histológico.

Resultados

Se obtuvieron dos mallas de colágeno de 5 cm² y 1 cm de grosor aproximadamente, que macroscópicamente presentaron color blanco, ligeramente amarillento, de aspecto poroso y consistencia esponjosa, con un evidente entramado de fibras (Figura 2b); característica corroborada en la evaluación microscópica en el MFI, donde se observó el entramado constituido por haces de fibras distribuidas irregularmente y de manera entrelazada (Figura 3a); permitiendo la formación de pequeños espacios (poros) entre ellos; asimismo, al análisis con inmunofluorescencia, se determinó la presencia de delgadas fibras agrupadas formando paquetes dispuestos irregularmente (Figura 3b). Finalmente, el reporte histológico de la malla sembrada describe extensas áreas de colagenización, con presencia de células fusiformes adosadas a las fibras colágenas compatibles con fibroblastos (Figuras 4a y 4b).

Discusión

En el presente estudio se utilizó colágeno obtenido a partir de colas de rata para la obtención de una malla de soporte para un cultivo celular, coincidiendo con lo reportado por otro estudio⁸, en el cual se emplearon tendones de colas de ratas, logrando obtener una malla de colágeno firme y de aspecto poroso.

Figura 1.
Disección de los tendones
Figura 1a: Remoción de piel
Figura 1b: Disección del tendón

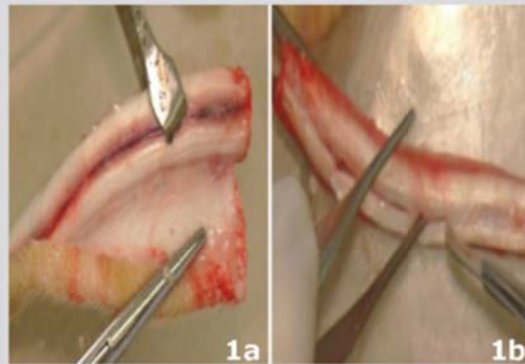


Figura 2.
Obtención del colágeno
Figura 2a: Solución viscosa por hidratación de los tendones
Figura 2b: Malla de colágeno posterior a la Liofilización

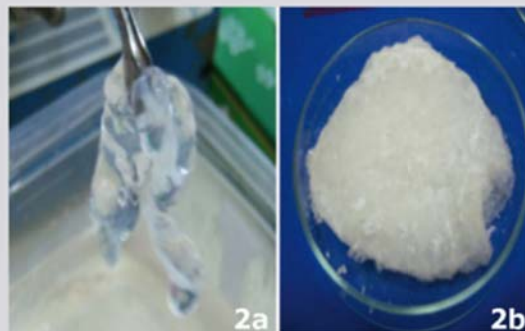


Figura 3.
Análisis Ultraestructural
Figura 3a: Microfotografía de un fragmento al (M.F.I)(40X)
Figura 3b: Microfotografía al Microscopio de fluorescencia (40X)

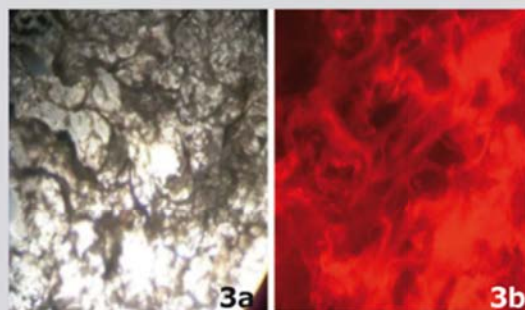
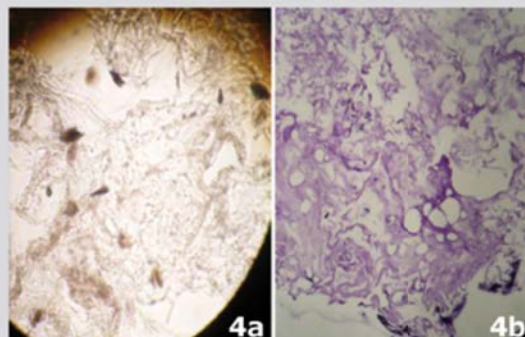


Figura 4.
Microfotografía en Fase Invertida
Figura 4a: Células adosadas a la malla luego de la siembra (40X)
Figura 4b: Preparado Histológico H/E de la malla de colágeno (40X)



En la literatura se describen varias técnicas de esterilización de las mallas de soporte^{1,6}. Así por ejemplo, Espinosa, Sosnik, Fontanilla⁸ liofilizaron las mallas por 16 horas, las esterilizaron con óxido de etileno. Para lograr una adecuada esterilización, intentamos adecuar el método descrito por Bello, *et al.*¹ y una de las mallas de colágeno fue autoclavada a 120 °C durante 30 minutos. Sin embargo, en nuestro caso, la malla perdió todas las características que la hacían apta como soporte para la siembra de fibroblastos, razón por la cual se decidió utilizar otro método de esterilización. En tal sentido, la segunda malla fue irradiada con luz ultravioleta (UV-250 nm) en una caja de esterilización completamente cerrada por 1 hora, al cabo de ese tiempo, la malla no modificó sus características macroscópicas que la hacen viable como *scaffold* e inmediatamente fueron sembrados los fibroblastos. Dado que en el proceso de cultivo no hubo crecimiento bacteriano y además se observó microscópicamente extensas áreas de colagenización, con presencia de células fusiformes adosadas a las fibras colágenas compatibles con fibroblastos, asumimos la esterilización con luz UV, como el método de esterilización más indicado.

En cuanto a las propiedades de las mallas de soporte, Santos⁹ refiere que un *scaffold* debe presentar una superficie adecuada para permitir el anclaje y adhesión celular, facilitando su proliferación y diferenciación, debe ser biocompatible y altamente porosa, éstas características fueron identificadas en la malla obtenida en este estudio, la cual está constituida por una red de poros uniformes e interconectados que facilitó la adhesión y el crecimiento del cultivo celular y coinciden con las reportadas por Espinosa *et al.*⁸ quienes lograron obtener mallas de colágeno firmes, porosas, blancas y suaves al tacto. Por otra parte, según Lizarbe¹⁰ las propiedades biomecánicas mínimas de un *scaffold* deben ser: una elevada fuerza de tensión, extensibilidad, retención de agua y la facilidad de manipulación, características que también fueron constatadas en la malla obtenida en este estudio. Sin embargo, estos resultados se contraponen con los obtenidos por González, *et al.*⁵ quienes utilizaron una matriz de colágeno en gel que demostró ser de difícil manejo.

Conclusiones

Luego del procesamiento se concluye que siguiendo el protocolo adaptado bajo las condiciones adecuadas y esterilización con luz UV se pueden obtener, a partir de tendones

de cola de rata, mallas de colágeno con características macroscópicas y microscópicas que las hacen viables como soporte para el cultivo celular principalmente de fibroblastos.

Agradecimientos

Instituto de Inmunología Clínica (Idic-ULA), Grupo de Química Ecológica de la Facultad de Ciencias (ULA). Bioterio – ULA.

Bibliografía

1. Bello S, Pereira R, Fontanilla, M. Elaboración de de tejido conectivo autólogo de mucosa oral y evaluación de su desempeño como cobertura biológica en lesiones mucosas inducidas en conejos. *Rev Fed Odontol Colomb.* 2004;20:12-28
2. Hou L, Yan J, Lui C, Huang J, Jenny S, Wong M, Lin P. Treatment of the gingival recession—literature review of current progress. *Chin Den J.* 2005;4(2):71-8.
3. Yamada K, Yamaura J, Katoh M, Hata K, Okuda K, Yoshie Y. Fabrication of Cultured Oral Gingiva by Tissue Engineering Techniques without Materials of Animal Origin. *J Periodontol.* 2006;77(4):672-7.
4. Sueldo E. Aloinjerto de matriz dérmica acelular como sustituto de tejido dador palatino. *Odontol Sanmarquina.* 1998;1(2).
5. Gonzalez S, Junquera L, Peña I, García V, Gallego L, García E, Meana A. Cultivo In Vitro con colágeno y fibroblastos humanos de un equivalente de mucosa oral de espesor total. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac.* 2009;31(2):101-6.
6. Garzón H. *Estudio de marcadores de diferenciación epitelial en mucosa oral construida por ingeniería tisular.* Tesis doctoral. Universidad de Granada, 2009.
7. Bell E, Ivarsson B, Merrill Ch. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in Vitro. *Proc Natl Acad Sct USA.* 1979;76(3):1274-8.
8. Espinosa L, Sosnik A, Fontanilla M. Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa rounds. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(5):1667-79.
9. Santos L. Novel 3-d polymer scaffold for tissue regeneration and preparation method thereof. International Filing Recuperado 11/11/2010. Disponible en: <http://www.wipo.int/pctdb/ja/wo.js> p?WO=2006082270&IA=ES2006000042&DISPLAY=DESC
10. Lizarbe M Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la Ingeniería tisular. *Rev R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 2007;101(1): 227-49.