

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

TESIS:

“PROTOCOLO DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS Y CARACTERIZACIÓN DE EQUIPOS LÁSER DE DOS LONGITUDES DE ONDA (810nm-940nm)”

PRESENTA:

L.E. María Sarahí Chávez Sornia
Matrícula: 221450006

Para obtener el grado de:

Maestría en Estomatología
con Opción Terminal en Ortodoncia

DIRECTOR DE TESIS:

M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez

DIRECTOR METODOLÓGICO:

D.C. Brenda Eréndira Castillo Silva

ASESOR DISCIPLINARIO:

M.O. Laura Mónica López Pérez Franco

ASESOR EXTERNO:

E.O. Ángela Inés Domínguez Camacho

LECTOR DE TESIS:

M.O. Estela del Carmen Velasco León

REGISTRO CIFE: 2021150

FECHA: Junio 2023



Dictamen de aprobación de tesis
Oficio No. FESIEP/CIFE/051/2023



Oficio No. FESIEP/CIFE/051/2023

C. María Sarahi Chávez Sornia
Alumna de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Ortodoncia
Matrícula No.: 221450006
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permito informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:

"Protocolo de cultivo de fibroblastos y caracterización de equipos láser de dos longitudes de onda (810nm-940nm)"

misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestra en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia; para su conocimiento y atención correspondiente.

Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 29 de mayo de 2023

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Se anexa: Formato de Impresión de Tesis (Original) - p.s.c y a.
*C.c.p. Archivo
*MTRO. FJMA/DR.FADV/yaneth

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

Autorización de impresión de Tesis

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL**

Para obtener el Grado de: **Maestra en Estomatología con opción terminal en Ortodoncia**

Registro CIFE: 2021150 Fecha: lunes 29 de mayo del 2023

Título de la Tesis: "Protocolo de cultivo de fibroblastos y caracterización de equipos láser de dos longitudes de onda (810nm-940nm)."

Nombre del alumno: María Sarahí Chávez Sornia

Matrícula: 221450006

Domicilio: 13 Sur, 2510 Departamento 11-A, Colonia los Volcanes CP: 72410

Tel: 62*41 57 99 15

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 04 de enero del 2021

Firma: _____

Director de Tesis: MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez.

Grado académico: Maestría en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100408155

Tel: 22*21 61 47 78

Firma: _____

Director Disciplinario: MO. Laura Mónica López Pérez Franco. **Grado académico:** Maestría en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100527897

Tel: 22*25 18 03 20

Firma: _____

Director Metodológico: DC. Brenda Eréndira Castillo Silva

Grado académico: Doctorado en Ciencias

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: NSS526469

Tel: 44*42 42 60 77

Firma: _____

Lector: MO. Estela del Carmen Velasco León **Grado académico:** Maestría en Ortodoncia y Ortopedia Maxilofacial

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100225554

Tel: 22*23 23 48 42

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación del Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Ortodoncia.

MO. Laura Mónica López Pérez Franco

Firma: _____

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez



Fecha: lunes 29 de mayo del 2023

Sello _____

Oficio de aceptación de proyecto (C.I.F.E.)
Constancia No. FESIEP/CIFE/078/2023



BUAP

Constancia No. FESIEP/CIFE/078/2023

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Responsable del Proyecto
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; informa, que, el Proyecto de Investigación (Colectivo):

"Comparación de proliferación celular en cultivos de fibroblastos con fotobiomodulación a dos longitudes onda (810NM-940NM)".

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID - Matrículas
1	Responsable del Proyecto:	MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez	100408155
2	Director Metodológico:	DC. Brenda Eréndira Castillo Silva	NSS526469
3	Director Disciplinario:	MO. Laura Mónica López Pérez Franco	100527897
4	Asesor Externo:	Dra. Angela Inés Domínguez Camacho	S/N
5	Alumna de Maestría: Terminal en Ortodoncia	C. María Sarahi Chávez Sornla	221450006

quedo registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), en el libro de registros 06 en la hoja 01 con No. de registro 2021150, y con fecha asentada el día viernes 16 de octubre del año 2020.

Por lo anterior, se hace constar, que, el día viernes 26 de mayo del año en curso, se recibió ante C.I.F.E. la notificación de cambio de título de Proyecto, por parte del responsable del Protocolo, para dar continuidad a lo mencionado con el siguiente rubro:

<u>Título anterior registrado ante C.I.F.E.:</u>	Comparación de proliferación celular en cultivos de fibroblastos con fotobiomodulación a dos longitudes onda (810NM-940NM)
<u>Título actualmente registrado ante C.I.F.E.:</u>	Protocolo de cultivo de fibroblastos y caracterización de equipos láser de dos longitudes de onda (810nm-940nm).

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., 26 de mayo de 2023

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología

*C.c.p. Archivo
*MTRG. FJMA/DR.FADV/Yaneth

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

Reporte de similitud anti plagio

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

%

FUENTES DE INTERNET

10%

PUBLICACIONES

13%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

Agradecimientos

Este trabajo de investigación presentado no hubiera sido posible sin la enorme colaboración del Dr. José Everardo Avelino Cruz y el Dr. Miller Toledo Solano, de la Facultad de Fisiología y la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas respectivamente, así como de sus alumnos de maestría y doctorado Dani, Alejandro y Hugo, quienes aportaron de su tiempo y conocimiento para darle sustento a las pruebas realizadas y sin ellos no hubiese logrado los resultados obtenidos.

Una especial mención a mis compañeros de maestría, que hicieron que este proceso fuera muy ameno y gratificante para mí. Y me llevo la satisfacción de haberlos conocido y compartido esta experiencia con ellos. Siempre los llevaré en mi corazón: Anita, Mariana, David y Julio; éste último quién me acompañó, por el diseño de su estudio a entrar al camino del cultivo celular, donde aprendimos juntos que no es nada fácil.

Gracias también a mi novio Gil, quién desde el curso propedéutico me enseñó a no darme por vencida, que soy capaz de cualquier cosa y que ha estado este tiempo a mi lado, apoyándome y animándome siempre de manera incondicional.

Pero sobre todas las cosas gracias a mis padres Joel y Lucía, quiénes me han apoyado tanto en este largo camino del estudio, teniendo que sacrificar cosas porque nunca me falte nada. Y que su amor y palabras de ánimo a miles de kilómetros me hace seguir adelante cada día. Gracias por educarme de la manera en que lo hicieron, ya me inculcaron el querer superarme cada día.

Este trabajo lo dedico a mis hermanos Jozef, Joely y Jerelyn, porque solo por ellos soy quien soy, queriendo siempre ser su ejemplo a seguir y nunca fallarles como hermana mayor.

Índice general

1. Resumen y palabras clave.	1
2. Introducción.	2
3. Antecedentes.....	4
3.1. Antecedentes generales.	4
3.2 . Antecedentes específicos.....	15
3.2.1. Cultivos de fibroblastos periodontales y fotobiomodulación.	15
3.2.2. Fotobiomodulación y movimiento dental.....	20
4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación.....	22
5. Justificación.	24
6. Hipótesis.....	26
7. Objetivos.....	26
7.1 Objetivo general.....	26
7.2 Objetivos específicos.....	26
8. Materiales y métodos.....	27
8.1 Diseño de estudio.....	27
8.2 Población y muestra.....	27
8.3 Criterios de selección.	27
8.4 Variables.....	28
8.5 Concordancia y fiabilidad.....	28
8.6 Ubicación espacio temporal.	29
9. Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección.....	30
9.1. Fuentes de recolección.....	30
9.2. Procedimientos y técnicas.	30

9.2.1. Protocolo para la creación de un cultivo celular a partir de células congeladas.	30
9.2.2. Caracterización de los equipos de láser.....	42
9.3. Recursos materiales.....	45
9.3.1. Materiales e instrumentos.....	45
9.4. Recursos financieros.	45
9.5. Recursos humanos.	46
9.6. Ética y Bioseguridad del estudio.	46
9.6.1. Exposición a luz láser infrarroja.....	46
10. Análisis estadístico.	47
11. Resultados.	48
11.1. Resultados del cultivo celular.	48
11.2. Resultados de la caracterización de los equipos láser.	51
11.2.1. Potencia.	51
11.2.2. Longitud de onda.	55
11.2.3. Distancia.	58
12. Discusión	60
13. Conclusión.	63
14. Anexos.....	64
14.1 Anexo 1.....	64
14.2. Anexo 2.....	66
15. Bibliografía.....	68

Índice de tablas

Número	Nombre	Página
1	<i>Tabla de variables.</i>	28
2	<i>Tabla de información de etiqueta de caja de cultivo.</i>	32
3	<i>Tabla de como realizar el cambio de medio de DMEM-FBS 10%.</i>	35
4	<i>Tabla de elaboración de solución salina de fosfato (FBS).</i>	37
5	<i>Tabla de procedimiento de resuspensión.</i>	39
6	<i>Tabla de resultados de potencia a 100 mW con frecuencia pulsada.</i>	53
7	<i>Tabla de resultados de potencia a 200 mW con frecuencia pulsada.</i>	53
8	<i>Tabla de resultados de potencia a 100 y 200 mW con frecuencia continua.</i>	53

Índice de figuras

Número	Nombre	Página
1	<i>Representación de las células a diferentes porcentajes de confluencia (20, 50, 80 y 100%).</i>	6
2	<i>Propiedades básicas de la onda en la que viaja la luz: a) amplitud y b) longitud de onda.</i>	9
3	<i>Transporte en hielera con hielo seco de los fibroblastos en su criovial.</i>	30
4	<i>Procedimiento de descongelamiento de las células: a) Agua a una temperatura de 37-38°C. b) Criovial siendo sumergido y agitado en agua. c) Criovial transportado a campana de flujo laminar.</i>	33
5	<i>Procedimiento de descongelamiento de las células: a) DMEM-FBS 10% depositado en criovial. b) y c) Resuspensión de contenido.</i>	33
6	<i>Investigador observando las células en el microscopio invertido.</i>	34
7	<i>Potenciómetro óptico modelo 843-R de la marca Newport™.</i>	42
8	<i>Espectrofotómetro BLUE-Wave de StellarNet Inc.</i>	43
9	<i>Pruebas de láser a distintas distancias para alcanzar a cubrir el área total de caja Petri.</i>	45
10	<i>Fibroblastos después de ser descongelados: a) Vista 20x. b) Vista 40x.</i>	48
11	<i>Fibroblastos después después del primer cambio de medio a las 3-4 horas. Vista 40x.</i>	49
12	<i>Fibroblastos después después de cambio de medio a las 24 horas. Vista 40x.</i>	49
13	<i>Fibroblastos después después de cambio de medio a las 72 horas. Vista 40x.</i>	50
14	<i>Potencia a 100 mW con frecuencia pulsada.</i>	54
15	<i>Potencia a 200 mW con frecuencia pulsada.</i>	54
16	<i>Longitud de onda de láser Quantum® IR810.</i>	55
17	<i>Longitud de onda de láser Biolase® Epic X: <u>Punta normal.</u></i>	56
18	<i>Longitud de onda de láser Biolase® Epic X: <u>Punta extraoral.</u></i>	56
19	<i>Longitud de onda de láser Biolase® Epic X: <u>Punta de corte.</u></i>	57

20	<i>Prueba de láser a la distancia de 65 mm.</i>	58
21	<i>Prueba de láser a la distancia: a) 70 mm y b) 60 mm.</i>	59
22	<i>Constancia del XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología (ENIO).</i>	64
23	<i>Constancia del XX Encuentro Nacional de Investigación de Estudiantes y Coordinadores de Posgrados en Ortodoncia.</i>	65
24	<i>Constancia de curso Teórico-Práctico de aplicación de Láser en Ortodoncia impartido por el Centro Internacional de Educación en Láser en Odontología (CIELO).</i>	66
25	<i>Resultados del curso por parte del laboratorio Labster teórico-virtual en: a) básicos del cultivo celular, b) técnica aséptica y c) dominio de la técnica de utilización de pipeta.</i>	67

Abreviaturas

°C	<i>Grados centígrados</i>
3D	<i>3 dimensiones (tridimensional)</i>
Al	<i>Aluminio</i>
ARN	<i>Ácido Ribonucleico</i>
As	<i>Arsenio</i>
ATM	<i>Articulación Temporo-Mandibular</i>
ATP	<i>Adenosin Trifosfato</i>
bFGF	<i>Factor básico de crecimiento de fibroblastos</i>
CaCl₂ 2H₂O	<i>Cloruro de calcio di-hidratado</i>
CIELO	<i>Centro Internacional de Educación para Láser en Odontología</i>
cm²	<i>Centímetro(s) cuadrado(s)</i>
cols.	<i>Colaboradores</i>
CONACYT	<i>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología</i>
DMEM	<i>Medio eagle modificado de Dulbecco</i>
DMSO	<i>Dimetil Sulfóxido</i>
Dra.	<i>Doctora</i>
ERK	<i>Cinasa regulada por señales extracelulares</i>
FBS	<i>Suero Bovino Fetal</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEBUAP	<i>Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla</i>
g	<i>Gramos</i>
Ga	<i>Galio</i>
HCL	<i>Ácido clorhídrico</i>
He	<i>Helio</i>
Hz	<i>Hertz</i>
HGF	<i>Fibroblastos gingivales humanos</i>
IGF-1	<i>Factor de crecimiento insulínico tipo 1</i>
IGFBP3	<i>Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina</i>
IL-1 β	<i>Interleucina 1-beta</i>
J	<i>Julios (Joules)</i>
KCL	<i>Cloruro de potasio</i>
kg	<i>Kilogramos</i>
KH₂PO₄	<i>Fosfato monopotásico</i>
LIPUS	<i>Ultrasonido pulsado de baja intensidad</i>
LLLT	<i>Terapia de laser de baja potencia (Low Level Laser Therapy)</i>
MGCl₂ 6H₂O	<i>Cloruro de magnesio hexahidratado</i>
ml	<i>Mililitros</i>
mm	<i>Milímetros</i>
mM	<i>Milimol(es)</i>
mW	<i>Milivatios (miliWatts)</i>
Na₂HPO₄	<i>Fosfato de disódio</i>
NaCl	<i>Cloruro de sodio</i>
NADH	<i>Dinucleótido de nicotinamida y adenina</i>

Ne	<i>Neón</i>
nm	<i>Nanómetros</i>
OPG	<i>Osteoprotegerina</i>
OTM	<i>Orthodontic Treatment Movement</i>
FBS	<i>Buffer fosfato salino</i>
PBM	<i>Fotobiomodulación</i>
PGE₂	<i>Prostaglandina E₂</i>
pH	<i>Potencial de hidrógeno</i>
pps	<i>Partes por segundo</i>
RANK	<i>Receptor activador para el factor nuclear kappa β</i>
RANK-L	<i>Ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β</i>
REDOX	<i>Oxidación-reducción</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
S	<i>Segundos</i>
SDH	<i>enzima Deshidrogenasa Succínica</i>
u	<i>Unidades</i>
u/ml	<i>Unidades por mililitro</i>
µg/ml	<i>Microgramo por mililitro</i>

1. Resumen y palabras clave.

Introducción: El cultivo celular es una de las técnicas más importantes para la investigación en general. Las aplicaciones experimentales de las células cultivadas son muy amplias y es necesario establecer un protocolo para su realización en la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (FEBUAP). Los equipos láser mediante la fotobiomodulación son una herramienta prometedora en la ortodoncia, pero para poder realizar proyectos de investigación se debe primero realizar una caracterización de los mismos para evitar errores al momento de su aplicación y de conseguir la expresión de las dosimetrías deseadas. **Objetivo:** el propósito de este proyecto de investigación es establecer un protocolo de cultivo celular de fibroblastos criogenizados que pueda ser sustentable dentro de las instalaciones de la FEBUAP y caracterizar dos equipos láser con diferentes longitudes de onda de 940 nm y 810 nm. **Resultados:** se estableció un protocolo que puede ser implementado en los laboratorios de la FEBUAP en donde se logró un correcto cultivo y subcultivo de fibroblastos, además se logró caracterizar dos equipos láser y se descubrió que uno de ellos no manifiesta la longitud de onda que especifica el fabricante. **Discusión:** El hecho de que el láser de 940 nm no esté emitiendo la longitud de onda reportada, afecta a futuros protocolos ya que la longitud de onda de 636.5 nm no se encuentra reportada en la literatura hasta el momento, donde los resultados que la involucren se relacionen con la aceleración del movimiento. Se realizó el cultivo celular de fibroblastos y este fue efectivo, aunque se desconocían datos importantes sobre la criopreservación de las células que pudieron haber afectado el resultado. **Conclusión:** el laboratorio de la FEBUAP está equipado correctamente para el manejo de cultivos celulares, todo se encuentra listo para continuar con futuras investigaciones, excepto el láser de 940 nm, por lo que hay que investigar el motivo por el cual no emite la longitud de onda deseada. **Palabras clave:** Terapia láser de baja intensidad, fibroblastos, cultivo celular, fotobiomodulación, longitud de onda 810 nm, longitud de onda 940 nm, caracterización.

2. Introducción.

El movimiento dental originado por una fuerza aplicada ortodóncica está basado principalmente en iniciar una cascada de cambios, macroscópicos, así como microscópicos, en el remodelado óseo y cambios en tejidos periodontales, en los cuales se encuentran el tejido pulpar, hueso alveolar, encía y ligamento periodontal.

Los fibroblastos periodontales, los osteoclastos y osteoblastos son células que participan principalmente durante el movimiento dental ortodóncico. Estas células se ven expuestas durante el tratamiento a diversos factores de la fuerza aplicada como lo son la magnitud, frecuencia y duración de esta misma.

Diversos estudios previamente realizados en cultivos celulares de fibroblastos periodontales, fibroblastos gingivales y osteoblastos han demostrado que al ser sometidos a una bioestimulación con láser de baja intensidad existe una proliferación celular, así como un aumento en su función sin presentar efectos citotóxicos, por lo tanto, hace de este método una alternativa eficaz para promover la aceleración del movimiento dental. Sin embargo, todos estos estudios han sido realizados con diferentes longitudes de onda, niveles de potencia, dosis de energía total, tiempo, intervalo entre cada aplicación, así como el total de estas. Dichas diferencias en los protocolos de irradiación han dado como resultado distintos efectos en relación a los fibroblastos; algunos han generado un aumento en la proliferación, por otro lado, se ha observado un efecto no favorable en el incremento de proliferación celular.

Es importante encontrar un método que ayude acelerar el tratamiento de ortodoncia, debido a que una larga duración de este conlleva a la formación de problemas dentales como lo es la enfermedad periodontal, caries dental, reabsorción radicular, así como la pérdida de interés y cooperación por parte del paciente por su larga duración.

La finalidad del presente estudio fue establecer un protocolo de cultivo de fibroblastos criogenizados y caracterizar dos equipos láser con diferentes longitudes

de onda de 940 nm y 810 nm. Los equipos láser de baja intensidad fueron el Biolase Epic X de 940 nm y el Quantum® IR810 de 810 nm). Al ser caracterizados se identificará si emiten las propiedades especificadas por los fabricantes, y al crear el protocolo de cultivo de fibroblastos se estableció un precedente y tiene repercusión para su uso en futuros proyectos de investigación en la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (FEBUAP).

3. Antecedentes.

3.1. Antecedentes generales.

Cultivo celular.

El cultivo celular se refiere a métodos de laboratorio que posibilitan el crecimiento de células en condiciones fisiológicas en un ambiente controlado. Es una de las técnicas más importantes para la investigación en general, ya que proporciona una plataforma para investigar la biología, la bioquímica, la fisiología y el metabolismo de las células. Las aplicaciones experimentales de las células cultivadas son tan diversas como los tipos de células que se pueden cultivar *in vitro* (1).

Existen tres tipos de cultivo celular:

1. **Primario:** Formado por células que se han aislado recientemente de un tejido y que proliferan con éxito en las condiciones adecuadas.
2. **Secundario:** A medida que las células de un cultivo primario crecen y se multiplican van consumiendo nutrientes y se necesita traspasar parte de ellos a otro recipiente para que tengan más espacio, y condiciones óptimas nutrimentales. Esto se conoce como subcultivo o paso celular. Estas células mantienen la mayoría de las características de los tejidos de los que derivan. Pero después de un número limitado de pases o subcultivos, normalmente unos 10-20 (dependiendo del tipo celular), las células alcanzan la senescencia y no pueden seguir multiplicándose.
3. **Líneas celulares continuas:** Formado por células que se seleccionan al momento de un pasaje; se eligen por sus características deseables las que tienen mayor capacidad de crecimiento y se uniforman en su genotipo y fenotipo. Durante el proceso, o incluso desde el principio, pueden ser células con el potencial de multiplicarse indefinidamente. De esta forma se convierten en líneas celulares continuas que pueden ser subcultivadas en serie durante muchos pases, incluso se puede decir infinitos, sin perder su capacidad de crecer (2).

En ocasiones las células no se cultivan inmediatamente después de su obtención, por lo que es necesario conservarlas y almacenarlas para su posterior uso en futuros experimentos. La criopreservación (congelación) es la mejor manera de almacenarlas, para ello, es de suma importancia mantenerlas en medios especiales de congelación. Y se deben guardar en crioviales, los cuales son tubos fabricados de polipropileno autoclavable específicamente diseñados para almacenar material biológico a temperaturas de hasta $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. La velocidad de disminución de la temperatura es gradual y cercana a 1°C por minuto a -70°C . Después de este proceso, las muestras congeladas deben transferirse rápidamente a nitrógeno líquido o a un ultracongelador dentro de las próximas 24 a 72 horas (3).

Formarán el cultivo celular las células que sean capaces de superar el proceso de separación, que se adhieran al contenedor de cultivo (sustrato), adquieran la forma adecuada y proliferen.

Las células pueden crecer de dos maneras: en monocapa o en suspensión: El crecimiento en monocapa depende de que las células se adhieran al sustrato, por lo que se consideran dependientes de este anclaje y si este no sucede, las células no proliferan. Este método de crecimiento es utilizado por todas las células a excepción de las hemtopoyéticas. El crecimiento en suspensión es aquel en el que las células son capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, esto quiere decir que no independientes del anclaje. Es característico de células hemopoyéticas maduras y algunas células tumorales.

El crecimiento en un cultivo celular se divide en cuatro fases:

1. Latencia: Las células se están habituando a las condiciones del cultivo y no se dividen.
2. Logarítmica: Las células se dividen activamente, por lo que es la mejor etapa para evaluar la proliferación o recoger datos. La etapa tardía o final de esta fase es la mejor para realizar un subcultivo.
3. Meseta: El crecimiento celular se vuelve más lento a medida que se acercan a la confluencia del 100%. Conforme se van aglomerando

residuos celulares y se gastan los recursos que alimentan al cultivo, las células se van volviendo más sensibles a las lesiones.

4. Declive: Predomina la muerte celular, por lo que disminuyen las células vivas.

La confluencia es el porcentaje del área de la superficie del recipiente de cultivo que se encuentra cubierta por de células cuando se observa al microscopio. Cuando la mitad del área de la superficie del recipiente está cubierta por células, se considera una confluencia del 50%. La Figura 1 muestra ejemplos de confluencias de células a diferentes porcentajes. Al conseguir la confluencia del 100% es cuando las células expresan sus aspectos característicos de la línea celular, ya que es donde su morfología y fisiología son más parecidas a su estado original.

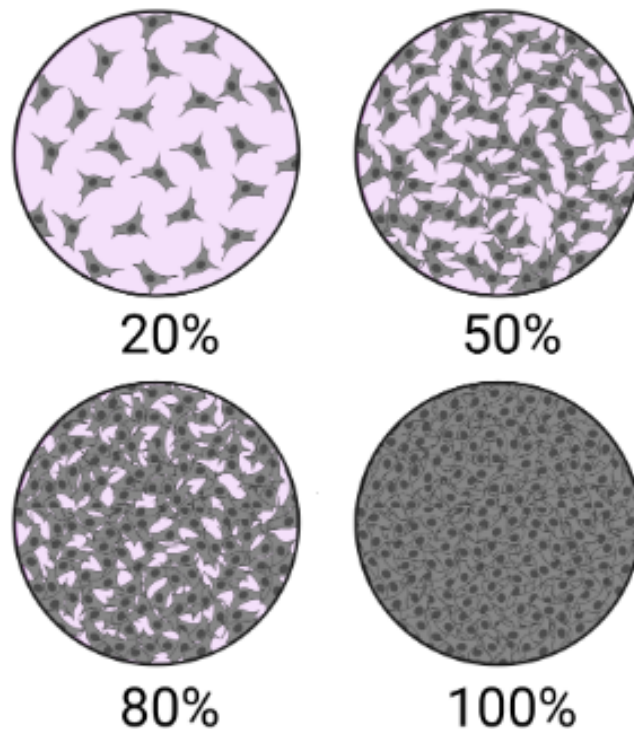


Fig. 1. Representación de las células a diferentes porcentajes de confluencia (20, 50, 80 y 100%). Fuente: imagen tomada de Bleloch, J. *Conceptos básicos de cultivo celular: equipos, fundamentos y protocolos*, 2021. (4)

Movimiento dental y fibroblastos

Los dientes están unidos al hueso alveolar y alejados del alvéolo por una fuerte estructura colagenosa llamada ligamento periodontal (LPD). Su principal componente es una red de fibras de colágeno paralelas que se van desde el cemento de la superficie radicular hasta el hueso alveolar; el colágeno del ligamento se remodela y renueva constantemente durante la función normal. Además el LPD presenta otros componentes: elementos celulares, que incluyen fibroblastos y osteoblastos, así como compuestos vasculares, neurales y los líquidos hísticos. (5)

El fibroblasto es la célula predominante de los tejidos conectivos del cuerpo. Se presentan como células alargadas, con refinadas prolongaciones, un núcleo oval cerrado algo achatado, pequeño citoplasma eosinófilo el cual incluye hasta 2 nucléolos y poca cromatina finamente granulada (6).

El fibroblasto del ligamento periodontal es la célula principal del ligamento que rodea la porción radicular del diente, origina y sostiene la inserción del tejido conectivo que provee anclaje del mismo dentro del alvéolo. Los fibroblastos juegan un papel importante en la función normal y posibilitan los movimientos ortodóncicos de los dientes (7).

Estudios experimentales demuestran que al cabo de pocas horas de aplicar una fuerza ligera, se inician una serie de cambios químicos que consisten básicamente en un aumento de mediadores celulares, segundos mensajeros, como es el caso del AMPc (adenosín monofosfato cíclico), el cual interviene en gran cantidad de funciones celulares, como es la diferenciación celular que ocurre luego de aproximadamente 4 horas de mantener la presión (8).

Al aplicar una fuerza ortodóntica sobre un diente, el ligamento periodontal sufre una serie de modificaciones. En las zonas de presión se evidencian cambios vasculares con dilatación de los vasos y desintegración de las paredes vasculares. La vasodilatación induce a la migración de macrófagos, linfocitos, proteínas y líquido hacia el espacio extracelular. Estas células inflamatorias, junto con los fibroblastos y osteoblastos producen moléculas denominadas citoquinas, que envían una señal,

la cual estimulan la proliferación de fibroblastos y aumentan la resorción ósea. Al parecer estas citoquinas constituyen los mediadores celulares responsables de la respuesta ósea ante la aplicación de estímulos mecánico (9).

También pueden observarse en las zonas de tensión con cambios en el flujo sanguíneo con migración de leucocitos hacia el espacio extravascular, lo cual indica la presencia de una reacción inflamatoria leve. Estas alteraciones del flujo sanguíneo inducen cambios en el ambiente químico que rodea a las estructuras involucradas. Dichos cambios químicos actúan directamente o estimulan la liberación de otras sustancias biológicamente activas, que posteriormente realizan la diferenciación celular que conlleva en última instancia al movimiento dental (10).

Láser

La palabra LÁSER viene del acrónimo en inglés de amplificación de luz por emisión estimulada de radiación (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). La luz es una forma de energía electromagnética que se comporta como una partícula y viaja en ondas a una velocidad constante. La partícula elemental estable que la forma se llama fotón y sólo existe cuando se mueve a la velocidad de la luz en el vacío. Cuando se desacelera, deja de existir y su energía se transforma (11).

La onda en la que viaja la luz se puede definir por dos propiedades básicas, amplitud y longitud de onda, mostradas en la Figura 2:

- Amplitud: es la altura vertical de la oscilación de la onda desde el eje cero hasta su pico. Cuanto mayor sea, mayor será la cantidad de energía disponible para realizar un trabajo.
- Longitud de onda: es la distancia horizontal entre dos puntos correspondientes de la onda. Usualmente se mide en metros, como los láseres dentales tienen longitudes de onda de unidades mucho más pequeñas usan terminología de nanómetros (nm) (10^{-9} m) o micrones (10^{-6} m). A medida que las ondas viajan, oscilan varias veces por segundo, a lo que se le denomina frecuencia. La frecuencia es inversamente proporcional

a la longitud de onda: cuanto más corta es la longitud de onda, mayor es la frecuencia y viceversa. (12)

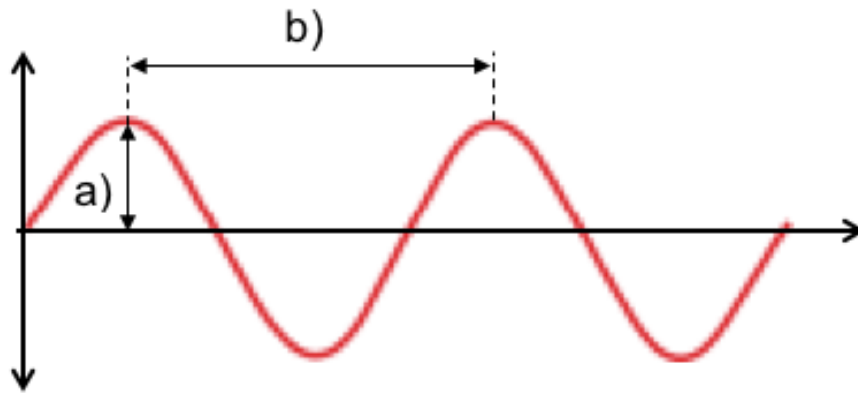


Fig. 2. *Propiedades básicas de la onda en la que viaja la luz: a) amplitud y b) longitud de onda. Fuente: imagen modificada de Coluzzi DJ. Lasers in Dentistry- current concepts. 2017. pp:18. (12)*

Los equipos láser comparten características comunes: un medio activo, un mecanismo de bombeo y un resonador:

El medio activo es el material que se estimula; dicho material usualmente le da su nombre al láser (sólido, líquido o gas). Los átomos de ese material absorben energía fotónica y luego comienzan a emitirla espontáneamente. Posteriormente, en las condiciones adecuadas, comenzará el proceso de emisión estimulada. Los materiales usados para los láseres dentales son de tres tipos: un contenedor de gas, un cristal de estado sólido o un semiconductor. El medio activo está en el centro o núcleo del láser, denominado cavidad óptica (13).

El mecanismo de bombeo es una fuente de excitación que se encuentra rodeando esta cavidad óptica con su medio activo. Se utiliza para transferir energía a la cavidad óptica, y esa energía debe ser de suficiente cantidad y duración para que la ocupación de un nivel de energía superior exceda la de un nivel inferior, lo cual permite que ocurra la amplificación. Existe una amplia variedad de mecanismos de bombeo en los láseres dentales: los láseres de diodo se bombean electrónicamente; los láseres de cristal de estado sólido utilizan luces

estroboscópicas de alta potencia y los láseres de dióxido de carbono pueden funcionar con métodos de bombeo de corriente alterna o continua o de radiofrecuencia (RF). Como una variación en el bombeo, algunos láseres utilizan gas a muy alta presión (13).

El resonador es el componente láser que rodea el medio activo. En la mayoría de los láseres, hay dos espejos, uno en cada extremo de la cavidad óptica, colocados paralelos entre sí; estos producen una interferencia constructiva de las ondas, es decir, la onda incidente y la onda reflejada pueden superponerse produciendo un aumento de su amplitud combinada. Algunas ondas no se combinarán y pronto perderán su intensidad, pero otras seguirán ampliándose en este resonador. Este efecto continuo ayuda a colimar el haz en desarrollo. En el láser de diodo la colimación se produce externamente (13).

Otra característica importante en la terminología de los equipos láser es la energía, la cual es la capacidad de realizar un trabajo, y se realiza mediante un pulso. Su unidad de energía es un julio (J). La fluencia es la energía entregada por un área en específico y se expresa como J/cm^2 . Esto también se conoce como densidad de energía. Los procedimientos en diferentes tejidos dentales requerirán varias fluencias tanto para la eficiencia como para la seguridad (14) .

La energía láser se distingue de la luz ordinaria por dos propiedades. Una es la monocromaticidad, lo que significa que la onda de luz generada es de un solo color específico. En el caso de los instrumentos dentales, ese color suele ser invisible a nuestros ojos. En segundo lugar, cada onda tiene coherencia, idéntica en tamaño físico y forma a lo largo de su eje, produciendo una forma específica de energía electromagnética (15).

Los láseres pueden producir emisión continua o pulsada. La emisión continua significa que la energía es manifestada sin interrupción, lo que produce una constante interacción tisular. Los láseres de diodo funcionan de esta manera. Por su parte, la emisión pulsada significa que la energía y/o la potencia tienen una salida de nivel, es decir, pueden ocurrir varias ráfagas de energía en un segundo. El

número de pulsos por segundo (pps) es el término habitual que se aplica, y una palabra alternativa es hertz (Hz) (16).

La potencia es la medida del trabajo realizado durante un período de tiempo y se mide en vatios (W). En odontología, debido a trabajar con potencias pequeñas se expresa en milivatios (mW). Un vatio equivale a 1 julio entregado durante 1 segundo (s). La densidad de potencia es la medida de la potencia entregada por área y se expresa como W/cm^2 o mW/cm^2 , ya sea el caso (17).

En odontología se diferencian dos grupos de láseres: los de alta potencia, también llamados quirúrgicos, y los de baja potencia, también nombrados, terapéuticos (18).

Baja potencia: Tiene una potencia de salida por debajo de los 500 mW, se aplican en zonas pequeñas, no producen calor y son utilizados con un fin terapéutico conocido como fotobiomodulación (alivio del dolor, reducción de la inflamación, favorecer el proceso de cicatrización, etcétera). Los equipos láser de baja potencia más comúnmente utilizados son:

- AsGa (Arseniuro de Galio)
- AsGaAl (Arseniuro de Galio y Aluminio)
- HeNe (Helio-Neon)

Alta potencia: Tienen una potencia de salida mayor a los 500 mW. Son aquellos que provocan efectos físicos visibles y que se emplean como instrumentos de corte o rotatorios de manera convencional. Los más utilizados son:

- Argon
- Diodo
- Nd:YAG (Neodimio dopado con Granate de Itrio y Aluminio)
- Nd:YAP (Neodimio dopado con Perovskita de Itrio y Aluminio)
- Ho:YAG (Holmio con Granate de Itrio y Aluminio)
- Er:YAG (Erbio con Granate de Itrio y Aluminio)
- CO₂ (Dióxido de carbono) (19)(20).

Caracterización de láser

Las propiedades antes mencionadas determinan el rendimiento y la eficacia de un láser en termino de sus características operativas, por lo que deben analizarse utilizando la instrumentación adecuada (21).

Las herramientas disponibles para comprobar que un láser esté dentro de los parámetros reportados de sus propiedades incluyen: controladores láser, potenciómetros ópticos, microscopios y sistemas de visión, espectrofotómetros y perfiladores de haz de láser. Estos permiten que un usuario mida el rendimiento de un dispositivo de manera individual. Con estos instrumentos, las características de salida del láser, como los cambios en la potencia de salida y la longitud de onda, se pueden analizar en una configuración relativamente simple (22).

Los medidores de potencia (potenciómetros) y longitud de onda (espectrofotómetros), por su diseño específico para realizar su trabajo, tienen mediciones precisas de las características de salida del dispositivo láser. Las aplicaciones típicas de estos controladores incluyen la realización de nuevos productos y la validación de productos existentes bajo diversas condiciones (23)n el doctor Rodrigo, pasa por aquí a ortodoncia por favor .

Fotobiomodulación.

La terapia con láser de baja potencia, (LLLT, por sus siglas en inglés), ahora llamada fotobiomodulación (PBM, por sus siglas en inglés), fue introducida por Endre Mester en 1967, en Hungría. Consiste en el uso de láser como una terapia no invasiva, donde la aplicación de energía fotónica en longitudes de onda específicas induce una respuesta biológica a través de la transferencia de esta energía hacia algún tejido, y de esta manera modula sus procesos biológicos y así mismo al sistema del cual ese tejido forma parte (24). Para que se lleven a cabo dichos efectos sobre las células depende directamente de la dosis aplicada (25).

La fotobiomodulación que produce la aplicación de láser suscita una serie de eventos celulares como cambios metabólicos, mayor movimiento, una división celular rápida, así como una producción rápida de matriz (26)(27). Se ha evidenciado que actúa a nivel mitocondrial al acrecentar los niveles de Adenosín Trifosfato (ATP), así como modular y producir Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Los fotones del láser son asimilados por los cromóforos que se encuentran dentro de la mitocondria de las células irradiadas. Los electrones en los cromóforos pasan de un orbital de baja energía a una de mayor energía; esto inicia un incremento en la actividad mitocondrial lo cual genera un aumento en la producción de ATP, Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH), Ácido Ribonucleico (ARN), proteínas, del mismo modo una regulación positiva en la respiración celular. Algunos autores han postulado que este efecto emana de la absorción de la luz láser por la enzima citocromo C oxidasa, localizada en la mitocondria de las células, la cual participa en la cascada de la respiración oxidativa (28)(29).

Se ha afirmado que el láser actúa sobre la célula esencialmente a tres niveles:

- Nivel mitocondrial: actúa al estimular la producción de energía. Primeramente, se da lugar a un aumento de energía por estímulo en el ciclo de Krebs y a través de captación en grupos P la mitocondria almacenará el mayor número de enlaces de alta energía (ATP).
- Núcleo: Activa y optimiza la duplicación de los ácidos nucleicos, del mismo modo, el proceso de transducción y transcripción de los mismos.
- Membrana celular: la regulariza para la interacción iónica (24)(30).

Fotobiomodulación en ortodoncia

Los efectos de la PBM como el alivio del dolor, la promoción de la cicatrización de heridas y la disminución de la inflamación se pueden ver no solo en el campo médico, sino también en el campo dental.

Se han sumado una gran cantidad de dentistas al uso de láser como un coadyuvante en la relajación muscular, disminución del dolor, para favorecer el

proceso de cicatrización, proliferación de fibroblastos, modulador en el sistema inmunológico y regeneración nerviosa(31)(32).

Dentro de la ortodoncia es utilizada principalmente para la reducción del dolor ocasionado por fuerzas ortodóncicas, y en los últimos años se ha utilizado para disminuir la duración total del tratamiento al precipitar el movimiento dental, ya que presenta efectos positivos en remodelación ósea y por consecuencia, se reduce el tiempo del tratamiento ortodóncico, a su vez logra una disminución representativa de dolor (33)(34). A fin de alcanzar la aceleración del movimiento con PBM es necesario que llegue a las células óseas para estimularlas, ya que se encuentran por debajo de los tejidos blandos del periodonto y esto ha causado discusión sobre que dosimetrías o parámetros utilizar (33)(35). En la literatura los estudios que comparan los efectos del láser al usar longitudes de onda visibles y de infrarrojo mostraron discrepancias, la mayoría de ellas mencionan que los mejores resultados se obtuvieron al utilizar láser con longitud de onda invisible (36).

En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han evidenciado que el láser incrementa los niveles del ATP celular (37) y acciona enzimas específicas que agilizan la salud tisular, reparación, neo vascularización e incremento en la actividad fagocitaria de los leucocitos (38)(39). Por esto la fotobiomodulación promete como beneficio acelerar el movimiento ortodóncico exento de molestia, además de ser de fácil aplicación y acceso para los pacientes (40). A merced, se disminuye la duración del tratamiento a un bajo costo (41).

Según la literatura, existen escasos estudios que hagan mención acerca de efectos adversos que puede producir la aplicación del láser de baja potencia (42). Algunos de estos efectos secundarios son: somnolencia, vértigo, aumento de dolor, daño en globo ocular cuando el operador o paciente no hacen uso de gafas protectoras. Cabe hacer hincapié que todos estos efectos adversos muy rara vez se hacen presentes (43).

3.2. Antecedentes específicos.

3.2.1. Cultivos de fibroblastos periodontales y fotobiomodulación.

En la actualidad, se han llevado a cabo múltiples estudios *in vitro* que han demostrado que la fotobiomodulación aumenta la proliferación de fibroblastos gingivales humanos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), receptor de IGF-1 (IGFBP3) en HGF, al igual que el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y la expresión de colágeno tipo I (26)(44).

Shimizu y cols., expusieron la respuesta de los fibroblastos del ligamento periodontal a la irradiación con láser de baja intensidad *in vitro* utilizó una longitud de onda de 830 nm de un láser de GaAlAs, detectó en dichas células una inhibición estadísticamente significativa en la producción PGE₂ y IL-1 β (45).

De acuerdo con la revisión actualizada de estudios confiables, parece existir pruebas sólidas que sustentan el uso del láser de baja intensidad como un medio terapéutico eficaz en los tratamientos de ortodoncia, sin causar citotoxicidad a nivel celular y clínicamente eficiente. Incontables longitudes de onda han sido planteadas a lo largo de la literatura para lograr resultados favorables en las circunstancias anteriormente mencionadas (46).

Estudios previamente realizados en cultivos de fibroblastos gingivales, fibroblastos periodontales y osteoblastos han aludido que este tipo de láser promueve la función y proliferación celular, por consiguiente favorece el proceso de cicatrización, producción de elastina, colágeno y proteoglicanos (elemento estructural importante en el tejido conectivo en encía) (47)(48)(49).

El estudio realizado por Young y cols sobre macrófagos comprobó que a diferentes longitudes de onda (660 nm, 820 nm y 870 nm) existe una secreción de sustancias bioestimulantes de fibroblastos desencadenada por macrófagos, en tanto que una longitud de onda de 880 nm se observaba un efecto inhibitorio en los fibroblastos (42).

Estudios realizados por Almeida y cols. detectaron que fibroblastos de ligamento periodontal expuestos a láser terapia obtiene un aumento significativo en proliferación al compararlos con un grupo control. Con un láser de luz visible se irradia al grupo 1 y grupo 3 con una longitud de onda de 670nm, 692 nm con una potencia de 10 mW y 30 mW respectivamente; en el grupo 2 y 4 se utilizó un láser infrarrojo con una longitud de onda 780 nm, 786 nm y una potencia de 50 mW, 30 mW correspondientemente. En total realizaron 4 aplicaciones de láser a cada grupo con intervalo de 12 horas entre cada una con dosis de energía 2 J/cm². Hubo un incremento de proliferación en todos los cultivos celulares, sin embargo, concluyeron que, al aplicar una cantidad idéntica de energía, la fotobiomodulación genera una multiplicación significativa de las células citadas, en contraste al aplicar distintos grados de potencia (50).

Pereira y cols. ponderaron la síntesis de pro-colágeno después de irradiar cultivos celulares de fibroblastos gingivales, con un láser de Ga-As con una longitud de onda de 904 nm en variaciones de dosis de energía y analizaron el desarrollo del aumento y aceleración del pro-colágeno. El estudio fue conformado por 1 grupo control y 3 grupos experimentales. Al primer grupo experimental se realizó 2 aplicaciones, con intervalo de 6 horas, de 2 J/cm² cada una por 16 segundos. De igual manera, con intervalo de 6 horas, el segundo grupo se irradió 2 veces, la primera vez con una dosis de 1 J/cm² por 8 segundos y la segunda aplicación con una dosis de 2 J/cm² por 16 segundos. Finalmente, el tercer grupo fue irradiado con una dosis de 2 J/cm² durante 16 segundos, posterior a las 6 horas se aplicó una segunda dosis con 3 J/cm² con 24 segundos. Concluyendo que el láser, con dosis de energía total 3 - 4 J/cm², origina un efecto de proliferación celular más rápido (casi 4 veces mayor) sin encontrar una alteración en la síntesis de pro-colágeno (51).

Aihara y cols. reportaron que a lo largo del movimiento dental en el tratamiento ortodóncico, el sistema OPG/RANKL/RANK (activador de los receptores de los ligandos NF-kappa β /activador de los receptores de los ligandos NF-kappa β)

en el tejido periodontal es un factor fundamental que determina el equilibrio regulatorio de la reabsorción ósea alveolar (52)(53).

Es evidente que fotobiomodulación ha sido empleada sobretodo a longitudes de onda en torno a los 800 nm en estudios recientes, esto se debe a sus características que actúan específicamente en tejidos blandos, por su afinidad con hemoglobina y melanina, lo que resulta eficaz para actuar en tejidos localizados más profundos (54)(55).

Por otro lado, en estudios más recientes, se ha manifestado que los láseres de Diodo con longitudes de onda 940-980 nm han resultado eficaces en la disminución en la inflamación postoperatoria, cicatrización, aceleración en regeneración, del mismo un efecto bioestimulador en proliferación de fibroblastos. A pesar de ello, los estudios reportados son escasos (53)(56)(57).

Saygun y cols., en el 2008 investigaron el efecto de la fotobiomodulación en la secreción de factor de crecimiento tipo I similar a la insulina, su receptor IGF-1, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGE) de células de fibroblastos gingivales, utilizaron un parámetro de 685nm, 25 mW, durante 140 segundos y una densidad de energía de 2 J/cm², conformado por 2 grupos. Al primer grupo se le realizó una aplicación, donde hubo incremento solo en factor de crecimiento básico de fibroblastos y factor de crecimiento tipo -1 similar a la insulina(26). Al segundo grupo se le realizó 2 aplicaciones con un intervalo de 24 horas entre cada una, hubo un incremento de los 3 valores, así como, 109% mas de proliferación celular. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Su Jung Kim et al. quienes demostraron que la terapia de láser de baja intensidad *in vitro* aumenta la proliferación de fibroblastos gingivales en humanos, y la expresión de colágeno tipo I, factor de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento tipo-1 de insulina (IGF-1), y el receptor de IGF-1(58).

Por otro lado, Basso y cols. en un experimento *in vitro* de fibroblastos estudiaron el efecto bioestimulador de fotobiomodulación con un protocolo de irradiación de 780 nm de longitud de onda continua con una potencia de 0.025 W a

diferentes dosis de energía (0.5, 1.5, 3, 5 y 7 J/cm²) durante 40 s, 120 s, 240 s, 400 s y 560 s respectivamente. Al evaluar el metabolismo celular después de la irradiación con una dosis de 5 J/cm² no encontraron una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con el grupo control. Al contrario, con lo sucedido en los grupos experimentales irradiados con una dosis de 0.5 J/cm² donde se dio un incremento del 11% de fibroblastos, así mismo ocurrió en el grupo irradiado con 3 J/cm² con un 17% de incremento en el metabolismo celular. En todos los grupos se encontraron características morfológicas normales (28). Así mismo, en el año 2016, efectuaron un estudio *in vitro* con un modelo de cultivo celular 3D, en el cual sembraron fibroblastos gingivales en matriz de colágeno. Realizaron 3 irradiaciones con un intervalo de 24 horas entre cada una, con una longitud de onda 780 nm con una potencia de 70 mW y una densidad de energía de 0.5, 1.5 y 3 J/cm². El grupo con 0.5 J/cm² tuvo mejor expresión de colágeno tipo 1 y el grupo con 3 J/cm² tuvo incremento en la viabilidad celular. De tal manera demostraron que la fotobiomodulación aumenta las funciones celulares relacionadas con la reparación de tejidos (59).

En el 2003, Kreisler y cols. realizaron un estudio *in vitro* de cultivos de fibroblastos de ligamento periodontal para evaluar el potencial de estimulación al ser irradiados con un láser de diodo de 809 nm operado a una potencia de salida de 10 mW en modo de onda continua. Encontró que los fibroblastos periodontales irradiados revelaron un aumento de proliferación considerablemente mayor que los controles, esto fue establecido por medio de la actividad de fluorescencia mediante un indicador de oxidación-reducción (REDOX) (60). Las diferencias fueron significativas hasta 72 horas después de la irradiación, sin embargo, estos resultados difieren de los cultivos de fibroblastos gingivales como lo sustentó, en 1996, Giaunopolou (61).

Coskun y cols. llevaron a cabo en Turquía, durante el 2018, un estudio *in vitro* comparativo entre ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS) y láser de baja intensidad. Al irradiar cultivos de osteoblastos humanos y fibroblastos de tejido embrionario de ratón observaron que no había un efecto eficaz proliferativo con la aplicación de LIPUS, en cambio encontraron que el calor generado por este

ocasionaba muerte celular (el calor excesivo llega a ocasionar apoptosis). Por el contrario, hubo una proliferación favorable a las 24 y 48 horas después de la irradiación con láser con longitud de onda de 820 nm, sin haber ocasionado apoptosis. El calor generado por el láser de baja intensidad no afecta la temperatura de la superficie a diferencia a lo ocurrido con el LIPUS (62).

Choi y cols., evaluaron el efecto biológico del laser diodo semiconductor en ligamento periodontal humano. Utilizaron (Ga-Al-as) láser diodo con una longitud de onda de 810 nm, potencia de 500 mW con diversos parámetros de densidad de energía (1.97 J/cm^2 , 3.94 J/cm^2 y 5.91 J/cm^2) durante 10, 20, 30 segundos respectivamente. El grupo irradiado con 3.94 J/cm^2 durante 20 segundos tuvo mayor efecto de proliferación, sin embargo, no logró ser estadísticamente significativo. Por otro lado, al realizar la prueba de MTT observaron un incremento de fosfatasa alcalina y en la actividad de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK)(63). En cambio, Frozanfar y cols. realizaron un estudio, en el 2012, para precisar si la aplicación de láser de baja intensidad (Ga-Al-as) podría llevar a cabo un efecto estimulante en cultivos de fibroblastos gingivales. Al estudiar la proliferación de dichas células, así como la manifestación de colágeno (específicamente tipo I), irradiaron con una longitud de onda 810nm con una potencia de, menor a la utilizada por el doctor Choi y cols., 50 mW- 4 J/cm^2 por 32 segundos con un mayor número de aplicaciones (3 días consecutivos). Por el contrario a lo observado en el protocolo de Choi y cols., Frozanfar y cols., al realizar el ensayo de MTT encontró un aumento de proliferación celular del 144.7% a las 72 horas; en la producción de colágeno tipo I hubo un aumento de casi 5 veces mayor en comparación al grupo control (48).

Marques M. y Pereira A. irradiaron fibroblastos gingivales cultivados con un láser de Ga-Al-As con longitud de onda de 904nm, los resultados obtenidos aseveraron que existe una modificación a nivel estructural y advierten que dichas modificaciones en ocasiones logran originar desorden en su metabolismo (64).

Los resultados obtenidos en el estudio por Young y cols. sugieren que a ciertas variaciones de longitudes de onda existe un efecto bioestimulante, en tanto

que para otras longitudes de onda el efecto puede influir en la inhibición de la proliferación celular (42).

En general los ensayos detectados en la literatura en cultivos celulares han sido implementados con protocolos no homogenizados (65). George T. y cols. (66) destacan la trascendencia de establecer un protocolo de irradiación de modo *in vitro*.

Por ende, Domínguez y cols. llevaron a cabo un ensayo con el objetivo de establecer un protocolo seguro de fotobiomodulación en cultivos de fibroblastos gingivales y ligamento periodontal para poder ser empleado más adelante en cultivos de pre-osteoclastos y osteoblastos, el protocolo sugerido es una longitud de onda de 832.79 nm, 6.73 mW de potencia, 3.75 J/cm² y 32.40 segundos por pozo. En el análisis de los resultados no encontraron un aumento favorable en la proliferación de fibroblastos gingivales y periodontales (47)(67)(68).

3.2.2. Fotobiomodulación y movimiento dental.

Los resultados que se obtienen por la aplicación de láser terapia de baja intensidad pueden variar, debido a que dependen de acuerdo con el parámetro de irradiación empleado: técnica de aplicación, número de aplicaciones, zona a irradiar, longitud de onda, potencia de emisión, así como, el tiempo y cantidad de energía total. Además, se han utilizado diferentes equipos emisores de luz láser, incluidos láser Helium-Neon (He-Ne) y Diodos (Ga-As-Al, Ga-As, In-Ga-AsP), con diferentes longitudes de onda. Los láser tipo diodo han demostrado ser más efectivos, debido a que tienen una penetración mayor en tejidos profundos. No obstante las aplicaciones y la dosis exacta bioestimulante de fotobiomodulación aún no se ha establecido o estandarizado.(56)(57).

Long y cols. (40) en el 2015 elaboraron un meta-análisis en el cual incluyeron diferentes protocolos de irradiación con un equipo láser de diodo con una longitud de onda continua de 650 nm-780 nm-860 nm, una potencia de 0.20mW -0.20mW - 100 mW y dosis de energía total de 25 J/cm² - 5 J/cm² - 25 J/cm² respectivamente. Encontraron que, al irradiar con una longitud de onda de 780 nm, potencia de 0.20 mW y 5 J/cm² se obtienen efectos bioestimulantes; concluyeron de esta manera que

la fotobiomodulación es eficiente para lograr un incremento en la aceleración del movimiento dental, lo cual se hace más evidente después de tres meses de tratamiento ortodóncico.

Doshi-Mehta y cols. reportaron en el 2012, que la terapia con la fotobiomodulación se genera un aumento de manera fisiológica en la tasa de movimiento dental durante el tratamiento ortodóncico, asimismo causa un efecto analgésico durante este. Incluso indagó sobre los posibles efectos adversos ocasionados por la fotobiomodulación en ligamento periodontal y hueso alveolar de la zona expuesta, tomó radiografías periapicales encontró que no causa efectos adversos en el periodonto o vitalidad de los dientes; por lo tanto, se puede emplear de manera segura y habitual. (69)

Moaffak y cols. (70) después de irradiar con láser Ga-Al-As con un protocolo de una longitud de onda de 830 nm y 2 J de energía a 26 pacientes con el objetivo de analizar el efecto dada por la fotobiomodulación con respecto a la aceleración del tratamiento en la etapa inicial. Los pacientes presentaban un apiñamiento en el segmento anterosuperior con 3 a 5 mm de apiñamiento, observaron que efectivamente disminuyó la duración de la fase 1 del tratamiento (alineación y nivelación), hubo una disimilitud de 28 días entre ambos grupos de estudio (experimental y control), es decir, hubo una disminución del tratamiento total casi 26% al utilizar fotobiomodulación.

4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación.

Uno de los usos de la fotobiomodulación es coadyuvar en la aceleración en el proceso de cicatrización en heridas ocasionadas u originadas en posterior a la cirugía ortognática, periodontal o bien como mantenimiento del periodonto durante la aplicación de fuerzas ortodóncicas. A los fibroblastos gingivales y periodontales se les atribuye que participan en la producción de elastina, colágeno y proteoglucanos los cuales son considerados elementos importantes en la estructura del tejido conectivo en periodonto.

Al efectuar una revisión a la literatura existente actualizada se encontraron reportes de los efectos de fotobiomodulación en las diferentes células participes en el movimiento dental ortodónico (fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos), sin embargo, no se ha podido concluir de su efectividad debido a no existir un protocolo de estandarizado con respecto a las distancias, longitud de onda, tiempo de irradiación, técnicas manuales, así como la comprobación de las características adecuadas de la fuente de emisión de láser de baja intensidad utilizado en distintos artículos.

Esto subraya la necesidad de establecer un protocolo de cultivo celular en la FEBUAP para poder así tener las bases para realizar mayor cantidad de investigaciones *in vitro* y así efectuar el posterior uso *in vivo*.

Además, los efectos de la aplicación de la terapia con láser de baja intensidad sobre las características morfológicas, metabólicas y funcionales de los fibroblastos nos llevan a la exigencia de caracterizaron los equipos láser para poder tener la seguridad de su correcta emisión. El entendimiento de estos resultados proporcionará bases científicas para encaminar la aplicación clínica de la terapia láser y homogenizar los parámetros que regulen estas variables. Es de suma importancia estudiar los fibroblastos del ligamento periodontal, debido a que su primordial función es sostener y preservar los órganos dentales, así como las estructuras circundantes. Además, que fortalecer la salud periodontal favorecerá el éxito durante y después del tratamiento.

Establecer las variables y procedimientos del cultivo celular y la fotobiomodulación resultaría beneficioso para incentivar estudios secuenciales o anidados para determinar el efecto bioestimulador del láser de baja intensidad en células pertenecientes a la mucosa oral, sobre todo las que están involucradas en el movimiento ortodóncico.

Debido, a lo anteriormente mencionado, nos surgen las siguientes preguntas:

-¿Es posible realizar un protocolo de cultivo de fibroblastos periodontales criogenizados en la FEBUAP?

-¿Los equipos láser con los que cuenta la FEBUAP emiten la longitud de onda y demás parámetros especificados por el fabricante?

5. Justificación.

Los mayores aportes en el área de investigación odontológica y en general se comienzan en cultivos celulares, los cuales nos permiten la simulación *in vitro* de numerosas situaciones, patologías, ambientes, etc. aplicables en distintos campos médicos. Con este trabajo se pretende realizar un aporte a la FEBUAP al establecer un protocolo de cultivo de fibroblastos gingivales, lo cual permitirá desarrollar una serie de trabajos de investigación en distintas áreas donde sea requerido.

Para reducir el tiempo del tratamiento de ortodoncia se requiere la aceleración, o bien, aumento del movimiento dental, para llevar a cabo esto es necesario iniciar esta aceleración desde nivel celular. El empleo de fotobiomodulación ha sido aceptado como un método seguro y eficaz en pro a la aceleración del tratamiento de ortodoncia, así como, para la disminución del dolor a lo largo de este, en el cierre de espacios, ajuste, en trastornos en la articulación temporomandibular (ATM) y etapa final del tratamiento ortodóncico. Dichos beneficios se obtienen sin someter al paciente a estrés debido a que no es necesario un procedimiento quirúrgico como en otros tratamientos además de no causar efectos sistémicos negativos en el paciente. También se ha demostrado los efectos bio-estimuladores sobre las células involucradas en el movimiento dental sin causar citotoxicidad.

Al realizar la aplicación de láser de baja intensidad en la zona de interés se irradian todas las células involucradas en el movimiento dental durante el tratamiento.

Sin embargo, la falta de una caracterización metodológica donde se confirmen las emisiones de los diferentes parámetros indicados por los fabricantes de los equipos láser dificulta establecer un análisis comparativo de los resultados en la literatura.

Lo anterior destaca la importancia de evaluar los parámetros más importantes de irradiación de manera particular en todos los equipos láser. Es de vital importancia antes de comenzar un proyecto de investigación en el que se vaya a utilizar la fotobiomodulación el cerciorarnos de que se estén emitiendo las dosis

adecuadas con las que se contempla desde un inicio, ya que fallos en las mismas serían un fracaso rotundo en los objetivos que se buscan conseguir al no contar con las especificaciones deseadas.

El propósito de este estudio observacional *in vitro* será establecer un protocolo de cultivo secundario a partir de fibroblastos criogenizados y caracterizar dos equipos láser con diferentes longitudes de onda de 940 nm y 810 nm. Al ser caracterizados se identificará si emiten las características especificadas por los fabricantes, y al crear el protocolo de cultivo de fibroblastos se establecerá un precedente y tendrá repercusión para su uso en futuros proyectos de investigación en la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Tiene como impacto clínico: establecer las bases de un protocolo estandarizado para la realización de un cultivo celular de fibroblastos criogenizados y de esta manera asegurar que se cuente con el material, equipo y conocimiento en los procedimientos para optimizar futuros proyectos de investigación.

Además, la caracterización de los equipos láser nos proporcionará la seguridad de estar empleando artefactos que cumplan con las especificaciones dadas por el fabricante y que un momento dado busquemos se expresen correctamente para poder emplearlos.

Si lo anterior resulta exitoso, esto podría significar un beneficio al paciente en diversos aspectos al trasladarse clínicamente, tales como:

- Disminución en el tiempo de tratamiento ortodóncico.
- Prevención en los efectos indeseados como la caries dental, enfermedad periodontal, reabsorción ósea.
- Comodidad del paciente en sus citas, así como la disminución o inhibición del dolor post activación de los arcos.
- No generar fuerzas de carga en el periodonto.

6. Hipótesis.

Hi:

-Es posible realizar un protocolo de cultivo de fibroblastos periodontales criogenizados en la FEBUAP.

-Los equipos láser con los que cuenta la FEBUAP emiten la longitud de onda y demás parámetros especificados por el fabricante.

Ho:

-No es posible realizar un protocolo de cultivo de fibroblastos periodontales criogenizados en la FEBUAP.

-Los equipos láser con los que cuenta la FEBUAP no emiten la longitud de onda y demás parámetros especificados por el fabricante.

7. Objetivos.

7.1 Objetivo general.

Establecer un protocolo de cultivo de fibroblastos periodontales criogenizados y la caracterización de dos equipos láser de baja intensidad con dos diferentes longitudes de onda continua: 940 nm y 810 nm.

7.2 Objetivos específicos.

- Realizar un protocolo de cultivo celular de fibroblastos gingivales criopreservados
- Evaluar la potencia de dos equipos láser de baja intensidad con dos diferentes longitudes de onda continua: 940 nm y 810 nm.
- Evaluar la longitud de onda de dos equipos láser de baja intensidad con dos diferentes longitudes de onda continua: 940 nm y 810 nm.
- Evaluar la distancia a la que se tendrían que colocar los dos equipos láser de baja intensidad con dos diferentes longitudes de onda continua: 940 nm y 810 nm para poder irradiar dichos cultivos.

8. Materiales y métodos.

8.1 Diseño de estudio.

	Observacional
DISEÑO	Descriptivo
	<i>In vitro</i>

8.2 Población y muestra.

- **Muestreo:** Por conveniencia.
- **Universo:**
 - Cultivos celulares de fibroblastos periodontales sembrados en cajas Petri de 35 mm de diámetro x 15 mm de altura.
 - Equipo láser Biolase Epic X de 940 nm
 - Equipo láser Quantum® IR810 de 810 nm

8.3 Criterios de selección.

- **Inclusión:**
 - Cultivos de fibroblastos periodontales con características deseables. Formaran parte del cultivo aquellas células capaces de progresar en el proceso de disgregación, de adherirse al sustrato y de proliferar.
 - Equipo láser Biolase Epic X de 940 nm
 - Equipo láser Quantum® IR810 de 810 nm
- **Exclusión:** Cultivos de fibroblastos periodontales sin una formación adecuada.
- **Eliminación:**
 - Daño de los cultivos, contaminación de los cultivos o incapacidad de medir las variables de estudio.
 - Otros equipos láser.

8.4 Variables

Tabla 1. Tabla de variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA MEDICIÓN	CATEGORÍA
Fibroblastos gingivales	Tipo celular predominante en el tejido conectivo periodontal que juega un papel central en el mismo.	Observar el efecto proliferativo de los cultivos celulares, a través de porcentaje.	Porcentaje de proliferación (%)	Dependiente
Potencia	Ratio en el cual la energía del láser es emitida.	Medir mediante el potenciómetro que el equipo láser esté emitiendo la cantidad en milivatios (mW) que reporta el fabricante.	Milivatios (mW)	Independiente
Longitud de onda	Distancia física entre dos puntos que se encuentran en el mismo estado de vibración.	Medir mediante el espectrofotómetro que el equipo láser esté emitiendo la cantidad en nanómetros (nm) que reporta el fabricante.	Nanómetros (nm)	Independiente
Distancia	Espacio considerado desde una perspectiva lineal entre un objeto y otro.	Medir a que cantidad de milímetros (mm) se puede irradiar toda la superficie de la caja Petri de cultivo de 35 x 15 mm.	Milímetros (mm)	Independiente

8.5 Concordancia y fiabilidad.

Se tomó un curso por parte del laboratorio Labster teórico-virtual en básicos del cultivo celular, técnica aséptica y dominio de la técnica de utilización de pipetas.

Se capacitó al investigador por un experto para realizar cultivos celulares y para la medición de las variables del estudio.

Se tomó un curso teórico-práctico en la aplicación de láser avalado por el Centro Internacional de Educación en Laser para Odontología (CIELO).

8.6 Ubicación espacio temporal.

- Caracterización de equipos láser Quantum 810 nm y Biolase 940 nm: se elaboró en el Laboratorio de Interferometría ala norte y sur de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas.
- Capacitación en cultivo celular: se realizó en los Laboratorios de investigación de la Facultad de Fisiología de la BUAP.
- Cultivos celulares y aplicación de láser: se realizó en el Laboratorio multidisciplinario FEBUAP.

Las constancias que acreditan dichas capacitaciones se encuentran en el Anexo 2.

9. Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección.

9.1. Fuentes de recolección.

Se utilizaron células fibroblásticas donadas por la Dra. Lía Hoz Rodríguez del laboratorio de biología periodontal en la facultad de odontología división de estudios de posgrado e investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

9.2. Procedimientos y técnicas.

9.2.1. Protocolo para la creación de un cultivo celular a partir de células congeladas.

El procedimiento para realizar el cultivo fue el siguiente:

Transporte de las células.

Se recibió por parte de la Universidad Nacional Autónoma de México un vial criogénico (criovial) a una temperatura de -70°C , se trasladó hacia el laboratorio de usos múltiples de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y fue colocado en una hielera con hielo seco donde se tuvo la menor manipulación posible. Este proceso se muestra en la Figura 3.



Fig. 3. Transporte en hielera con hielo seco de los fibroblastos en su criovial.
Fuente: propia

Almacenamiento de las células.

Una vez en el laboratorio, se llevó el criovial desde la hielera a su lugar de almacenamiento el cual fue un ultra congelador que mantuvo la temperatura deseada para que las células se mantengan congeladas de -70°C .

Elaboración de DMEM-FBS 10%.

El medio de cultivo basal que se utilizó es DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), al contener rojo de fenol ayuda como indicador del pH (se torna amarillo si pH desciende y se torna color rosa cuando aumenta) y también esto protege al cultivo de daño por luz.

Procedimiento para elaborar 500ml de medio de cultivo DMEM-FBS 10%:

1. Se vertieron 450 ml de medio esencial de cultivo en un frasco de cristal estéril graduado para medio de cultivo.
2. Después se agregó 50 ml de suero fetal bovino estéril.
3. Posteriormente se añadió 5 ml de antibiótico combinado con antimicótico al calcular una concentración de 100 u/ml de penicilina.
 - a. Antibiótico combinado está compuesto por:
 - I. Penicilina 10,000 u/ml
 - II. Estreptomina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - III. Anfotericina B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Fórmula para calcular las unidades de penicilina

Concentración: 100 u \rightarrow 1 ml

100 u \rightarrow 1 ml

x \rightarrow 1000 ml

x = 100,000 u para un litro

El antibiótico tiene 10,000 u por 1 ml

10,000 \rightarrow 1 ml

100,000 \rightarrow x

x = 10 ml

Se necesitan 10 ml de antibiótico para 1 litro para obtener la concentración de 100 u/ml

En 500 ml se necesitan 5 ml de antibiótico

Descongelamiento de las células.

Se descongelaron las células para ya cultivarlas. Antes de sacar de su lugar de almacenamiento al criovial se calentó agua a 37-38°C. Se etiquetaron las cajas Petri que se utilizaron para cultivo previo a ser utilizadas, con la información que se muestra en la Tabla 2. Se trabajó en cajas de 35mm x 15 mm con 2 ml de volumen de trabajo.

Tabla 2. *Tabla de información de etiqueta de caja de cultivo.*

Información de etiqueta de cajas de cultivo	<ul style="list-style-type: none">• Tipo celular• Pasaje• Densidad• No. De caja• Nombre del experimentador• Fecha
--	--

El procedimiento que se utilizó para descongelar las células fue el siguiente:

1. Primero se sumergió a baño maría en el agua a 37-38°C el criovial de manera que la parte que contiene células quedó bajo el agua.
2. Después se agitó levemente hacia los lados y en movimientos circulares el criovial manteniéndolo lo más recto posible (sin inclinar o voltear) hasta que quedó una pequeña cantidad de hielo (aproximadamente 2 minutos).
3. En la campana de flujo laminar se llevaron las células hacia la caja de cultivo con una micropipeta con una punta estéril desechable. El procedimiento hasta este punto se muestra en la Figura 4.

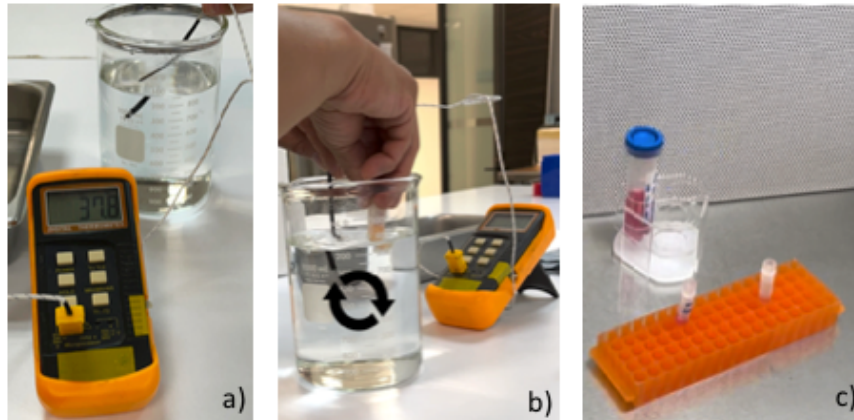


Fig. 4. Se muestra parte del procedimiento de descongelamiento de las células:
 a) Agua a una temperatura de 37-38°C. b) Criovial siendo sumergido y agitado en agua.
 c) Criovial transportado a campana de flujo laminar. Fuente: propia.

4. Tras desechar la punta, se tomó una punta nueva con 2 ml de DMEM-FBS 10% para depositarlo directamente en el criovial y se resuspendió levemente para mezclar las células con el medio nuevo.
5. Posteriormente se llevó el contenido del criovial a la caja Petri, se desechó la punta y después se colocó la tapa de la caja Petri de cultivo. Este proceso se muestra en la Figura 5.

NOTA: todo este proceso contando los dos minutos del descongelamiento de las células debe durar máximo 5 minutos.

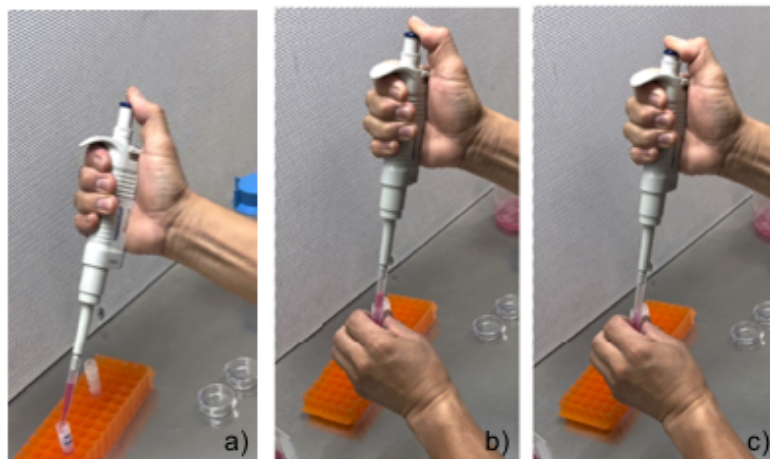


Fig. 5. Se muestra parte del procedimiento de descongelamiento de las células:
 a) DMEM-FBS 10% depositado en criovial. b) y c) Resuspensión de contenido.
 Fuente: propia.

6. A continuación, se observó al microscopio las células para tener un punto de referencia inicial del cultivo.
7. Después se cortó una porción de parafilm con las tijeras y seguidamente se colocó alrededor de la caja Petri.
8. A continuación, se almacenó en la incubadora en un ambiente controlado con una temperatura de 37°C, pH 7.4 y una atmósfera humidificada con 5% CO₂ durante 3-4 horas.
9. Pasado este tiempo se realizó un primer cambio de medio de DMEM-FBS 10%, el cual se describe en la Tabla 3.
10. Luego se observó al microscopio y se procedió a anotar las observaciones. Mostrado en la Figura 5.
11. Finalmente se cambió de medio DMEM-FBS 10% nuevamente a las 24 horas.



Fig. 6. Se muestra al investigador observar las células en el microscopio invertido.

Fuente: propia.

9.2.1.5. Mantenimiento del cultivo celular.

El cambio de medio se realizó cada 2-3 días, el procedimiento de como llevarlo a cabo se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. *Tabla de como realizar el cambio de medio de DMEM-FBS 10%.*

Cambio de medio de cultivo	1. Primero se retiró la caja Petri de la incubadora.
	2. Posteriormente se observó las células al microscopio: Se revisó el hecho de no existir contaminación en el medio, la presencia de células vivas, que tuvieron una forma fusiforme o estrellada, que se encontraron adheridas y se calculó la confluencia por campo visual en 40x y 20x.
	3. Luego se colocó la caja Petri a la campana de flujo laminar.
	4. Se retiró el volumen de trabajo (2 ml) de medio de cultivo con la micropipeta con una punta estéril al inclinar la caja Petri un poco.
	5. Seguido se vació el volumen de trabajo que se retiró en un bote de desechos líquidos y después se desechó la punta.
	6. A continuación, se agregó 2 ml de medio DMEM-FBS 10% con una micropipeta con una punta estéril y luego se desechó.
	7. Por último, se regresó a la incubadora en un ambiente controlado con una temperatura de 37°C, pH 7.4 y una atmósfera humidificada con 5% CO ₂ .

Lavado celular.

Se realizó cuando el medio presentó una alta turbidez o al existir señales de que el cultivo se contaminó. Se realizó tres veces, lo cual es lo máximo que se puede realizar dependiendo de las condiciones del cultivo.

Se necesitó una solución salina buffer de fosfato (FBS 1x), de la cual se presenta su receta en la Tabla 4.

El procedimiento que se utilizó para el lavado celular fue el siguiente:

1. Primero se retiró la caja de Petri de la incubadora.
2. Posteriormente se observó las células al microscopio: Se revisó el hecho de no existir contaminación en el medio, la presencia de células vivas, que tuvieron una forma fusiforme o estrellada, que se encontraron adheridas y se calculó la confluencia por campo visual en 40x y 20x.
3. Luego se colocó la caja Petri a la campana de flujo laminar.
4. Se retiró el volumen de trabajo (2 ml) de medio de cultivo con la micropipeta con una punta estéril al inclinar la caja Petri un poco.
5. Seguido se vació el volumen de trabajo que se retiró en un bote de desechos líquidos y después se desechó la punta.
6. Lavado: A continuación, se tomó una punta nueva y se agregó 1 ml de FBS 1x, después se hizo girar la solución alrededor de la caja Petri con movimientos circulares y movimientos hacia adelante y hacia atrás durante 1 minuto con la precaución de no tirar el contenido y posteriormente se retiró ese 1 ml de FBS 1x. Acto seguido se vació el contenido en el bote de desechos líquidos y se desechó la punta.
7. Se repitió este último paso de lavado por dos ocasiones más (realizar en caso de ser necesario).
8. A continuación, se agregó 2 ml de medio DMEM-FBS 10% con una micropipeta con una punta estéril y luego se desechó.
9. Por último, se regresó a la incubadora en un ambiente controlado con una temperatura de 37°C, pH 7.4 y una atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Tabla 4. *Tabla de elaboración de solución salina buffer de fosfato (FBS).*

Reactivo	Cantidad para añadir (solución 1X)	Concentración final (1X)	Cantidad para añadir (solución 10X)	Concentración final (10X)
NaCl	8 g	137 mM	80 g	1.37 mM
KCL	0.2 g	2.7 mM	2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	10 mM	14.4 g	100 mM
KH ₂ PO ₄	0.24 g	1.8 mM	1.8 g	18 mM
Si es necesario, el FBS se puede suplementar con lo siguiente:				
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.133 g	1 mM	1.33 g	10 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.10 g	0.5 mM	1.0 g	5 mM
El FBS puede prepararse como solución 1X o como solución 10X. Para preparar 1 litro de FBS 1x o 10X, disuelva los reactivos mencionados anteriormente en 800 ml de H ₂ O. Ajuste el pH a 7,4 (o 7,2, si es necesario) con HCL y, a continuación, añada H ₂ O a 1L. Dispensar la solución en alícuotas y esterilizarlas en autoclave durante 20 min a 15 psi (1,05 kg/cm ²) en ciclo líquido o mediante esterilización por filtro. Almacenar el FBS a temperatura ambiente. Fuente: Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.rec8247(71).				

Resembrado (pasaje celular).

Como los fibroblastos tienen un tiempo de duplicación de unas 18 horas, se debió esperar 4 días para realizar el pasaje celular, esto con el fin de poder realizar el conteo.

El punto óptimo para hacer el pasaje celular es cuando se llegó a un 80-100% de confluencia, esto se confirmó al observar pocos espacios entre las células. Como ya se sabe los fibroblastos son células adherentes, por lo tanto, para realizar el pasaje se necesitó separarlas de la superficie de las cajas de cultivo, para esto se requirió un medio de disociación para generar una disgregación enzimática, en este caso se utilizó tripsina 1x al 0.25%.

Tripsinización.

1. Primero se retiró la caja de Petri de la incubadora.
2. Posteriormente se observó las células al microscopio: Observar que no esté contaminado el medio, que existan células vivas, que tengan la misma forma, que se encuentren adheridas y calcular la confluencia 80-100% por campo visual en 40x y 20x.
3. Luego se colocó la caja Petri a la campana de flujo laminar.
4. Se retiró el volumen de trabajo (2 ml) de medio de cultivo con la micropipeta con una punta estéril al inclinar la caja Petri un poco.
5. Seguido se vació el volumen de trabajo que se retiró en un bote de desechos líquidos y después se desechó la punta.
6. Lavado: A continuación, se tomó una punta nueva y se agregó 1 ml de FBS 1x, después se hizo girar la solución alrededor de la caja Petri con movimientos circulares y movimientos hacia adelante y hacia atrás durante 1 minuto con la precaución de no tirar el contenido y posteriormente se retiró ese 1 ml de FBS 1x. Acto seguido se vació el contenido en el bote de desechos líquidos y se desechó la punta.
7. Se realizó un segundo lavado.
8. A continuación, se tomó una punta nueva y se agregó 1 ml de Tripsina 1x al 0.25%.
9. Al momento se inició un conteo en cronómetro por 7 min.

Minuto 1-4: Se dejó reposar la tripsina, en este momento se pudo observar al microscopio como las células se comenzaron a despegar.

Minuto 4-7: Se resuspendió el contenido. Este proceso se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. *Tabla de procedimiento de resuspensión.*

Resuspensión	Se tomó 800 ml de la solución (células y tripsina) en una micropipeta.
	Luego se distribuyó rápidamente el contenido dentro de la caja de Petri en pequeños ciclos de subir y bajar el contenido sin vaciar por completo la punta de la micropipeta para no crear burbujas, de manera que se distribuyó el contenido en partes para cubrir toda la superficie de la caja Petri (de abajo hacia arriba y en sentido a favor de las manecillas del reloj y por todas las orillas).
	Se giró la caja para repetir el proceso anterior en otras zonas hasta que se completó el tiempo de 7 minutos.

10. Posteriormente se tomó una punta nueva y se agregó 1 ml de DMEM-FBS 10% lo cual inactivó la acción de la tripsina.

11. Luego se resuspendió 30 veces.

NOTA: en esta ocasión la resuspensión se realizó sin cronómetro, por lo que se realizó lentamente sin crear burbujas.

12. Después se observó al microscopio: Que no prevaleció contaminación y que las células estuvieran desprendidas del fondo de la caja de Petri.

13. En este momento el cultivo se encontró listo para ser resembrado.

Resembrado: Se calculó la disolución de células a resembrar, con este ejemplo:

1: 10 → 1 parte de células + 9 partes de medio.

1: 4 → 1 parte de células + 3 partes de medio.

Para este protocolo se decidió trabajar con disoluciones de **1:10** por el volumen celular con el que se trabajó.

Procedimiento de resembrado:

Confluencia celular: 100%.

Volumen de trabajo 2ml (2000 μ L).

Disolución de resembrado: 1:10 = 200 μ L de células + 1800 μ L de DMEM-FBS 10%

1. Dentro de la campana de flujo se tomó la caja de Petri con las células previamente tripsinizadas.
2. Posteriormente se resuspendió 3 veces para crear una mezcla homogénea de células.

NOTA: en este paso la resuspensión se hizo al tomar 800 ml con la micropipeta y soltar poco menos de esa cantidad en la misma zona que se tomó, se giró la caja de igual forma. Esta resuspensión se realizó por el hecho de que las células por gravedad se van al fondo de la caja Petri, entonces se realizó para poder tener más o menos la misma confluencia celular en todas las cajas en donde se resembró.

3. Se tomó 200 μ L de las células y luego se pasó a una caja Petri nueva previamente etiquetada.
4. Después se vertió 1800 μ L de DMEM-FBS 10% en la caja donde se resembró el contenido celular.
5. A continuación, se observó al microscopio: que las células no tuvieron contaminación y disminuyó la concentración inicial del resembrado.
6. Se colocó la caja Petri en incubadora en un ambiente controlado con una temperatura de 37°C, pH 7.4 y una atmosfera humidificada con 5% CO₂.
7. Finalmente se cambió de medio a las 24 horas y se mantuvo en observación constante.

Recomendaciones en el cultivo celular.

- Revisar el material que se necesita en cada paso y tenerlo listo.
- Aprender a manejar los instrumentos con los que se va a trabajar antes de realizar el cultivo para reducir el riesgo de contaminación.
- Almacenamiento de reactivos: Todas las soluciones que se utilizan se deben mantener refrigeradas (no en congelador).
- Antes de realizar los lavados con FBS 1x sacar la solución 30 minutos antes de ser utilizada ya que al contener cloruro de sodio se pueden formar cristales y al colocar la solución a temperatura ambiente estos se logran deshacer (en caso de que no se deshagan poner a baño maría por unos minutos a 37-38°C.
- Siempre se deberá limpiar las manos y la superficie de trabajo con etanol al 70% (antes, durante y después de trabajar), para evitar contaminación proveniente de afuera de la campana de flujo también se deberá rociar cada objeto con 70% de etanol antes de colocarlo dentro del área de trabajo. Dentro de la campana todo debe permanecer cerrado mientras no este en uso y cada objeto utilizado deberá estar 100% estéril.
- En caso de derramar algún contenido de algo mientras trabajas dentro de la campana limpiar con una toalla de papel rociada con etanol al 70% y desecharla.
- No tocar paredes de frascos, caja Petri, bote de desechos, etcétera a menos que vayas a desechar la punta de la micropipeta: si se va a volver a utilizar y no existe seguridad de haber o no realizado alguna de estas acciones es mejor desechar la punta para no contaminar.
- Las células al estar en crioviales también pueden ser almacenadas y/o transportadas en nitrógeno líquido.

9.2.2. Caracterización de los equipos de láser.

Se realizó una serie de mediciones con el potenciómetro óptico modelo 843-R de la marca Newport™ para medir la potencia de energía del láser y la estabilidad de la misma, y se utilizó el espectrofotómetro BLUE-Wave de la marca StellarNet Inc. de Tampa, Florida en los Estados Unidos para medir la longitud de onda.

Dichas pruebas se realizaron por personal capacitado en dichos aparatos del laboratorio de interferometría ala norte y sur de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

También se elaboró una serie de pruebas para definir la distancia a la que se debe de colocar los equipos de láser para alcanzar a irradiar toda la caja de cultivo de manera homogénea.

Potencia: Para realizar sus pruebas se utilizó el potenciómetro óptico modelo 843-R de la marca Newport™ para medir la potencia de energía del láser y la estabilidad de la misma. Este dispositivo es mostrado en la Figura 7.



Fig. 7. Potenciómetro óptico modelo 843-R de la marca Newport™.

Fuente: propia.

Este dispositivo tiene dos modalidades una para longitudes de onda por debajo de 600 nm y otro en el rango de 600 a 1500 nm, entonces primero se calibró para mediciones entre 600 y 1500 nm, siguiendo las especificaciones de la longitud de onda del fabricante. Después de calibrado el potenciómetro se eliminaron todas las fuentes de luz presentes, lo cual originó que el equipo tome como su base todo el medio ambiente y no detecte ninguna otra luz que no sea la emitida por el láser.

Posteriormente se colocó enfrente del láser de tal manera que en el centro del detector pueda incidir la luz del láser y de esta manera el potenciómetro reconoció la potencia y la registró mediante su pantalla. Las medidas realizaron a diferentes distancias, llegando a ser la máxima de 95 mm, y se ambos equipos láser se midieron en las potencias de 100 y 200 mW. Estos datos se registraron y se verificó su coincidencia con la potencia que marcaba el láser estar emitiendo.

Longitud de onda: Para comprobar que los equipos láser emiten la longitud de onda que se reportó de fábrica se utilizó el espectrofotómetro BLUE-Wave de la marca StellarNet Inc., mostrado en la Figura 8, el cual es un instrumento de fibra óptica portátil diseñado para realizar dichas mediciones ya que tiene rangos de medida desde 200 nm hasta 1150 nm, las cuales entran dentro de las longitudes de los equipos láser de la investigación.

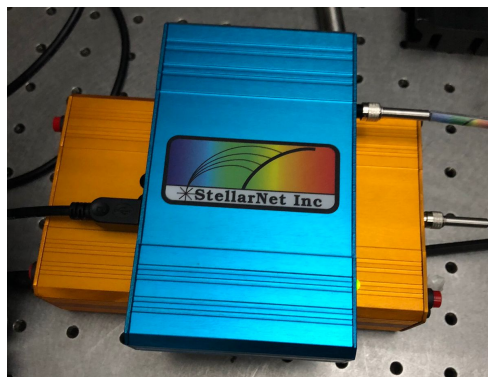


Fig. 8. Espectrofotómetro BLUE-Wave de StellarNet Inc.

Fuente: propia.

Se colocó el láser en una base fija conectada al espectrofotómetro frente a un detector de luz para captar la longitud de onda.

Después la fuente de datos del espectrofotómetro (de color azul en la Figura 6), la cual detectó la luz por medio de salidas con cables de fibra óptica donde los extremos de cada uno presenta un lente y que al momento de alinearlos se realizó la detección de la luz por medio de la fuente de luz (color naranja en la Figura 6), donde un cable recibió la luz y el otro almacenó esa información para transmitirla a su vez por al Software SpectraWiz, que nos mostró una serie de datos, los cuales se almacenaron y posteriormente se graficaron.

Distancia: Se realizaron pruebas para medir la distancia a la que se debe de colocar los equipos de láser para para optimizar y garantizar una exposición a irradiación a toda la caja de cultivo de manera homogénea.

El procedimiento se realizó con base a que el diámetro de la caja Petri de cultivo es de 35 mm, por lo que en una hoja que posteriormente se pegó a una base colocada en un riel graduado en milímetros capaz de desplazarse en línea recta, se dibujó una circunferencia con este diámetro y dentro de la misma se replicó un círculo de 25 mm y otro de 15 mm de diámetro, únicamente para tomarlos como referencia del tamaño que abarcó el láser mientras se aumentó la distancia.

El círculo de 15 mm de diámetro se consideró como el primer círculo, el de 25 mm como el segundo círculo y el de 35 mm como el tercer círculo, que era el tamaño de la caja Petri, el cual se buscó abarcar en su totalidad por la luz del láser.

Se procedió colocar el láser en un soporte y se alineó con la base que contenía el círculo a una distancia de 0 mm y tocando el centro de los círculos. Posteriormente se prendió el láser y se anotó a cada 5 mm de distancia que tanto cubría el láser el spot de las circunferencias hasta que se cubrió por completo. Este proceso se ilustra en la Figura 9.

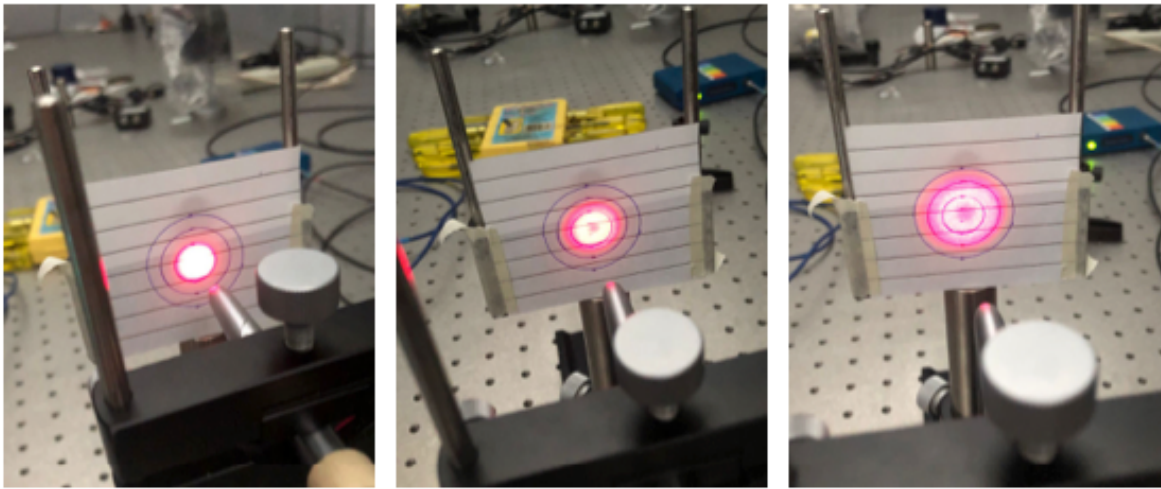


Fig. 9. Pruebas de láser a distintas distancias para alcanzar a cubrir el área total de caja Petri. Fuente: propia.

9.3. Recursos materiales

9.3.1. Materiales e instrumentos

- Campana de flujo laminar
- Incubadora CO₂
- DMEM-FBS 10%
- Microscopio Invertido
- Refrigerador
- Ultracongelador
- Cámara de Neubauer
- Hielera con hielo seco
- Termómetro
- Esterilizador
- Bomba de vacío
- Láser Biolase Epic X
- Láser Quantum R-810
- Frascos de vidrio 500 ml
- Micropipeta
- Puntas de pipeta 1000µL y 200µL
- Cajas Petri 35 x 15 mm
- Suero fetal bovino
- Plumón
- Suplementos (antibióticos)
- Tripsina 1x al 0.25%
- Jeringas
- Agujas
- Bote para desechos líquidos y sólidos
- Criovial de fibroblastos gingivales
- Solución salina buffer de fosfato (FBS 1x)

9.4. Recursos financieros.

- Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Estudiante de posgrado por medio de la beca otorgada por CONACYT

9.5. Recursos humanos.

- Tesista: María Sarahí Chávez Sornia
- Director de tesis: M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez
- Asesor disciplinario: M.O. Laura Mónica López Pérez Franco.
- Director metodológico: M.E. Brenda Eréndira Castillo Silva

9.6. Ética y Bioseguridad del estudio.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la protección y salud ambiental y el manejo de residuos peligrosos biológicos-infecciosos, la clasificación del tipo de residuos fue catalogada como cultivos y cepas de agentes infecciosos, el cual en su estado líquido se guardó en recipiente hermético color rojo, el cual puede ser desechado hasta ser llenado al 80% de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas hasta ser llevado a un sitio de desecho autorizado por las autoridades competentes (72).

También de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-EM-001-SSA1-2012, Que especifica las características técnicas y científicas que deben los cultivos celulares para cumplir para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Se monitoreó la viabilidad celular, estableciendo los controles necesarios. Se siguió una serie de controles y procedimientos establecidos para minimizar los riesgos por contaminación. Y el equipo de cultivo siempre fue limpiado después de su uso (73).

9.6.1. Exposición a luz láser infrarroja

Los láseres terapéuticos con longitudes de onda de menos de 500 mW generalmente son inofensivos y están clasificados como dispositivos de bajo riesgo por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (74).

Se ha establecido que la fotobiomodulación no representa una amenaza hacia la salud del operador, del mismo modo, no suscita repercusiones citotóxicas o apoptosis de las células de estudio (75).

Se ha mencionado, únicamente posible daño en retina ocular al observar directamente la luz láser, por lo que se hace hincapié en el uso de lentes protectores para el operador y asistente que sean específicas para la longitud de onda (76).

10. Análisis estadístico.

Se importaron los datos a una hoja de Excell para reportar la estadística descriptiva simple.

11. Resultados.

11.1. Resultados del cultivo celular.

Descongelamiento: Se observó que los fibroblastos después de ser descongelados tuvieron una confluencia del 85% por campo de visión al ser observados al microscopio, se identificó la presencia de células despegadas y en diferentes planos. Su forma es predominantemente redondeada como se puede observar en la Figura 10.

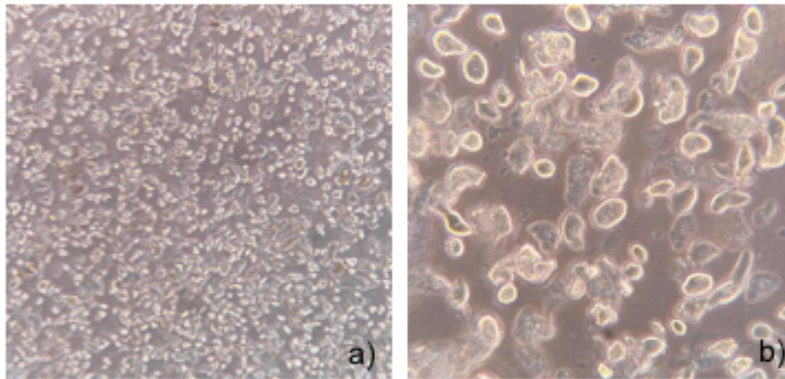


Fig. 10. *Fibroblastos después de ser descongelados: a) Vista 20x. b) Vista 40x.*

Fuente: propia.

Primer cambio de medio a las 3-4 horas: Posterior al primer cambio de medio se observó que los fibroblastos se comenzaron a adherir, y algunos se encontraron semi-adheridos. Se pudo identificar una confluencia de 40% por campo de visión al momento que fueron observados al microscopio, y se pudieron ver las células despegadas con forma redondeada y las que se comenzaron a adherir de forma elongada o estrellada en el último plano, como se puede observar en la Figura 11.

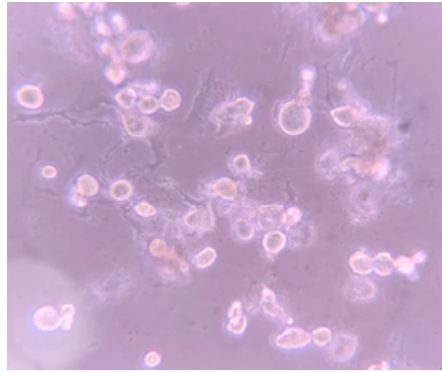


Fig. 11. Vista 40x: Fibroblastos después después del primer cambio de medio a las 3-4 horas. Fuente: propia.

Cambio de medio a las 24 horas: Se observó después del cambio de medio a las 24 horas que los fibroblastos se encontraron en gran parte adheridos y solo una pequeña parte semi-adheridos. Se pudo identificar una confluencia de 60% por campo de visión al ser observados al microscopio y se observaron las células con forma característica de los fibroblastos que es mayormente elongada o estrellada, como se puede apreciar en la Figura 12.

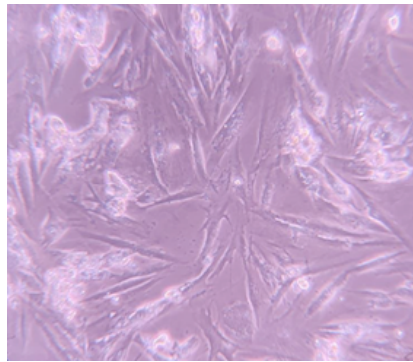


Fig. 12. Vista 40x: Fibroblastos después después de cambio de medio a las 24 horas. Fuente: propia.

Cambio de medio a las 72 horas: Después del cambio de medio a las 72 horas se observó una adherencia total de los fibroblastos y se alcanzó una confluencia de 80% por campo de visión en el microscopio. Se identificó la forma mayormente elongada de las células, por lo que se decidió tripzynisar y realizar dos subcultivos. Esto se ilustra en la Figura 13.

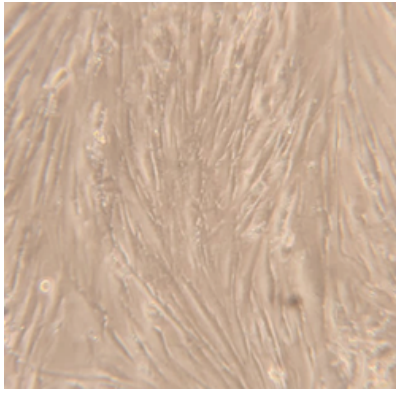


Fig. 13. *Vista 40x: Fibroblastos después después de cambio de medio a las 72 horas.*
Fuente: propia.

11.2. Resultados de la caracterización de los equipos láser.

Se realizó una serie de pruebas de potencia, longitud de onda y distancia por personal capacitado en distintos aparatos en el laboratorio de interferometría ala norte y sur de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas.

11.2.1. Potencia.

Se observó que ambos equipos láser (Quantum® IR810 810 nm y Biolase® Epic X 940 nm) son bastante estables en cuanto a la potencia que emiten, y fluctúan muy poco casi imperceptible al inicio de la emisión de la potencia. Se revisó ambos equipos en las potencias de 100 y 200 mW con emisión continua y pulsada. Los resultados se resumieron en las Tablas 6, 7 y 8, y en las Figuras 14 y 15.

100 mW frecuencia pulsada.

El láser Quantum® IR810 810 nm, como se aprecia en la Tabla 6, reportó valores muy cercanos a los 100 mW que van desde 107.8 a los 112.3 nm. Se puede observar en la Figura 14 la pequeña fluctuación que existió en la frecuencia de los 500 Hz, y después recuperó la constancia de su emisión la cual se conservó en las demás frecuencias.

Por su parte, el láser Biolase® Epic X 940 nm reportó valores desde 88 a los 138 nm, los cuales se colocaron en una desviación mayor que la del láser Quantum del valor deseado de 100 mW, pero aún se mantuvo en cifras cercanas a este. En la Figura 14 podemos observar la fluctuación en las frecuencias de hasta 1,000 Hz y después de eso se mantuvo muy estable la emisión de la potencia.

200 mW frecuencia pulsada.

El láser Quantum® IR810 810 nm, como se aprecia en la Tabla 7, reportó valores muy cercanos a los 200 mW que van desde 178 a los 227 nm. En la Figura 15, al igual que en la potencia de 100 mW, podemos observar la pequeña fluctuación que existió en la frecuencia de los 500 Hz. Después recuperó la constancia de su emisión la cual se conservó en las demás frecuencias.

El láser Biolase® Epic X 940 nm reportó valores desde 168 a los 221 nm, los cuales en esta ocasión se colocaron en una desviación menos que la del láser Quantum del valor deseado de 200 mW, En la Figura 15 podemos observar la fluctuación en las frecuencias de hasta los 100 hasta los 2,000 Hz, después se mantuvo estable en los 4,000 hasta los 8,000 Hz y volvió a fluctuar en los 10,000 Hz.

100 y 200 mW frecuencia continua.

Los valores obtenidos por la frecuencia continua se pueden observar en la Tabla 8, donde el láser Quantum® IR810 810 nm reportó 109.8 mW para la potencia de 100 mW, donde se desvió por 9.8 mW. Y se detectó la emisión de 199 mW para la potencia de 200 mW, donde se desvió por 1 mW. Se afirmó en ambos casos que se encontró registro de valores muy cercanos a las potencias deseadas.

Por su parte, el láser Biolase® Epic X 940 nm emitió una potencia de 105 mW en la de 100 mW y 195 mW para la potencia de 200 mW. Aquí se observó una desviación de 5 mW en ambas potencias, lo cual demostró su estabilidad.

Tabla 6. *Tabla de resultados de potencia a 100 mW con frecuencia pulsada.*

Frecuencia pulsada (Hz)	Quantum® IR 810 nm	Biolase® Epic X 940 nm
100	108	88.2
500	107.8	88
1,000	108.2	88.4
2,000	108.8	99.2
4,000	109.8	105
6,000	110.7	116
8,000	111.6	127
10,000	112.3	138

Tabla 7. *Tabla de resultados de potencia a 200 mW con frecuencia pulsada.*

Frecuencia pulsada (Hz)	Quantum® IR 810 nm	Biolase® Epic X 940 nm
100	181	182
500	178	168
1,000	181	184
2,000	188	192
4,000	199	195
6,000	209	208
8,000	218	219
10,000	227	221

Tabla 8. *Tabla de resultados de potencia a 100 y 200 mW con frecuencia continua.*

	Quantum® IR 810 nm	Biolase® Epic X 940 nm
100 mW	109.8	105
200 mW	199	195

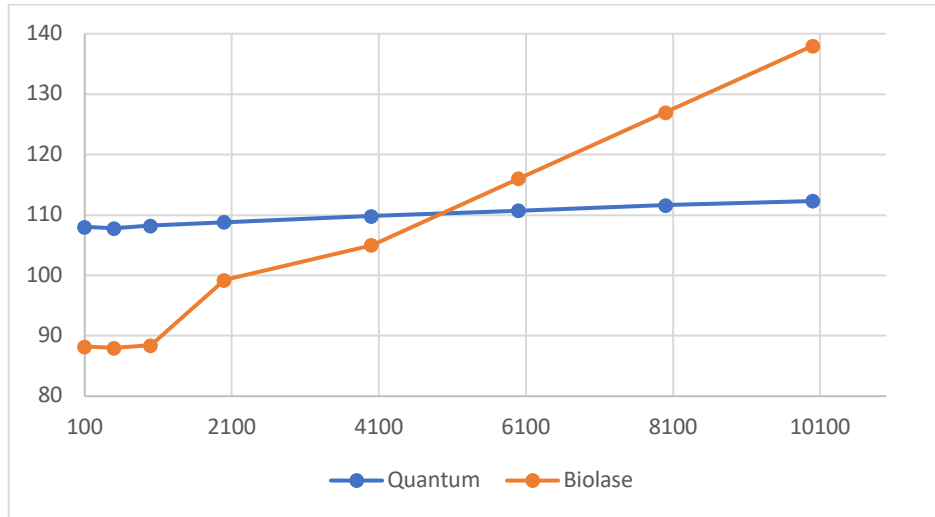


Fig. 14. *Potencia a 100 mW con frecuencia pulsada.*
Fuente: propia.

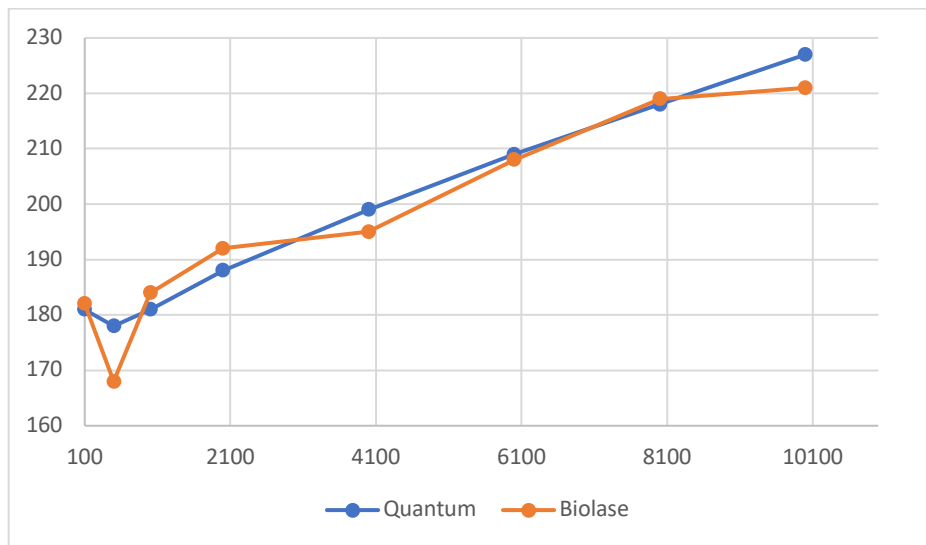


Fig. 15. *Potencia a 200 mW con frecuencia pulsada.*
Fuente: propia.

10.2.2. Longitud de onda.

Con respecto al láser Quantum® IR810, el cual el fabricante reporta tener una longitud de onda de 810 nm con una desviación estándar de ± 10 nm, se puede observar en la Figura 16 realizada con los datos obtenidos por el espectrofotómetro que la longitud de onda de dicho láser es de 808.5 nm, que corresponde a luz invisible infrarroja dentro del espectro electromagnético, lo cual está en los parámetros esperados y reportados por el fabricante, por lo cual se puede tener la confiabilidad en el uso de dicho equipo.

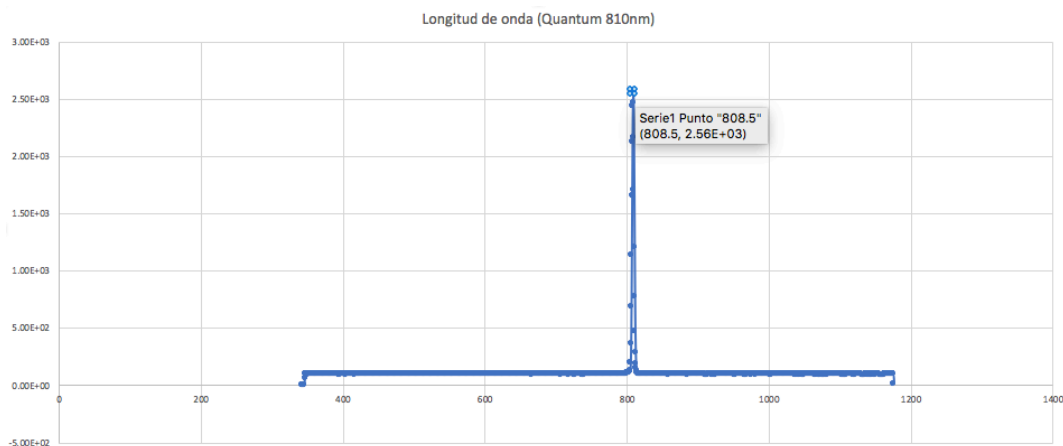


Fig. 16. Longitud de onda de láser Quantum® IR810.

Fuente: propia

Hablando del láser Biolase® Epic X, el cual reporta emitir una longitud de onda de 940 nm con una desviación estándar de ± 10 nm, se realizaron pruebas con las 3 puntas que trae el dispositivo.

Los resultados fueron reportados en las Figuras 17, 18 y 19, donde que sin importar la punta utilizada el espectrofotómetro se reportó una longitud de onda de 636.5 nm, correspondiente a luz visible de color rojo en el espectro electromagnético, lo cual está muy por debajo de los valores reportados por el fabricante y se sale de la desviación estándar por más de 300 nm, lo cual es un gran descubrimiento para nuestra investigación.

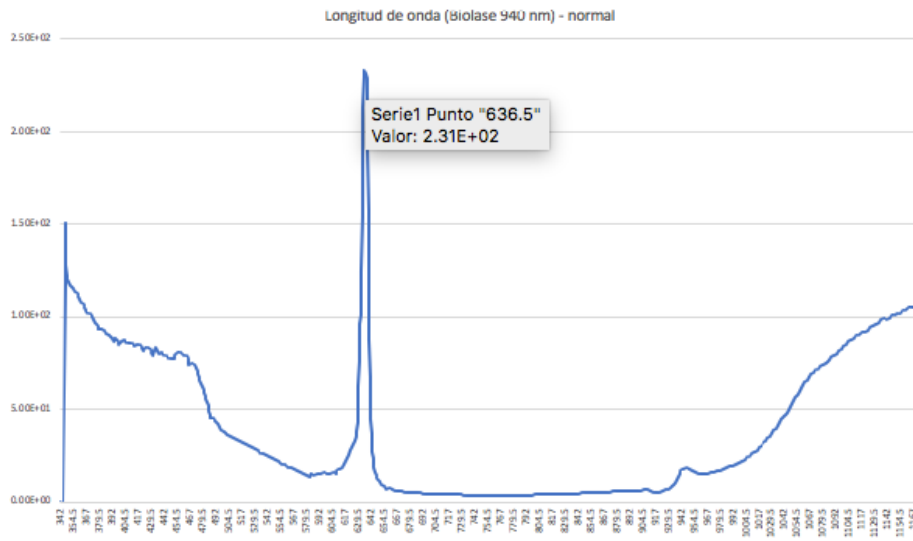


Fig. 17. Longitud de onda de láser Biolase® Epic X: Punta normal.

Fuente: propia.

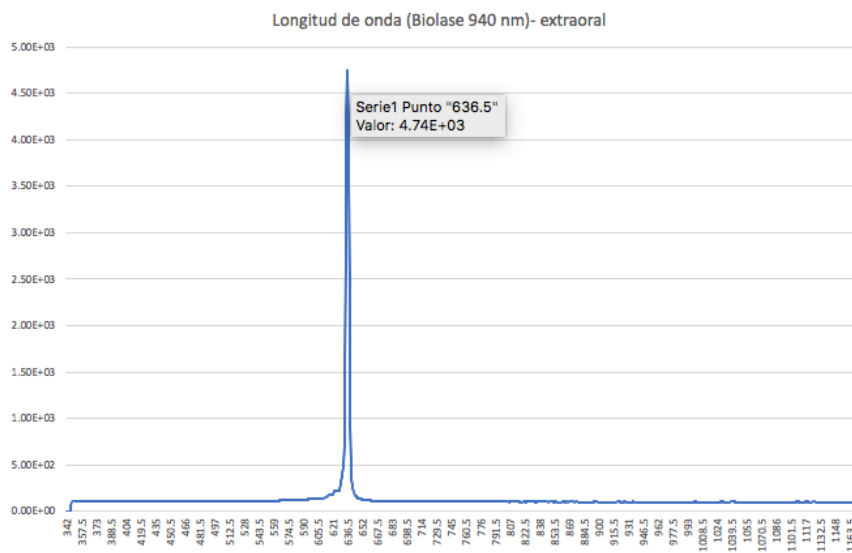


Fig. 18. Longitud de onda de láser Biolase® Epic X: Punta extraoral.

Fuente: propia.

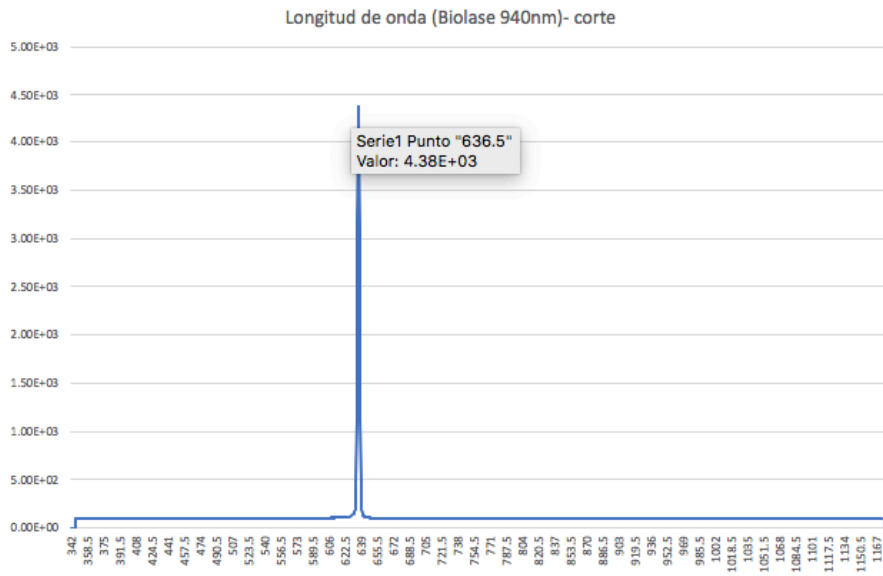


Fig. 19. Longitud de onda de láser Biolase® Epic X: Punta de corte.
Fuente: propia.

10.2.3. Distancia.

Se fue midiendo la distancia con incrementos de 5 mm con el objetivo sujeto a una base sujeta a un riel móvil graduado en milímetros en la parte inferior para realizar la medición de manera más certera.

La distancia ideal obtenida fue la de 65 mm, ya que como se muestra en Figura 19, fue el momento en el que se llenó por completo el diámetro de 35 mm de la caja Petri de cultivo, sobresaliendo solo un poco los bordes.

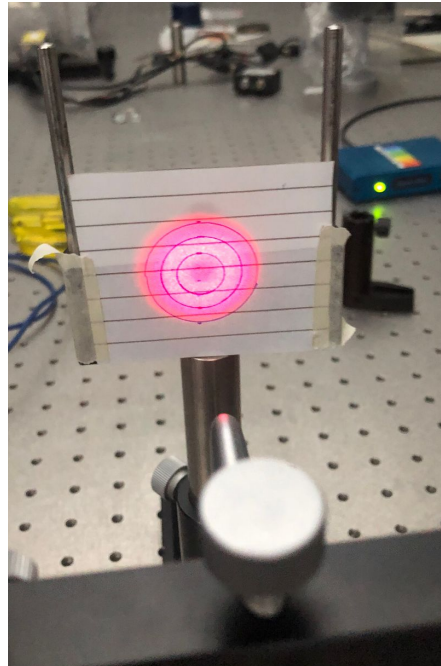


Fig. 20. Prueba de láser a la distancia de 65 mm. Fuente: propia.

Se descartaron las medidas por debajo y por arriba de la elegida (60 y 70 mm) por el hecho de que en la distancia de 60 mm no se llenaba por completo el área deseada y en la distancia de 70 mm sobresalía mucho de los bordes como se puede observar en la Figura 20.

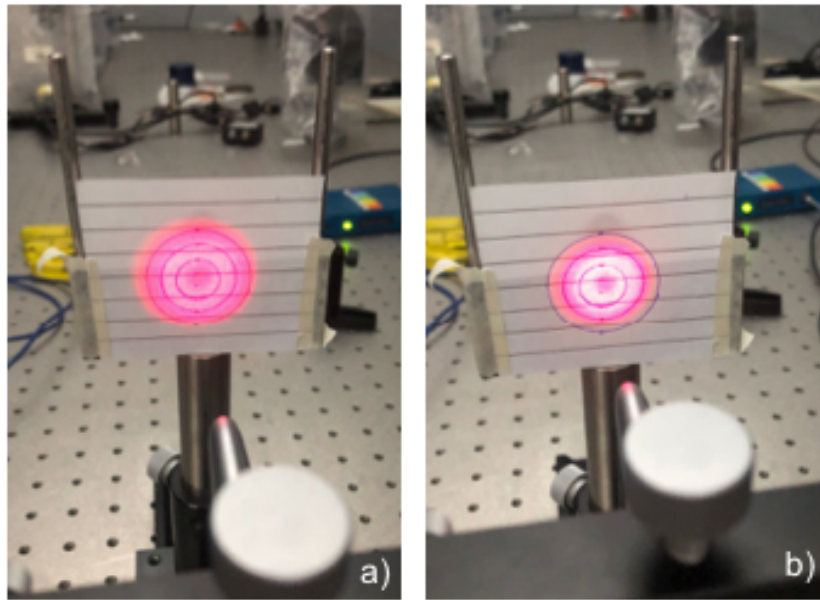


Fig. 21. Prueba de láser a la distancia: a) 70 mm y b) 60 mm. Fuente: propia.

12. Discusión

Los fibroblastos utilizados en este protocolo fueron células ya donadas por la Dra. Lía Hoz Rodríguez del laboratorio de biología periodontal en la facultad de odontología división de estudios de posgrado e investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México, de las cuales, tras realizar el cultivo exitoso se congeló una parte para su posterior utilización en futuros proyectos de investigación en la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad de Puebla, tomando en cuenta que estas células primarias no se pueden cultivar indefinidamente debido al inicio de la senescencia replicativa o aneuploidización, se debe posterior a esto establecer bien un protocolo para la obtención de las mismas tomando una biopsia de tejidos periodontales humanos (77).

Si bien, estas células se pueden obtener de muestras de tejido conectivo gingival de pacientes sistémicamente sanos durante gingivectomías, alargamiento de corona o injerto de tejido conectivo, esto pudo haber representado un aumento en la complejidad de la realización de los cultivos y mayor tiempo utilizado en laboratorio el cual no se encontraba capacitado para su utilización en abril de este año (78).

Los cultivos celulares realizados se realizaron bajo la asesoría del Dr. José Everardo Avelino Cruz quien es experto en dicho tema, y en lo estipulado en distinta literatura (79–81). Sin embargo, existieron aspectos que se encontraban fuera de nuestro control y que sería bueno tomar en cuenta en un futuro como no saber distintos datos sobre las células congeladas (tiempo que llevaban congeladas, el vehículo y concentración a la que se encontraban). Ya que las células cuando se descongelaron y se pasaron a una sola caja Petri existía una gran concentración de las mismas, y como señala Baust y cols. una gran concentración de células en un volumen limitado puede afectar la viabilidad celular, entonces se pudo haber realizado en al menos dos cajas de cultivo para no poner este aspecto en riesgo (80). Por su parte el medio de cultivo está diseñado para satisfacer las necesidades de los fibroblastos en condiciones fisiológicas para que puedan crecer, dividirse y multiplicarse, como las células se enfrían, pasan por un proceso de hipotermia y sus

necesidades y actividad metabólica cambian, por lo que se debe de considerar que el vehículo en el que se criopreservan las células tiene un papel muy importante en el resultado de la viabilidad de dichas células (80). Así mismo, desconocíamos el tiempo total que llevaban las células en criopreservación, pero si sabíamos que llevaban más de 6 meses, y como comentan Digka y cols. no se presenta afectación en la viabilidad de células madre de papila apical dental con 19 meses de criopreservación (82). Según Luo y cols., tampoco se encontró afectación en células madre de la pulpa dental después de 3 meses de pasar por este proceso. (83) A diferencia de Ishak y cols., que si encontraron una disminución en la viabilidad celular tanto para los queratinocitos como para los fibroblastos la cual disminuyó (65 - 89 % \pm 4,5 %) después de 6 meses de criopreservación (84). Así que ese riesgo podía existir en la realización de nuestros cultivos.

Además, la mayoría de artículos reporta que se realiza el cultivo de fibroblastos en placas con 24 y 96 pocillos (85,86), en esta ocasión se decidió realizar el cultivo en placas individuales de 35 mm de diámetro por 15 mm de altura y 2 ml de capacidad de trabajo por las características de la investigación, ya que al momento de realizar la irradiación con los equipos láser no se podía tener un control de no estar irradiando otro pocillo al momento de estar aplicando al pocillo contiguo.

Es importante caracterizar los parámetros del láser como la longitud de onda absoluta y la potencia de energía. Existe una variedad de instrumentos que pueden proporcionar esta información, pero la mayoría de los sistemas no brindan una imagen completa. Los medidores de longitud de onda la miden con mucha precisión, pero proporcionan poca o ninguna información espectral. Para determinar el espectro de un láser (potencia frente a una longitud de onda), es necesario un analizador de espectro (potenciómetro), por lo que fue necesario utilizar dos aparatos distintos para medir estas dos características (87).

Con respecto a la caracterización del láser Biolase® Epic X, se observó una gran diferencia entre la longitud de onda reportada por el fabricante y la arrojada después de la medición con espectrofotómetro, el cual es un instrumento basado en espectroscopía UV-VIS. Un parámetro de medición que ilustra de manera

cuantitativa el desempeño de un espectrofotómetro es la determinación del ancho de banda espectral del instrumento (en este caso 200 – 1150 nm), el cual puede variar de lo dicho por el fabricante, y se tienen que hacer distintas pruebas para comprobarlo, las cuales no se realizaron, entonces deberíamos de asegurarnos que el equipo es conveniente para su aplicación en especial en el láser de 940 nm ya que está por arriba de el de 810 nm y fue el que tuvo mayor margen de diferencia de la longitud de onda dada por el espectrofotómetro y la reportada por el fabricante (88).

El hecho de que el láser de 940 nm no esté emitiendo la longitud de onda reportada, afecta a este protocolo ya que al emitir una longitud de onda de 636.5 nm, además de no estar reportados en la literatura hasta el momento resultados que la involucren con la aceleración del movimiento, según la revisión sistemática elaborada por Domínguez y cols. donde la menor longitud de onda reportada en un estudio clínico aleatorizado es de 670 nm. (89) En este estudio clínico de Domínguez y cols. se encontró una mejoría entre el grupo control y experimental después de 45 días de tratamiento en la aceleración del movimiento dental, sin embargo esta no fue estadísticamente significativa (90), por lo que no se tiene sustento científico para utilizar esta longitud de onda de 636.5 nm en caso de que el láser no pueda ser reparado o no pueda emitir la longitud de onda de 940 nm.

13. Conclusión.

El protocolo establecido para cultivo es adecuado para la línea celular de fibroblastos en criopreservación, ya que se obtuvieron resultados satisfactorios con respecto a la confluencia, adherencia y proliferación.

El láser Quantum® IR810 está en condiciones óptimas para ser utilizado en protocolos de investigación ya que es un láser muy estable y tiene las condiciones reportadas por el fabricante.

Con respecto al láser Biolase® Epic X, en este momento no se encuentra en condiciones de ser utilizado para futuras investigaciones ya que no emite la longitud de onda reportada por el fabricante, por lo que es necesario futuras investigaciones para poder encontrar el problema y darle solución para tener esta herramienta a su disposición en un futuro a su máxima capacidad.

Es importante resaltar que los hallazgos obtenidos en esta investigación servirán para futuros proyectos realizados por los alumnos de la línea de investigación de láser de la terminal de Ortodoncia de la FEBUAP, además de otras terminales donde se realice cultivo celular de fibroblastos y/o la utilización de los equipos de láser antes mencionados.

También es necesario mencionar que esta investigación fue planeada para en un principio realizar estímulos de los dos equipos láser a los cultivos celulares de fibroblastos para detectar una proliferación de los mismos y así poder contribuir a establecer a que longitud de onda existe un beneficio para la aceleración del movimiento, pero por diversas situaciones no se llegó a realizar la aplicación de los estímulos.

14. Anexos.

14.1 Anexo 1

Adicionalmente a las pruebas descritas en esta tesis, se trabajó en el desarrollo de una revisión sistemática como apoyo del proyecto de investigación titulada “Photobiomodulation effects on biomarkers expression in orthodontic treatment movement: a systematic review.” La cual está en proceso de ser enviada a la revista “PLOS ONE” y cuyos resultados han sido presentados el XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología (ENIO) en presentación oral y en el XX Encuentro Nacional de Investigación de Estudiantes y Coordinadores de Posgrados en Ortodoncia en modalidad cartel. Cuyas constancias se presentan en las Figuras 22 y 23 respectivamente.



Fig. 22. Constancia del XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología (ENIO). Fuente: propia.



Fig. 23. Constancia del XX Encuentro Nacional de Investigación de Estudiantes y Coordinadores de Posgrados en Ortodoncia. Fuente: propia.

14.2. Anexo 2.

A continuación, se presentan las constancias que acreditan capacitación en el curso teórico-práctico de aplicación de láser en ortodoncia en la Figura 24, y en la Figura 25 se muestran los resultados del curso por parte del laboratorio Labster teórico-virtual en básicos del cultivo celular, técnica aséptica y dominio de la técnica de utilización de pipeta.



Fig. 24. Constancia de curso Teórico-Práctico de aplicación de Láser en Ortodoncia impartido por el Centro Internacional de Educación en Láser en Odontología (CIELO).

Fuente: propia.

Tu puntuación es: 106 / 140



Se ha guardado tu puntuación y tu progreso al 100 %.

Felicidades, has completado la simulación. ¡Esperamos que la hayas disfrutado y que hayas ampliado tus conocimientos!

a)

Tu puntuación es: 28 / 30



Tu puntuación se ha guardado junto con tu progreso al 100 %.

Felicidades, has completado la simulación. ¡Esperamos que la hayas disfrutado y que hayas ampliado tus conocimientos!

b)

Your Score is: 456 / 480



Tu puntuación se ha guardado junto con tu progreso al 100 %.

Felicidades, has completado la simulación. ¡Esperamos que lo hayas disfrutado y te sientas más sabio ahora!

c)

Fig. 25. Resultados del curso por parte del laboratorio Labster teórico-virtual en: a) básicos del cultivo celular, b) técnica aséptica y c) dominio de la técnica de utilización de pipeta. Fuente: propia.

15. Bibliografía.

1. Segeritz C-P, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Basic Science Methods for Clinical Researchers. 2017. p. 151–72.
2. Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. Basic Principles of Cell Culture. In: Culture of Cells for Tissue Engineering. 2006. p. 3–21.
3. Arango M, Quintero-Ronderos P, Castiblanco J, Anaya J. Cell culture and cell analysis. In: Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. El Rosario University Press; 2013. p. Chapter 45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464/>
4. Bleloch J. Conceptos básicos del cultivo celular: equipos, fundamentos y protocolos. [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://www.news-courier.com/cell-science/articles/cell-culture-basics-equipment-fundamentals-and-protocols-348413>
5. Guercio de Dinatale E. Biología del movimiento dentario ortodóntico: Revisión de conceptos . Vol. 39, Acta Odontológica Venezolana . scielon ; 2001. p. 61–5.
6. Acosta A. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. Univ Odontológica. 2006;25(57):26–33.
7. Ten Cate AR, Deporter DA, Freeman E. The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. Am J Orthod. 1976;69(2):155–68.
8. KÜchler EC, Schröder A, Corso P, Scariot R, Spanier G, Proff P, et al. Genetic polymorphisms influence gene expression of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. Odontology. 2020;108:493–502.
9. Schröder A, Bauer K, Spanier G, Proff P, Wolf M, Kirschneck C. Expression kinetics of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. J Orofac Orthop der Kieferorthopädie. 2018;79(5).
10. Brockhaus J, Craveiro RB, Azraq I, Niederau C, Schröder SK, Weiskirchen R,

et al. In vitro compression model for orthodontic tooth movement modulates human periodontal ligament fibroblast proliferation, apoptosis and cell cycle. *Biomolecules*. 2021;11(7):932.

11. Silfvast WT. *Laser fundamentals*. Cambridge university press; 2004.
12. Coluzzi DJ, Parker SPA. *Textbooks in Contemporary Dentistry Lasers in Dentistry– Current Concepts*. 2017. 397 p.
13. Hooker S, Webb C. *Laser physics*. Vol. 9. Oxford University Press; 2010.
14. Briceño J, Gaviria DA., Carranza YA. Láser en odontología: fundamentos físicos y biológicos. *Univ Odontol [Internet]*. 2016;35(75). Available from: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo35-75.lof>
15. Zohuri B. *Thermal Effects of High Power Laser Energy on Materials*. Springer; 2021.
16. España-Tost AJ, Arnabat-Domínguez J, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Aplicaciones del láser en Odontología . Vol. 9, RCOE . *scielo.es* ; 2004. p. 497–511.
17. Injeyan H, Goodno GD. *High power laser handbook*. McGraw-Hill Education; 2011.
18. Sant'Anna EF, Araújo MT de S, Nojima LI, Cunha AC da, Silveira BL da, Markezan M. High-intensity laser application in Orthodontics. *Dental Press J Orthod*. 2017;22(6):99–109.
19. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(6):705–14.
20. Esper MÂLR, Nicolau RA, Arisawa EÂLS. The effect of two phototherapy protocols on pain control in orthodontic procedure-a preliminary clinical study. *Lasers Med Sci*. 2011;26(5):657–63.
21. Sala O. Capítulo 1: Fundamentos de espectroscopía Raman. *Fundam da espectroscopía Raman e no infravermelho*. 1996;10–34.
22. Monserrat PI, López A, Asesor U, Verónica DG, García V. Diseño y caracterización de láseres de guía de onda Nd: YAG. Centro de

investigaciones en óptica A.C.; 2012.

23. LEON LIZARRAGA G. DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN MEDIDOR DE POTENCIA PARA RADIACION LASER. 2017.
24. Yassaei S, Aghili H, Afshari JT, Bagherpour A, Eslami F. Effects of diode laser (980 nm) on orthodontic tooth movement and interleukin 6 levels in gingival crevicular fluid in female subjects. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2016;31(9):1751–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2045-1>
25. Dominguez A. Cellular Effects related to the clinical uses of Cellular Effects Related to the Clinical Uses. 2014;(January 2009).
26. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008;23(2):211–5.
27. Aras MH, Erkilic S, Demir T, Demirkol M, Kaplan DS, Yolcu U. Effects of low-level laser therapy on osteoblastic bone formation and relapse in an experimental rapid maxillary expansion model. *Niger J Clin Pract*. 2015;18(5):607–11.
28. Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Hebling J, De Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent*. 2012;2012:1–7.
29. Domínguez A, Castro P, Morales M. An In Vitro Study of the Reaction of Osteoblasts to Low-level Laser Irradiation. *J Oral Laser Appl*. 2009;9(January 2009):21–8.
30. Başaran G, Özer T, Kaya FA, Hamamci O. Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2006;130(1):7.e1-7.e6.
31. Ge MK, He WL, Chen J, Wen C, Yin X, Hu ZA, et al. Efficacy of low-level laser therapy for accelerating tooth movement during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2015;30(5):1609–18.

32. Coluzzi DJ, Parker SPA. Textbooks in Contemporary Dentistry Lasers in Dentistry– Current Concepts. 2017. 397 p.
33. Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: A preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2008;23(1):27–33.
34. B Cotler H. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJ Orthop Rheumatol.* 2015;2(5).
35. Heravi F, Moradi A, Ahrari F. The effect of low level laser therapy on the rate of tooth movement and pain perception during canine retraction. *Oral Health Dent Manag.* 2014;13(2):183–8.
36. Ruíz M, Ricse E, Villanueva J y, Torres L. Láser en ortodoncia. *Rev Estomatológica Hered.* 2013;23(3):162.
37. Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, Lopes Da Silva O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):735–40.
38. KAWASAKI K, SHIMIZU N. Effect of low-energy laser irradiation on bone formation during experimental tooth movement in rats. *J Japan Soc Laser Surg Med.* 1999;20(3):215–22.
39. Ueda Y, Shimizu N. Effects of Pulse Frequency of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on Bone Nodule Formation in Rat Calvarial Cells. *J Clin Laser Med Surg.* 2003;21(5):271–7.
40. Long H, Zhou Y, Xue J, Liao L, Ye N, Jian F, et al. The effectiveness of low-level laser therapy in accelerating orthodontic tooth movement: a meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2015;30(3):1161–70.
41. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S KS. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontol Res.* 1997;32:559–69.
42. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989;9(5):497–505.

43. Holmberg Peters F, Zaror Sánchez C, Fabres Suarez R, Sandoval Vidal P. Uso del láser terapéutico en el control del dolor en ortodoncia. *Rev clínica periodoncia, Implantol y Rehabil oral*. 2011;4(3):114–6.
44. Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudás J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Support Care Cancer*. 2012;20(3):523–9.
45. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, et al. Inhibition of Prostaglandin E2 and Interleukin 1- β Production by Low-power Laser Irradiation in Stretched Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res*. 1995;74(7):1382–8.
46. Genovese MD, Olivi G. Use of laser technology in orthodontics: Hard and soft tissue laser treatments. *Eur J Paediatr Dent*. 2010;11(1):44–8.
47. Domínguez A, Clarkson A, Lopez R. An In Vitro Study of the Reaction of Human Osteoblasts to low-level Laser Irradiation. *J Oral Laser Appl [Internet]*. 2008;8(January 2008):235–44. Available from: https://www.researchgate.net/publication/216622273_An_in_vitro_Study_of_the_reaction_of_Human_Osteoblasts_to_low-level_laser_irradiation
48. Frozanfar A, Ramezani M, Rahpeyma A, Khajehahmadi S, Arbab HR. The effects of low level laser therapy on the expression of collagen type I gene and proliferation of human gingival fibroblasts (HGF3-PI 53): In vitro study. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(10):1071–4.
49. Huang TH, Liu SL, Chen CL, Shie MY, Kao CT. Low-level laser effects on simulated orthodontic tension side periodontal ligament cells. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(2):72–7.
50. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):179–84.
51. Pereira AN, De Paula Eduardo C, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):263–7.

52. Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in vitro. *Lasers Med Sci.* 2006;21(1):24–33.
53. Na S, TruongVo T, Jiang F, Joll JE, Guo Y, Utreja A. Dose analysis of photobiomodulation therapy on osteoblast, osteoclast, and osteocyte. *J Biomed Opt.* 2018;23(07):1.
54. Sarver DM. Use of the 810 nm diode laser: soft tissue management and orthodontic applications of innovative technology. Vol. 18, *Practical procedures & aesthetic dentistry* : PPAD. 2006.
55. Eslamian L, Borzabadi-Farahani A, Hassanzadeh-Azhiri A, Badiee MR, Fekrazad R. The effect of 810-nm low-level laser therapy on pain caused by orthodontic elastomeric separators. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):559–64.
56. Eroglu CN, Keskin Tunc S. Effectiveness of single session of low-level laser therapy with a 940 nm wavelength diode laser on pain, swelling, and trismus after impacted third molar surgery. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(9):406–10.
57. Atasoy KT, Korkmaz YT, Odaci E, Hanci H. The efficacy of low-level 940 nm laser therapy with different energy intensities on bone healing. *Braz Oral Res.* 2017;31:1–9.
58. Kim SJ, Chou MY, Park YG. Effect of low-level laser on the rate of tooth movement. *Semin Orthod* [Internet]. 2015;21(3):210–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sodo.2015.06.008>
59. Basso FG, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2016;31(5):973–8.
60. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, D’Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: An in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2003;30(4):353–8.
61. Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res.* 1996;75(3):895–902.
62. Coskun ME, Coskun KA, Tutar Y. Determination of Optimum Operation

- Parameters for Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Based Treatment to Induce Proliferation of Osteoblast and Fibroblast Cells. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(5):246–52.
63. Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci.* 2010;40(3):105–10.
 64. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Protein Synthesis and Ultrastructure of Human Gingival Fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260–5.
 65. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994;14(4):347–54.
 66. Timberlake GT, Enwemeka CS. An inexpensive, automated instrument for laser irradiation of cultured cells. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(3):233–9.
 67. Domínguez Á, Criollo-Gómez W. Estandarización de un protocolo para irradiar cultivos celulares con laser de baja intensidad Standardization of a protocol to irradiate cell cultures with low level laser. 2012;20(2):29–35.
 68. Domínguez A, Bayona G, Casas A. In vitro response of Human Pre-osteoclasts to low intensity Laser irradiation. *J Res Biol.* 2012;2(8):733–41.
 69. Doshi-Mehta G, Bhad-Patil WA. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: A clinical investigation. *Am J Orthod Dentofac Orthop [Internet].* 2012;141(3):289–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.09.009>
 70. AlSayed Hasan MMA, Sultan K, Hamadah O. Low-level laser therapy effectiveness in accelerating orthodontic tooth movement: A randomized controlled clinical trial. *Angle Orthod.* 2017;87(4):499–504.
 71. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Phosphate-buffered saline (PBS) recipe. [Internet]. Vol. 2006, Cold Spring Harbor Protocols. 2006. p. pdb.rec8247. Available from: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247.short>
 72. Federación DO de la. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. 2002 p. 1–9.

73. Federación DO de la. NOM-EM-001-SSA1-2012. 2012 p. 1–34.
74. DiMatteo AM, Rafferty T. Dental lasers. *Insid Dent*. 2012;8(11).
75. Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro . *J Biomed Opt*. 2013;18(12):128001.
76. Markoulli M, Chandramohan N, Papas EB. Photobiomodulation (low-level light therapy) and dry eye disease. *Clin Exp Optom*. 2021;104(5):561–6.
77. Seluanov A, Vaidya A, Gorbunova V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. *J Vis Exp*. 2010 Oct;(44).
78. Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, Pawaputanon Na Mahasarakham C, Kido D, Takeda K, et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201855.
79. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* [Internet]. 2017;53(8):669–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
80. Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017 Dec;53(10):855–71.
81. Vangipuram M, Ting D, Kim S, Diaz R, Schüle B. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J Vis Exp*. 2013 Jul;(77):e3779.
82. Digka A, Gounari E, Kouzi-Koliakou K, Lyroudia K. Effect of Long-Term Cryopreservation on the Stemness of Stem Cells of Apical Papilla. *Int J Dent*. 2022;2022:6004350.
83. Luo L, Zhang Y, Chen H, Hu F, Wang X, Xing Z, et al. Effects and mechanisms of basic fibroblast growth factor on the proliferation and regenerative profiles of cryopreserved dental pulp stem cells. *Cell Prolif*. 2021 Feb;54(2):e12969.
84. M.F. I, Maarof M, M.H. N, Khairul B, L. G, Saim A, et al. Long Term Effect of

Cryopreservation on Primary Human Skin Cells. *Sains Malaysiana*. 2019 Jan 31;48:137–44.

85. Huang R, Zhou Z, Lan X, Tang FK, Cheng T, Sun H, et al. Rapid synthesis of bismuth-organic frameworks as selective antimicrobial materials against microbial biofilms. *Mater Today Bio* [Internet]. 2023;18:100507. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590006422003052>
86. Trussell B, Ward J, Cox M, Tucci M, Benghuzzi H, Hughes J. Investigating initial cell-seeding density and culture period of fibroblast growing on biodegradable tricalcium phosphate lysine disks. *Biomed Sci Instrum*. 2002;38:101–6.
87. Zhang Y, Wang P, Jia G, Cheng F, Feng Z, Li C. A Short-Wavelength Raman Optical Activity Spectrometer with Laser Source at 457 nm for the Characterization of Chiral Molecules. *Appl Spectrosc*. 2017 Sep;71(9):2211–7.
88. Couturier L, Nosske I, Hu F, Tan C, Qiao C, Jiang YH, et al. Laser frequency stabilization using a commercial wavelength meter. *Rev Sci Instrum* [Internet]. 2018 Apr 13;89(4):43103. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.5025537>
89. Camacho AD, Montoya Guzmán D, Velásquez Cujar SA. Effective Wavelength Range in Photobiomodulation for Tooth Movement Acceleration in Orthodontics: A Systematic Review. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg*. 2020;38(10):581–90.
90. Domínguez A, Gómez C, Palma JC. Effects of low-level laser therapy on orthodontics: rate of tooth movement, pain, and release of RANKL and OPG in GCF. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):915–23.