



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Constructo Tisular 3D osteogénico para su probable aplicación en el tratamiento de fisura alveolo-palatina.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**CIRUJANO DENTISTA**

**P R E S E N T A (N)**

**Jiménez Núñez José Cuauhtémoc**

**Director**

**Dr.**

**Raúl Rosáles Ibáñez**

**Dictaminadores**

**Mtra.**

**Arely Montserrat González González**

**Lic**

**Tomás Ernesto Villamar Duque**

**PAPIIT IA207420**

Los Reyes Iztacala, Edo. de México | 12/08/2020





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Proyecto financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación  
e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM, IA207420**

## Índice

Agradecimientos.....	5
<b>Dedicatorias.....</b>	<b>6</b>
<b>Marco teórico</b>	
Ingeniería tisular.....	7
La célula troncal.....	8
-Clasificación.....	8
-Historia.....	9
Andamios.....	11
-Naturales.....	11
-Sintéticos.....	14
-Biosintéticos.....	17
Factores de crecimiento.....	17
Fenotipo celular.....	18
-Inmunomarcaje.....	18
Control de calidad para sustitutos biológicos.....	19
Viabilidad y proliferación.....	20
-Vida y Muerte.....	20
-Azul de Alamar.....	20
Medio osteogénico .....	21
Ensayos para evaluar la inducción al linaje osteogénico.....	22
Anomalías congénitas craneofaciales .....	22
Labio fisurado y paladar hendido.....	23
Fisura alveolo-palatina.....	24
Técnicas de manejo del labio y paladar fisurados.....	24
-Gingivoperiostoplastia.....	24
- Injerto óseo alveolar (Osteoplastia).....	25
Fístulas palatinas recurrentes.....	26
Ingeniería tisular aplicada al manejo del labio y paladar fisurados.....	26
La Policaptrolactona.....	27
-Estudios con células troncales y policaprolactona.....	28
-Estudios con células troncales orales y policaprolactona.....	30
Justificación.....	32
Objetivos .....	33
-Generales .....	33
-Particulares.....	33
<b>Metodología</b>	
-Obtención de células troncales.....	34
-Conteo celular.....	34
-Pruebas inmunohistoquímicas.....	35
- Ensayo de viabilidad Vida y Muerte.....	36
- Ensayo de proliferación Azul de alamar.....	37
- Inducción al linaje osteogénico.....	38
-- Ensayo con rojo de alizarina.....	38
--Ensayo con Von Kossar.....	39
Resultados.....	39
Discusión.....	42

Conclusión .....	44
Bibliografía.....	44

### Índice de tablas

Tabla 1. Origen y potencial de diferenciación de células troncales derivadas de tejidos de cavidad oral.....	10
Tabla 2. Marcadores de células troncales derivadas de tejidos de cavidad oral.....	19
Tabla 3. Sales inorgánicas usadas en el medio inductor.....	23
Tabla 4. Aminoácidos empleados en el medio inductor.....	23
Tabla 5. Vitaminas usadas en el medio inductor.....	23
Tabla 6. Contenidos adicionales en el medio inductor.....	23
Tabla 7. Representación de la modalidad de elaboración de las pruebas de inmunofenotipo.....	37
Tabla 8. Planificación de los ensayos de viabilidad y proliferación.....	38
Tabla 9. Representación de la modalidad de elaboración de los ensayos de viabilidad con el reactivo Vida y Muerte.....	38
Tabla 10. Representación de la modalidad de elaboración de elaboración de ensayos de proliferación con Azul de Alamar.....	39
Tabla 11. Representación de la modalidad de elaboración de las pruebas para inducción al linaje osteogénico.....	39
Tabla 12. Resultados fotográficos de los ensayos de inmunofenotipo. Expresión de los marcadores CD29 y CD90.....	41
Tabla 13. Resultados fotográficos de las pruebas de viabilidad de las células troncales derivadas de cerdo vietnamita a los días 3 y 7.....	42
Tabla 14. Resultados del conteo celular del ensayo Vida y Muerte por medio del software Image J.....	42
Tabla 15. Resultados fotográficos de los ensayos con rojo de alizarina del constructo tisular.....	43
Tabla 16. Resultados fotográficos de los ensayos con tinción Von Kossa del constructo tisular.....	44

### Índice de figuras

Figura 1. Fotografía del andamio de PCL impreso en 3D.....	29
Figura 2. Cámara de Neubauer.....	36
Figura 3. Fotografía macroscópica del constructo con rojo de alizarina a)En medio nutritivo, b)En medio inductor.....	41
Figura 4. Fotografía macroscópica del constructo con Von Kossaa)En medio nutritivo, b)En medio inductor.....	42

### Índice de gráficos.

Gráfica 1. Resultados arrojados de la lectura de las longitudes de onda emitidas en el ensayo de Azul de Alamar junto con células troncales.....	42
--	----

## **Agradecimientos:**

A mis asesores de tesis, Dr. Raúl y Mtra. Arely, quienes fueron muy atentos a mis dudas y siempre me apoyaron con mucha paciencia para que este proyecto saliera adelante. Además, gracias por la motivación que me regalaron en los momentos en los que me quedaba estancado. Les agradezco de todo corazón su apoyo.

A mis dictaminadores, Biól. Tomás, M.V.Z. Lety, por siempre tener la disposición de atender mis dudas y ayudarme en la realización de este trabajo. Gracias también por la gran labor que desempeñan en el Bioterio, definitivamente ustedes son parte fundamental de este trabajo, mil gracias.

Al Dr. Luis Rodríguez, por compartir sus aportaciones en el mundo de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, sus aportaciones también fueron parte fundamental de este proyecto.

Al equipo del Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, por su gran compromiso y apoyo.

A la UNAM que desde el bachillerato me ha formado, primero en la E.N.P 9 “Pedro de Alba” y después en la FES Iztacala, ambos espacios representan para mi algo muy preciado pues se volvieron mi segunda casa, me mostraron un mundo maravilloso por medio de sus profesores, los cuales me han acercado cada vez a la ciencia, parece que el día de hoy es más que obligatorio darle las gracias y demostrarle los resultados de la transformación que logró en mí, y que seguramente no será última vez en la que yo pueda devolverle algo de todo lo que ella me ha dado, seguiré trabajando para enaltecerse cada vez más, querida universidad.

## **Dedicatoria:**

Gracias a Dios, porque en todas sus formas de manifestarse cada día bendice mi vida.

A mi madre, quien es una mujer ejemplar que siempre se ha preocupado por mí, una de las mujeres más responsable y de alma buena, quien desde pequeño me ha enseñado a enfrentar los obstáculos, a trabajar y a disfrutar. Te amo mamá.

A mi padre, quien, con una forma muy peculiar de demostrar su amor, me ha impulsado, me ha hecho fuerte, y ha sido un gran apoyo en mi vida. Te amo papá.

A mis hermanas, Mirna y Aura, quienes son mis confidentes y cómplices de mis locuras, en quienes siempre puedo confiar, que son mi apoyo y mi guía y que siempre me han cuidado y hecho sentir amado. Las amo.

A Chabela, tía Pilar, abuela Sofi, que, en cada una de estas mujeres ejemplares, encuentro amor, fortaleza, aprendizaje, y me llenan siempre de gran felicidad.

A tía Lú, y Clara, que el tiempo que tuvimos la oportunidad de compartir estuvo lleno de mucho cariño, muchas sonrisas, mucho "apapacho" pero sobre todo de mucho aprendizaje y mucha motivación para ser cada día mejor.

A mis grandes amigos, quienes me han enseñado a crecer, han estado conmigo en las buenas, en las malas y en las peores, agradezco la mano que me han tendido siempre, los momentos de risas, los de lágrimas, los de enfado, los de reconciliación, los de apoyo... y tantos momentos y experiencias en las cuales he disfrutado y aprendido siempre.



## Marco Teórico

### Ingeniería Tisular

La ingeniería tisular es un área multidisciplinaria que aplica los principios de las ingenierías y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que sean capaces de mantener, restaurar o mejorar las funciones de un tejido u órgano dañado (Langer, 1993). La ingeniería tisular aplica los principios de la medicina regenerativa para restaurar la función de órganos o tejidos dañados mediante la combinación de células, biomateriales y factores de crecimiento. Así, a partir de las habilidades de médicos, biólogos celulares, bioingenieros y científicos de materiales, se unen esfuerzos con el fin de recrear la arquitectura tridimensional propia de un tejido u órgano, con los tipos celulares apropiados, los nutrientes necesarios y los factores de crecimiento que permiten la proliferación, la diferenciación y la función normal (Atala, 2004).

Existen tres estrategias generales en la aplicación de la ingeniería tisular.

- 1- **Células aisladas o sustitutos celulares:** Consiste en un procedimiento en el cual las células son primero aisladas, mantenidas y tratadas *in vitro* y después se incorporan a la circulación sanguínea o se implantan en determinadas localizaciones del organismo para poder suplir la deficiencia estructural o funcional que exista. La ventaja de la aplicación de este procedimiento es que se evita el acto quirúrgico y por ende las complicaciones propias de éste, además de que las células se pueden manipular antes de su infusión. Las limitantes que puede presentar este procedimiento son el posible rechazo inmunológico y el que las células no lleguen en cantidad y/o calidad suficiente al sitio receptor y por lo tanto no cumplan su objetivo (Langer, 1993).
- 2- **Sustancias inductoras de tejido:** Consiste en la utilización de señales moleculares, fundamentalmente los factores de crecimiento, que tienen la capacidad de estimular a las células troncales pluripotentes o células troncales progenitoras para potenciar su proliferación, su diferenciación y su distribución. La incorporación de las señales moleculares a la región puede realizarse directamente o mediante la transferencia de células capaces de segregar tales factores. El éxito de esta estrategia depende de la pureza, ubicación y producción a gran escala de las moléculas señalizadoras apropiadas, así como el método para administrar tales moléculas (Langer, 1993).
- 3- **Células colocadas dentro de matrices:** Normalmente, las células se encuentran en contacto con el medio por una membrana selectiva permeable que permite el paso de nutrientes y la eliminación de desechos, además de eso, contiene receptores que la identifican ante las células inmunes para que estas no sean destruidas. Este principio se aplica en esta estrategia mediante la elaboración de constructos en los cuales, se aíslan las células del organismo y se sitúan junto con factores de crecimiento, en un biomaterial natural o sintético que tendrá la función de proteger contra la respuesta inmune que pueda llegar a rechazar el implante (Langer, 1993).



## La célula troncal

La célula, es el punto de partida de la ingeniería tisular, corresponde a la unidad estructural, funcional y de origen de los sistemas vivos que puede constituir por sí sola un organismo o participar junto con otras células en la formación de organismos más complejos (Solomon, 2013).

Una célula troncal es aquella que tiene la capacidad para llevar a cabo divisiones asimétricas. Estas células tienen potencial para autorrenovarse y diferenciarse hacia distintos tipos de células más especializadas no sólo morfológicamente, sino también a nivel funcional (Zhao, 2011)

### Clasificaciones de las células troncales.

De acuerdo con su origen, las células troncales pueden clasificarse en:

1. **Embrionarias:** Se derivaron originalmente de la masa celular interna del embrión al estado de blastocito, esto es, dependiendo de la especie, de cuatro a siete días después de la fecundación. Estas son pluripotentes, pues pueden generar todos los tipos celulares derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo. A pesar de esta gran virtud, su aplicación práctica en la ingeniería tisular y terapia celular es limitada debido a su alto riesgo de tumorigenicidad y a cuestiones éticas y legales asociadas (Luzzani, 2017)
2. **Adultas:** Los organismos adultos presentan una población residente de células troncales adultas que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. Son multipotentes, y sobre ellas cabe destacar que su potencial de diferenciación queda restringido a la capa embrionaria de la que procede. A diferencia de las células troncales embrionarias, la manipulación de estas presenta menores limitantes éticas y legales, sin embargo, es complejo obtenerlas en grandes cantidades, presentan poca duración en los cultivos experimentales y las células cosechadas pueden llevar con ellas mutaciones que no permitan una buena manipulación ni aplicación de éstas (Anderson, 2001)
3. **Células pluripotentes inducidas:** Son células extraídas de cualquier tejido de un niño o un adulto que se ha modificado genéticamente para que se comporte como una célula troncal embrionaria. Como sugiere el nombre, estas células son pluripotentes, lo cual implica que tienen la capacidad de formar todos los tipos de células adultas. Las células troncales pluripotentes inducidas, reprogramadas a partir de células somáticas con factores definidos, son prometedoras para la medicina regenerativa como fuente renovable de células autólogas (Zhao, 2010)

De acuerdo con su plasticidad se pueden clasificar en:

1. **Totipotenciales:** Son capaces de crecer y formar un organismo completo debido a su capacidad para generar tanto tejido embrionario como extraembrionario. En sentido estricto, cigoto, blastómeros y células de la mórula constituirán a las células troncales totipotenciales (Chopra, 2013)
2. **Pluripotenciales:** Son aquellas con la capacidad de diferenciarse a cualesquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, por lo tanto, a los tejidos procedentes de cualquier capa embrionaria e incluso las células germinales. Sin embargo, no son capaces

de generar un nuevo organismo, ya que son las que integran sólo la masa celular interna del blastocito (Li,2014)

3. **Multipotenciales:** Son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiéndose sólo a tejidos de una misma capa embrionaria. Estas células una vez desarrolladas se autorrenuevan a lo largo de toda la vida del individuo, a diferencia de las totipotenciales y pluripotenciales que solo se encuentran en la etapa embrionaria (Farini, 2014)
4. **Unipotenciales:** Sólo cuentan con la capacidad de formar un único linaje celular (Senoo, 2013).

### Historia de las células troncales.

El interés que despertaron las células troncales para su aplicación en la medicina regenerativa comenzó gracias a los trabajos realizados por Friedenstein, *et al*, en 1970, el cual, en ensayos con roedores, describió por primera vez una población de células adherentes de médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein. 1970). Por su parte, otros investigadores como Owen, en colaboración con Friedenstein en el año de 1987, descubrieron que las células de médula ósea tenían la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo, y que a partir de una pequeña cantidad de células de médula ósea inoculadas en cámaras de difusión en modelos *in vivo*, se generaba una gran cantidad de células estromales, lo que permitía visualizar el gran potencial de proliferación y diferenciación de estas células, sin embargo, a pesar de este gran avance, faltaban estudios con unidades aisladas que permitieran establecer si los osteoblastos, condrocitos y fibroblastos que originaban estos tres tejidos provenían de un progenitor común en la médula ósea o de diferentes progenitores estromales (Owen, 1987). Friedenstein abordó esta incógnita y en 1988 encontró que las colonias de morfología fibroblastoide, formadas al cultivar *in vitro* una suspensión de células provenientes de la médula ósea, derivaban de un solo progenitor, las CFU-F, demostrando también su gran capacidad proliferativa, su capacidad de autorrenovarse y su multipotencialidad. Con base en la evidencia experimental obtenida hasta ese entonces, a finales de los 80's Owen y Friedenstein propusieron que existía una célula troncal presente en el tejido conjuntivo asociado a la médula ósea, capaz de dar origen a distintos linajes celulares, entre los que se incluía el osteogénico, denominando entonces a estas células como "Células troncales estromales". Hasta ese momento, todos los estudios realizados habían sido en modelos animales, sin embargo, años más tarde, Caplan en la década de los 90's, logró obtener y diferenciar células troncales mesenquimales de humanos adultos obtenidas de cresta iliaca y células de médula de la epífisis femoral (Bianco, 2008).

A partir de estos sucesos, se comenzaron a buscar nuevas alternativas de obtención de células troncales que ofrecieran un método de obtención más sencillo, por lo que el Dr. Gronthos investigó las células de la pulpa dental, y en el año 2000, aisló las primeras células mesenquimales de origen dental, a las cuales denominó "Dental Pulp Stem Cells" (DPSC). Este estudio fue trascendental para la comunidad odontológica, ya que después de este trabajo, se encontraron otras fuentes de obtención de células mesenquimales a partir del tejido dental, lo que implica una obtención más fácil en comparación con las células troncales obtenidas de médula ósea, cordón umbilical y embrionarias (Scheller, 2009).

Actualmente, la investigación en células troncales provenientes de la cavidad oral ha avanzado de manera significativa, habiéndose ampliado el margen de origen de estas en cavidad oral (Tabla 1).

Tejido	Descubrimiento	Potencial de diferenciación
Células troncales de pulpa dental Dental Pulp Stem Cells ( <b>DPSC</b> )	Gronthos, S, <i>et al.</i> (2000).	Adipocitos Condrocitos Osteoblastos Odontoblastos
Células Troncales del ligamento periodontal Periodontal Ligament Stem Cells ( <b>PLSC</b> )	Seo, J, <i>et al.</i> (2004).	Cementoblastos Adipocitos -Fibroblastos
Células troncales de dientes temporales exfoliados Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth ( <b>SHED</b> )	Miura, M, <i>et al.</i> (2003).	Neuronas Adipocitos Osteoblastos Odontoblastos
Células Troncales de la Papila Apical Stem Cells of Apical Papilla ( <b>SCAP</b> )	Sonomaya, W, <i>et al.</i> (2006).	Osteoblastos Odontoblastos Adipocitos
Células Precursoras del folículo dental Dental Follicle Precursor Cells ( <b>DFPC</b> )	Morsczeck, C, <i>et al.</i> (2005).	Cementoblastos Osteoblastos Fibroblastos
Células Troncales del germen dental Human Tooth Germ Stem Cells ( <b>hTGSC</b> )	Yalvac, M, <i>et al.</i> (2009).	Osteoblastos Neuronas Adipocitos
Células Troncales Mesenquimales Gingivales Gingival Mesenchymal Stem Cells ( <b>GMSC</b> )	Yang, H, <i>et al.</i> (2013).	Osteoblastos Neuronas Adipocitos
Células Troncales de dientes supernumerarios Stem Cells from a Supernumerary Tooth	Huang, H, <i>et al.</i> (2008).	Adipocitos Condrocitos Osteoblastos Odontoblastos
Células Troncales de la Bola Bichat Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad	Broccaioli, E, <i>et al.</i> (2013).	Adipocitos Osteoblastos

Tabla 1. Origen y potencial de diferenciación de células troncales derivadas de tejidos de cavidad oral.

Además de los términos generales mencionados anteriormente, el Comité de Células Troncales Mesenquimales establece que los criterios básicos que deben tener las células troncales son:

- 1.- Expresar mínimo los marcadores o antígenos CD73, CD90, y CD105.
- 2.- No expresar los marcadores o antígenos CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79Alfa, ni (HLA)-DR.

- 3.- Tener potencialidad para diferenciarse al menos en estirpes osteogénica, condrogénica y adipogénica.
- 4.- Tener afinidad para adherirse al andamio (Dominici, 2006).

## **Andamios**

En la ingeniería de tejidos, el paradigma clásico se basa en una combinación de andamios de biomateriales, células y moléculas bioactivas para orquestar la formación e integración de tejidos en el entorno del huésped. Una vía importante de la ingeniería de tejidos es el desarrollo de biomateriales que pueden promover procesos regenerativos mediante el transporte efectivo de poblaciones de células y agentes terapéuticos, así como al proporcionar un andamiaje estructural que confiera suficientes propiedades mecánicas a los tejidos. Además, el biomaterial debería degradarse idealmente a una velocidad comparable al crecimiento de tejido nuevo en el sitio de implantación (Lanza, 2000).

En la ingeniería tisular, la generación de tejidos artificiales de naturaleza mesenquimal, como el hueso, el cartílago, la dermis o la lámina propia de la mucosa oral requieren algún tipo de material que actúe como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo, para ello, se utilizan varios tipos de biomateriales. Los biomateriales, corresponden a materiales usados en la fabricación de sistemas biológicos, el objetivo de estos es favorecer la función biológica y mecánica de las células ya que actuarán como una matriz extracelular artificial, por tal motivo, deberá presentar una alta biocompatibilidad para que no produzcan reacciones no deseadas en la interfase tejido-material y mantener sus propiedades durante el tiempo que tenga que desempeñar su función. Otras de las características a analizar de un biomaterial serán las interacciones específicas entre propiedades físico-químicas del material, química de superficie, hidrofobia, propiedades mecánicas, absorción isotérmica de ciertas proteínas y la observación de comportamientos celulares, como la adhesión, activación, liberación de citoquinas y factores de crecimiento (Lu, 2013).

Los biomateriales se clasifican en naturales, sintéticos o biosintéticos (que corresponden a una mezcla de biomateriales naturales y sintéticos). Generalmente los biomateriales sintéticos son más fáciles de diseñar y fabricar en laboratorio, mientras que los naturales se caracterizan por una mejor biocompatibilidad. Los biomateriales sintéticos utilizados para implantes pueden ser metálicos, cerámicos, polímeros o compuestos de esos tipos según la función del órgano que se desee restaurar. En general, los biomateriales metálicos y cerámicos poseen propiedades mecánicas adecuadas para reemplazar tejidos duros, mientras que los biomateriales poliméricos se pueden utilizar para sustituir una gran variedad de tejidos gracias a la posibilidad de modular fácilmente sus propiedades físicas (Ratner, 2004).

### **Andamios Naturales**

La mayoría de los biomateriales naturales son de naturaleza polimérica. Los polímeros naturales han sido utilizados con mucho éxito en ingeniería tisular, porque poseen varias propiedades similares a las de la matriz extracelular nativa. Estos materiales están caracterizados por unas estructuras únicas y complejas y tienen varias funciones fisiológicas en los organismos donde se encuentran. Los polímeros naturales pueden servir para diferentes aplicaciones en el campo de la ingeniería tisular debido a:

- 1) Sus propiedades biomecánicas viscoelásticas.
  - 2) Su capacidad de gelificación y retención de agua.
  - 3) La posibilidad de ser degradados por enzimas biológicas, lo cual permite a estos materiales ser metabolizados más fácilmente por el organismo humano a través de mecanismos fisiológicos.
- Los polímeros naturales se pueden obtener de plantas, animales, algas o pueden ser sintetizados por microorganismos. Los biopolímeros más utilizados en ingeniería tisular son los hidrogeles, que se dividen en los polisacáridos y las proteínas (Faulk, 2014).

## **1. Polisacáridos**

### **1.1 Quitosano.**

El quitosano es el segundo polímero natural más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Es un polisacárido catiónico (poli-b(1,4)-d-glucosamina), el cual se obtiene de la N-desacetilación de la quitina, que es el componente principal del exoesqueleto de algunos crustáceos como cangrejos y camarones. Debido a su naturaleza catiónica, normalmente es insoluble en soluciones neutras o básicas, sin embargo, en ácidos diluidos con un pH < 6 se vuelve soluble debido a la presencia de los grupos amino que facilitan la disolución de la molécula, lo cual le permite interactuar con proteínas y con las superficies de las células (Monzack, 2012).

Este biopolímero ha servido como objeto de estudio para muchas aplicaciones, entre ellas, ingeniería de tejidos, ya que posee propiedades como: capacidad de retener agua, biodegradabilidad, capacidad de formar películas, actividad antimicrobiana y biocompatibilidad. Los soportes que brinda el quitosano pueden servir para mantener o reforzar la regeneración tisular, debido a que los glucosaminoglicanos aniónicos tales como la heparina, forman complejos iónicos con este biopolímero debido a que son químicamente similares a los GAG, dándole la capacidad de unirse a proteínas de unión como el factor de crecimiento básico del fibroblasto, el cual desempeña un papel activo en el crecimiento de muchos tejidos. Además, el quitosano es hemocompatible y degradable dentro del cuerpo debido a la acción de lisozimas. Se ha reportado que los biomateriales basados en quitosano no conducen a ninguna reacción inflamatoria o alérgica después de su implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión en el cuerpo humano. El quitosano posee las propiedades de cicatrización de heridas y favorece tanto la regeneración de tejidos blandos y duros (Dutta, 2011).

### **1.2 Alginato.**

También conocido como algina, el alginato es un polisacárido natural que se encuentra presente en las paredes de algunos tipos de algas marrones en forma de sales de sodio, calcio o magnesio de ácido algínico. Debido a que la sal de sodio es la única soluble en soluciones acuosas, el proceso de extracción del alginato se realiza mediante la conversión de sales de alginato a alginato de sodio. Debido a que este biopolímero tiene una gran capacidad de biocompatibilidad, no presenta toxicidad y posee buenas propiedades de bioactividad, mostrando gelificación en presencia de ciertos cationes divalentes como: Ca, Mg, Ba y Sr, se han realizado numerosas investigaciones en la ingeniería de tejidos; se ha utilizado en aplicaciones como: vehículos de administración de medicamentos y células, atrapamiento de enzimas, apósitos, entre otros. Se han reportado las numerosas ventajas que trae la combinación entre estos dos polímeros

naturales: alginato y quitosano, ya que las propiedades del quitosano le confieren un apoyo considerable a la estructura del andamio, mientras que el alginato proporciona grupos funcionales para la proliferación celular (Rehm, 2009).

### **1.3 Celulosa.**

La celulosa es un material natural insoluble en agua que se encuentra en la madera, algodón y otros materiales a partir de plantas, además de ser producida por varios microorganismos. Fue aislada por primera vez a partir de madera en 1885; sin embargo, no fue hasta 1913 que se desarrollaron películas de celulosa para su uso comercial, con las características de ser transparentes y delgadas. Aunque el uso principal de las películas de celulosa ha sido con fines de embalaje, también se ha encontrado una aplicación en el tratamiento de la insuficiencia renal, así como la evolución de las aplicaciones clínicas tales como fabricación de andamios para ingeniería tisular, sustitutos de piel temporal, agentes hemostáticos, barreras de adhesión post-operatorio, y como materiales de cultivo de hepatocitos (Hoenich, 2006).

### **1.4 Agarosa.**

La agarosa es un polisacárido extraído de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, que forma geles biocompatibles y térmicamente reversibles, la agarosa ha demostrado ser un biomaterial interesante para varias aplicaciones de la ingeniería tisular, incluyendo la ingeniería tisular de tejidos nerviosos y cartilaginosa (Nisbet, 2008).

### **1.5 Ácido Hialurónico.**

El ácido hialurónico tiene importantes funciones estructurales y biológicas en los tejidos de animales. Este polisacárido se compone de sub unidades de B-(1-4)-ácido-D-glucurónico y B-(1-3)-N-Acetil-D- glucosamina. Tiene una gran capacidad para la lubricación y absorción de agua, que influye en varias funciones celulares como la migración, adhesión y proliferación (Yang, 2007).

## **2. Proteínas**

### **2.1 Colágeno.**

La colágena es una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular, pues provee el principal soporte estructural para los tejidos. Se une a proteínas como la fibronectina y la vitronectina, que se tejen de acuerdo con los patrones establecidos por ella. La colágena proporciona la fuerza de tensión, regula la adhesión celular y se involucra en la quimiotaxis y la migración y permite el desarrollo de los tejidos. Las aplicaciones del colágeno como biomaterial son muy variadas, en forma de membranas, o películas se usa como sustitutivo de córnea, en membranas para hemodiálisis, en membranas de oxigenación para piel artificial y en el tratamiento de hernias. En forma de esponja, se utiliza para sustitución de huesos y cartílagos y en tampones quirúrgicos. Como disoluciones o geles, se usa como transportador de fármacos o como inyectable en cirugía plástica y, en forma de fibras, como material de sutura, componente artificial de vasos sanguíneos, componentes de válvulas cardíacas y como agente hemostático

### **2.2 Fibrina.**

La fibrina es uno de los polímeros más utilizados, es una proteína biodegradable que participa en el proceso natural de reparación de tejidos nativos después de una lesión.

La fibrina forma largas cadenas fibrilares muy flexibles que poseen una gran resistencia mecánica. Además, la fibrina puede formar grandes estructuras tridimensionales mediante conexión de diferentes fibrillas de fibrina entre sí, esta organización hace que las estructuras de fibrina estén entre las más resistentes dentro del mundo de las proteínas. Las características naturales de la fibrina le confieren un gran potencial para varias aplicaciones en ingeniería tisular. La fibrina, sola o en combinación con otros materiales ha sido utilizada como andamio biológico para la regeneración de tejido adiposo, óseo, cardíaco, cartilaginoso, nervioso, ocular y para la fabricación de sustitutos de piel, mucosa oral, tendones, y ligamientos. Las aplicaciones de la fibrina en ingeniería tisular se centran en tres áreas principales: aplicaciones de ingeniería tisular utilizando matrices de fibrina sola, aplicaciones en las que se usan andamios de fibrina en combinación con otras matrices poliméricas y sistemas a base de fibrina para la liberación controlada de factores de crecimiento y fármacos (Carriel, 2013).

### **2.3 Elastina**

La elastina y sus moléculas derivadas se investigan cada vez más para su aplicación en la ingeniería de tejidos. Este interés es impulsado por las notables propiedades de esta proteína estructural, como la elasticidad, el autoensamblaje, la estabilidad a largo plazo y la actividad biológica. La elastina se puede aplicar en biomateriales en diversas formas, incluidas fibras de elastina insolubles, elastina soluble hidrolizada, tropoelastina recombinante en fragmentos, repeticiones de secuencias de péptidos sintéticos y como copolímeros de bloque de elastina, posiblemente en combinación con otros polímeros. La proteína elastina es uno de los constituyentes más importantes de la matriz extracelular. Su principal función es aportar elasticidad a los tejidos, aunque su función biológica no está limitada a esta tarea, sino que la elastina juega un papel activo en modular el comportamiento celular y en promover la reparación tisular. La estructura química de la elastina, le permite sufrir grandes deformaciones sin rupturas. Su uso en ingeniería tisular se ha dado mediante hidrogeles para promover la mucoadhesión de lentes de contacto blandas con la mucosa ocular, favoreciendo los tratamientos oculares, también se han empleado, para la dosificación de fármacos como a azetazolamida, para tratar el glaucoma (Daamen, 2017).

## **Andamios sintéticos**

### **Metálicos**

Los metales han sido muy utilizados como biomateriales con dos propósitos: Fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo (articulaciones, placas craneales, clavos, etc.) o implantes usados en la estabilización y ayuda al proceso normal de reparación de un tejido (unión de huesos rotos). Entre los metales más utilizados con estos fines cabe destacar diferentes clases de aceros inoxidables, aleaciones tales como Co-Cr, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Ni, así como titanio y distintas aleaciones a base de titanio, aluminio y vanadio. Los implantes metálicos poseen las propiedades mecánicas ideales para reemplazar tejidos duros, en su diseño se deben considerar aspectos como la magnitud y dirección de fuerzas que sobre el actuarán, las limitaciones del diseño anatómico, las propiedades físicas del tejido circundante y la respuesta recíproca del implante-tejido. Los implantes metálicos suelen sufrir un proceso de corrosión, por lo que su superficie debe ser preparada con una película

de óxido la cual mantenga un estado de equilibrio dinámico con el oxígeno y el entorno del implante. La corrosión puede alterar directamente a los tejidos circundantes por alteración directa del entorno químico mediante: cambios electroquímicos que alteren la conducta celular, liberación de iones metálicos que afecten el metabolismo celular, inducción de una reacción inflamatoria crónica por los productos de la corrosión, así mismo, el proceso de revascularización y la reparación tisular podrían modificarse debido a la presencia del implante. Los capilares pueden aproximarse a la superficie de los metales implantados, pudiendo penetrar e infiltrarse si son porosos, posibilitando la viabilidad tisular, por el contrario, el movimiento de este material poroso puede romper los capilares, haciendo difícil la supervivencia de los tejidos dentro de los poros, lo cual puede interferir con el suministro sanguíneo e interferir con la reparación ósea (Kokubo, 2004).

## **Cerámicos**

Consisten en un grupo de compuestos inorgánicos de composición variada que son estables químicamente frente al oxígeno, los medios ácidos, alcalinos y salinos, y los disolventes orgánicos, son resistentes al desgaste, y generalmente se comportan como aislantes térmicos y eléctricos. El motivo por el que las cerámicas resultan tan atractivas como biomateriales, radica por el hecho de que en general, son materiales químicamente inertes, no suelen desencadenar respuestas no deseadas en el tejido que se implantan, y no son susceptibles de ataques microbianos, como tal su única desventaja, sería que algunas presentan una baja resistencia mecánica (Vallet, 2006).

Un tratamiento sistemático de las cerámicas permite clasificarlas en varios grupos:

1. Carbones- Cerámicas densas e inertes que forman parte de los implantes vasculares; su variedad más usada es el grafito. Presentan módulos de elasticidad parecidos a los del hueso, exhiben buena compatibilidad con materiales hidrogenocarbonatos como el tejido óseo y una de sus mayores ventajas es que no experimentan fatiga mecánica a diferencia de los metales y polímeros sintéticos (Ilench, 1973).
2. Cerámicas cristalinas bioinertes- Como la alúmina, de elevada densidad y gran pureza. Son compuestos muy utilizados en implantes dentales debido a sus características de gran resistencia a la corrosión, buena compatibilidad y resistencia mecánica (Ilench, 1973).
3. Cerámicas porosas- Entre los materiales que constituyen este grupo, los más representativos son los corales, la existencia de los poros, posibilita el crecimiento del tejido circundante y la adhesión celular al interior, permiten la vascularización y sirven como excelente modelo en procesos de osificación. Su gran desventaja es la debilidad mecánica, sobre todo cuando se trata de productos de alta porosidad (Ilench, 1973).
4. Cerámicas de superficie reactiva o bioactivas (hidroxiapatita y vidrios bioactivos)- Este tipo de cerámicas son utilizadas frecuentemente para la preparación de implantes que induzcan y posibiliten la formación de estructuras óseas; normalmente se destinan a aplicaciones ortopédicas. La ventaja que poseen es que se pueden reabsorber a largo plazo desapareciendo los potenciales problemas de biocompatibilidad, sin embargo, esto podría volverse un inconveniente, pues los iones liberados durante tal proceso podrían no encontrarse en una concentración compatible con el medio fisiológico circundante, resultando ser tóxicos (Valimaki, 2006).
5. Mezclas o composites- La característica fundamental de este tipo de materiales, está dada por que son compuestos de dos fases en los que se consigue una conjunción de las



propiedades de cada una de las fases por separado. Ejemplos de materiales de este tipo son las mezclas colágeno- hidroxiapatita y las de biovidrio- polietileno de alta densidad. La efectividad de estos compuestos fue comprobada en ensayos con animales de experimentación, en donde se valoró mediante cuatro incisiones en la calota de una rata la capacidad osteoinductora de un biomaterial compuesto por cerámica y un biopolímero natural (complejo sepiolita- colágeno) (Herrera, 1995).

## **Polímeros**

Las propiedades físicas y estabilidad de este grupo de materiales dependen de un conjunto de variables tales como la composición química del polímero y de su grado de entrecruzamiento. Una de las ventajas que presentan es que se les puede dotar de una amplia variedad de propiedades por introducción de aditivos químicos, macromoléculas o segundas fases, la forma de la estructura, la rigidez y la flexibilidad son características que determinan *a priori* su utilización (Kohane, 2008).

De acuerdo con su solubilidad, los andamios de polímeros se pueden clasificar en reabsorbibles y no reabsorbibles:

### **1- No reabsorbibles.**

#### **1.1 Polimetilmetacrilato (PMMA).**

Es un polímero no reabsorbible, fuerte, microporoso, hidrófilo, biocompatible y radiopaco que posee buenas propiedades osteoconductoras y osteogénicas ya que promueve la regeneración del hueso al humedecerse con la médula ósea sangrante. Actúa sobre las células pluripotenciales de la médula para su posterior diferenciación en osteoblastos y posterior formación de hueso, favoreciendo el desarrollo trabecular del hueso neoformado en forma de red intergranular. A pesar de sus buenas propiedades osteogénicas, no disminuye el tiempo de cicatrización (Ikada, 2006).

### **2- Reabsorbibles.**

#### **2.1- Ácido poliglicólico (PGA).**

Es el poliéster alifático lineal más simple. Se empleó para desarrollar la primera sutura sintética totalmente absorbible, se sintetiza a partir de monómeros de ácido glicólico, las fibras obtenidas a partir de este proceso, tiene una elevada resistencia y rigidez, lo cual dificulta su uso para suturas, por lo cual, generalmente se encuentra mezclado con otros monómeros (Mackeen, 2017).

#### **2.2- Ácido poliláctico (PLA).**

Se obtiene por polimerización por apertura de anillo del dímero cíclico del ácido láctico. El material tiene alta tensión y baja elongación, es muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas (Mackeen, 2017).

#### **2.3- Ácido poliláctico- poliglicólico (PLGA).**

Debido a sus propiedades biológicas y mecánicas, los polímeros de ácido poliláctico o copolímeros, tienen desde hace varios años aplicaciones terapéuticas muy diversas que dan fe de su biocompatibilidad, reabsorbilidad, y ausencia de toxicidad. Entre estas aplicaciones cabe destacar su empleo como material de sutura absorbible, miniplacas y tornillos para la osteosíntesis, materiales termoplásticos en cirugía orbitaria, esferas que permiten

modificar ciertos parámetros cinéticos y biodistribución de moléculas farmacológicas, como exfoliante en dermatología y en forma de membranas para la regeneración tisular guiada en periodoncia (Mackeen, 2017).

#### **2.4- Polietilenglicol (PEG).**

Se emplea de forma amplia en la industria, su aplicación médica está limitada en regeneración ósea normalmente en forma de membrana. Traumann Membragel es una membrana sintética reabsorbible compuesta por moléculas multifuncionales de polietilenglicol. Se aplica en forma líquida, convirtiéndose en hidrogel en unos segundos mediante una reacción de reticulación (Mackeen, 2017).

#### **2.5- Polietileno de ultra alto peso molecular.**

Este tipo de polietileno se ha utilizado durante décadas como material de interposición en prótesis totales de cadera y rodilla, mediante un tratamiento de irradiación con rayos gamma, que reticulan las cadenas poliméricas, con lo que se evita el desgaste, disminuyendo la incidencia de osteólisis (Ikada, 2006).

#### **2.6- Policaprolactona (PCL).**

La policaprolactona es un poliéster alifático biodegradable, es obtenido mediante la polimerización de caprolactona, se usa a menudo como aditivo para otros polímeros. Al tener un bajo punto de fusión, es utilizado como un plástico capaz de ser modelado a mano útil para la fabricación de prototipos e implantes. La PCL es degradada por hidrólisis de sus vínculos ésteres en condiciones fisiológicas, tal como ocurre en el cuerpo humano, por lo tanto, ha recibido gran atención para su uso como un biomaterial implantable, en general para dispositivos implantables a largo plazo, debido a su lenta y progresiva degradación. Las aplicaciones más específicas utilizadas en el cuerpo humano son, por ejemplo, dispositivos para suministro de fármacos, suturas o barreras de adhesión (Osorio, 2016).

### **Andamios Biosintéticos**

Desde el punto de vista de su estructura y morfología, un material biosintético es una fase o varias fases dispersas en una matriz. La síntesis de nuevos materiales biosintéticos ha cobrado demasiada importancia debido al desarrollo de técnicas experimentales mediante las cuales dos componentes inherentes incompatibles (por ejemplo, polímeros orgánicos y óxidos inorgánicos), se hacen compatibles por pre-mezcla de ambos a escala molecular antes de su conversión en un nuevo material. Esto permite el diseño y la síntesis de materiales de alta calidad con propiedades fisicoquímicas deseables, las cuales facilitan la viabilidad y proliferación celular y poder aplicarse en sistemas biológicos o como un recurso quirúrgico (Chen, 2000).

### **Factores de Crecimiento**

También conocidos como inductores, comprenden una amplia variedad de proteínas y nucleótidos juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células. Estos elementos son secretados de forma endógena por las células, o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. A este respecto, la adición adecuada de factores de crecimiento a células y matrices extracelulares artificiales aumenta los niveles de éxito de los tejidos generados mediante ingeniería tisular en comparación con los que no reciben dicha adición (Romagnoli, 2013).

Estas sustancias solubles influyen de manera significativa en el comportamiento y función de la célula que los asimila. Los factores de crecimiento han sido estudiados en medicina regenerativa debido a sus sorprendentes, y aun no del todo conocidas, formas de interacción con la célula y la matriz celular nativas que, mediante vías de señalización, definen el comportamiento y funciones celulares. Debido a que los factores de crecimiento se encuentran distribuidos en la compleja arquitectura de proteínas, polisacáridos y proteoglicanos de la matriz, es claro el hecho de que ambos componentes proporcionan a las células troncales un microambiente que influye en su patrón de crecimiento y desarrollo (Meng, 2014).

En ingeniería tisular, los factores de crecimiento interactúan con las células troncales y las matrices extracelulares artificiales de manera similar, pero no idéntica, al desempeño que presentan *in vivo*. Ello debido a los cambios en el comportamiento en las células troncales cuando son cultivadas *ex vivo*, en respuesta a un ambiente que no es idéntico al nativo. Ello incluye a los cultivos celulares generados sobre subestructuras o andamios tridimensionales que promueven *per se* un comportamiento diferente al de las células activadas en sistemas bidimensionales o de monocapa (Nieto, 2011).

En el caso de los cultivos tridimensionales las interacciones entre los factores de crecimiento, las células y la matriz artificial varían respecto a los entornos en monocapa debido a la afluencia, la concentración y la forma de contacto, así como la asimilación y desecho de estos factores. Los factores de crecimiento más estudiados al momento actual incluyen a moléculas pequeñas y grandes de naturaleza soluble. Entre las moléculas pequeñas destaca el ácido ascórbico, retinoico, y la dexametasona. En el caso de las moléculas grandes sobresalen los factores de crecimiento de fibroblastos, las proteínas morfogénicas óseas y los factores de crecimiento transformantes (Romagnoli, 2013).

## **Fenotipo celular**

El fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. Los fenotipos resultan de la expresión de los genes de un organismo, así como de la influencia de los factores ambientales, y de las posibles interacciones entre ambos. A nivel de la ingeniería tisular, también es necesario identificar el fenotipo de las células para así determinar su tipo y que su análisis y aplicación sea el correcto. Para poder llevar esto a cabo es necesaria la ayuda de distintas técnicas de identificación (Solomon, 2013), que incluyen marcadores, inmunofluorescencia y la citometría de flujo.

### **Identificación por inmunomarcaje.**

Las técnicas de inmunomarcaje se llevan a cabo por reactivos denominados marcadores, los cuales son un sistema de antígenos en la superficie celular, que reconocen ciertos anticuerpos, su utilidad se basa en la identificación del tipo de celular, estadio de diferenciación y actividad de ésta mediante la reacción antígeno anticuerpo. Si el antígeno de la célula que buscamos se encuentra presente al agregar el anticuerpo, estos se fijarán, y la unión será visible mediante la adición de un marcador secundario (fluorocromo o fluoróforo), que permitirá observar la célula mediante un microscopio de fluorescencia o citometría de flujo. Los marcadores de células troncales de cavidad oral se presentan en la Tabla 2.

Tejido	Marcadores
Células troncales de pulpa dental. <i>Dental Pulp Stem Cells (DPSC)</i>	CD105+ CD13+ CD73+ CD34- CD45- CD44+ CD106+ CD146+ CD29+ CD90+
Células Troncales del ligamento periodontal. <i>Periodontal Ligament Stem Cells (PLSC)</i>	STRO-1+ CD146+
Células troncales de dientes temporales exfoliados. <i>Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)</i>	STRO-1+ CD44+ CD146+
Células Troncales de la Papila Apical. <i>Stem Cells of Apical Papilla (SCAP)</i>	STRO-1+ CD146+ CD24+ CD34- CD45-
Células Troncales del folículo dental. <i>Dental Follicle Precursor Cells (DFPC)</i>	CD44+ CD90+ CD150+ STRO-1+
Células Troncales de mucosa retromolar. <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells (GMSC)</i>	CD146+ CD105+ CD34-

Tabla 2. Marcadores de células troncales derivadas de cavidad oral. Fuentes de información: Gronthos, 2000; Seo, 2004; Miura, 2003; Sonomaya, 2006; Huang, 2009; Yang, 2017.

### Control de calidad para sustitutos biológicos

Cualquier biomaterial, para poder ser implantado, debe cumplir unos requisitos generales que se engloban en el concepto de biocompatibilidad, en el que se incluyen su tolerancia, su bioestabilidad a corto y largo plazo, o el mantenimiento de sus propiedades y estructura químico-física en el entorno biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo. Además, deben poseer unas propiedades mecánicas y químicas específicas que aseguren la función para la cual se diseñan (Duffó, 2006)

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial se podrían resumir en:

- 1.- Ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo.
- 2.- No ser tóxico ni cancerígeno.
- 3.-Ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos
- 4.-Que la resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga, y el peso sean los apropiados
- 5.- Su diseño, el tamaño y la forma deben ser los adecuados.

A lo anterior debe añadirse que su precio debería ser reducido, su fabricación reproducible, y su procesamiento fácil para su producción a gran escala (Ballesteros, 2011).

## **Viabilidad y proliferación celular**

La Ingeniería tisular es un área que tiene por objeto construir tejidos nuevos con la finalidad de reemplazar o sustituir tejidos u órganos perdidos o dañados por distintas causas por medio de células que han sido cultivadas en laboratorio o matrices artificiales para que posteriormente puedan ser trasplantadas a un órgano receptor. Durante el proceso para lograr este fin, las células podrían encontrarse con agentes químicos o físicos que pueden afectar la salud celular y su metabolismo, estos agentes pueden causar toxicidad a las células de diferentes maneras como la destrucción de la membrana celular, inhibición de la síntesis de proteínas, alteraciones en los receptores de membrana, inhibición de replicación de DNA, y reacciones enzimáticas. De este modo, el determinar la viabilidad de las células que participan en los constructos es uno de los criterios básicos a cumplir, ya que solo una viabilidad elevada asegura la eficacia terapéutica del medicamento tisular y por tanto su aprobación como medicamento de terapia avanzada antes de que las células puedan ser implantadas. Es decir, los estudios de viabilidad celular determinan la salud de las células, para analizar esta condición se llevan a cabo una serie de métodos y técnicas de laboratorio (Aslantürk, 2018).

### **1.-Ensayo por medio de vida y muerte (Live & Dead, Invitrogen)**

Corresponde a un ensayo de dos colores para determinar la viabilidad de las poblaciones celulares basada en la actividad enzimática de la esterasa y la integridad de la membrana plasmática características de las células vivas. El reactivo Live & Dead discrimina rápidamente células vivas de muertas mediante tinción simultáneamente con verde fluorescente calceína-AM para indicar la actividad enzimática de la esterasa intracelular, y etidio rojo fluorescente homodímero-1 para indicar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. El kit es adecuado para usar con microscopios de fluorescencia o escáneres de placa multipocillo, y fácilmente adaptables para usar con citometría de flujo y otros sistemas de detección de fluorescencia. Los principios del ensayo son generales y aplicables a la mayoría de los tipos de células eucariotas, incluyendo células adherentes y ciertos tejidos, pero no a bacterias o levaduras (Callejón, 2007).

### **2.- Ensayo por medio de Azul de Alamar**

El estudio por Azul de Alamar es conocido como ensayo de reducción de resazurina. Se basa en la conversión del azul no fluorescente resazurina, que se convierte a en rosa resazurina fluorescente por enzimas mitocondriales y otras enzimas como las diaforasas.

La resazurina es un colorante y un indicador redox permeable a las células que puede usarse para cuantificar el número de células viables con protocolos similares a los que usa el compuesto de tetrazolio. Se sabe que actúa como un aceptador de electrones intermedio en la transferencia de electrones para oxígeno molecular y la enzima citocromo oxidasa. Es un compuesto no tóxico y permeable a las células. El color de este compuesto es azul y no fluorescente, después de entrar a las células, la resazurina se reduce a resofurina, incrementando su fluorescencia y color en las células. La cantidad de resofurina producida es proporcional al número de células viables. Se pueden cuantificar éstas por medio de fluorescencia mediante un fluorómetro con un conjunto de filtros de

excitación a 560 / 590 nm, también se puede hacer por medio de métodos de absorbancia, aunque este método se usa con menor frecuencia debido a que la detección de absorbancia es menos sensible a la medición de fluorescencia (Page, 1993).

## Medio osteogénico.

El tratamiento con los factores de diferenciación genera cambios en la expresión genética de las células promoviendo la osteogénesis. El medio de cultivo es de vital importancia pues básicamente fungirá el papel de matriz extracelular. Los medios de cultivo contienen nutrientes distribuidos en grupos de sales inorgánicas (Tabla 3), aminoácidos (Tabla 4), y vitaminas (Tabla 5), además de contener algunos otros componentes, los cuales son configurables de acuerdo con si es requerido o no (tabla 6). Estos medios requieren ser suplementados generalmente y de acuerdo con varias investigaciones en las cuales se requería realizar una inducción de células troncales orales a linaje osteogénico. He, 2011; Schneider, 2010 y Jiménez, 2018 usaron medio DMEM bajo en glucosa, y este se suplementaba con suero bovino fetal, ácido ascórbico, dexametasona y beta-glicerofosfato.

Sales Inorgánicas	mg/L
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	265.00
Fe(NO <sub>3</sub> ).9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200.00
NaCl	6,400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	125.00
NaHCO <sub>3</sub>	3,700.00

Tabla 3.

Aminoácidos	mg/L
L- Arginina.HCL	84.00
L- Cistina	62.57
L- Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L- Histidina. HCL.H <sub>2</sub> O	42.00
L- Isoleucina	105.00
L- Leucina	105.00
L-Lisina. HCl	146.00
L- Metionina	30.00
L- Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L- Treonina	95.00
L- Triptófano	16.00
L -Tirosina	104.20
L -Valina	94.00

Tabla 4.

Vitaminas	mg/L
Cloruro de colina	4.00
Pantotenato de calcio	4.00
Ácido Fólico	4.00
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxina. HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina. HCl	4.00

Tabla 5.

Otros	mg/L
Glucosa	1.000.00
Piruvato de sodio	110.00
Rojo de fenol	15.00

Tabla 6.

Tabla 3: Sales inorgánicas usadas en el medio inductor.

Tabla 4: Aminoácidos empleados en el medio inductor.

Tabla 5: Vitaminas usadas en el medio inductor.

Tabla 6: Contenidos adicionales en el medio inductor.

Tablas tomadas de: [http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell\\_esp\\_dmem.html](http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_dmem.html)

Las funciones de los suplementos consisten en:

Suero Bovino fetal: La utilización de éste en los cultivos celulares es objeto de muchos debates, por una parte la existencia de una amplia variación en su composición, la cual, permitiría la introducción de elementos que pueden ocasionar efectos inhibidores en el desarrollo y la diferenciación de las

células, y por otro lado, existe la posibilidad de una contaminación biológica proveniente de la línea de producción del mismo suero, lo cual representa un riesgo biológico importante en su utilización. A pesar de la discusión y los riesgos biológicos que representa la utilización de este suplemento continúa siendo utilizado de manera rutinaria en el cultivo de células dada su provisión de factores de crecimiento y en consecuencia, su rol en la proliferación y supervivencia de las células cultivadas (Mucci, 2006).

**Ácido ascórbico:** Es un fosfato orgánico que promueve la osteogénesis mediante el control de la mineralización y la actividad de los osteoblastos. Los fosfatos libres pueden inducir la expresión del ácido ribonucleico que transfiere el código genético procedente del ADN del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma, mejor conocido como mRNA y proteínas osteogénicas tales como la osteopontina (Lee, 2003).

**Dexametasona:** Estimula la proliferación de las células mesenquimales y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico, incrementando la expresión de Runx2 considerado como el gen maestro de la osteogénesis, Ya que desencadena la vía de diferenciación (Lee, 2003).

**Beta- Glicerofosfato:** Actúa como sustrato de fosfato orgánico, necesario para la formación de hidroxiapatita (Lee, 2003).

## **Ensayos para evaluar la inducción al linaje osteogénico.**

### **Rojo de alizarina**

Alizarina o 1,2-dihydroxiantraquinona es un compuesto orgánico, cuya fórmula es  $C_{14}H_8O_4$ . La tinción con rojo de alizarina se utiliza para evaluar los depósitos minerales ricos en calcio durante el proceso de diferenciación osteogénica de los cultivos inducidos (Dewick, 2009).

### **Tinción de Von Kossa**

La tinción con Von Kossa se utiliza para ver la mineralización de un cultivo de células. Se basa en la sustitución de los iones de calcio intratisulares en forma de fosfatos o carbonatos, por iones de plata en solución acuosa sometidos a un proceso de exposición de luz. Los depósitos iniciales de calcio se colorean de marrón-negro (Mallory, 1983).

## **Anomalías congénitas craneofaciales.**

Las anomalías congénitas son cambios en la estructura, la función y el metabolismo presentes al nacer, lo que resulta en un deterioro físico o mental. Pueden ser simples o múltiples, y varían en importancia clínica. Las malformaciones craneofaciales son las malformaciones congénitas más prevalentes en la edad pediátrica en humanos. Algunas de ellas, como las craneales, pueden poner en peligro la vida del niño o dejar secuelas irreversibles. Por otro lado, las malformaciones faciales no suelen suponer un riesgo vital; sin embargo, marcan a los niños y a sus familias de por vida. La mayoría de ellos necesitarán múltiples y complejas operaciones para intentar que las funciones del complejo craneofacial y su apariencia física lleguen a ser lo más normal posible (Máris, 2011).

Durante la última década ha existido un gran avance en la identificación de las bases genéticas para

la mayoría de los síndromes craneofaciales. Para aquellos casos o condiciones sin un patrón genético identificable, se han demostrado factores definidos como agentes “teratogénicos”, los cuales son condicionantes ambientales que producen tales defectos por alteraciones de las células de la cresta neural y las consideran como neurocrestopatías (Klein, 1968).

Algunos de estos factores condicionantes son:

**-Radiación.** Grandes dosis se asocian a microcefalia.

**-Infección.** Neonatos en antecedente de toxoplasma, rubéola o citomegalovirus tiene una alta incidencia de fisuras faciales.

**-Idiosincrasia materna.** Niveles altos de fenilcetonuria aumenta la incidencia de fisura labio-palatina, hiperinsulinismo se asocia a malformaciones oculoauriculovertebrales y factores como la edad y el peso a otras malformaciones craneofaciales.

**-Químicos.** Deficiencias vitamínicas se asocia a incrementos en la incidencia de fisura labio-palatina. Drogas como el tabaco y la nitrofurantoina se asocian a craneosinostosis. Alcohol y anticonvulsivos como la fenitoína y el ácido valproico se asocian a un aumento en la incidencia de fisura labio-palatina (Mahon, 2015).

Las malformaciones del complejo craneofacial suelen ser abundantes y muy peculiares. La primera clasificación de éstas era limitada pues consideraba solamente el mecanismo patogénico y las afecciones anatómicas, siendo excluyente con algunas condiciones particulares tal como síndromes (Treacher Collins, por ejemplo) pues las secuelas de estos en las malformaciones congénitas craneofaciales no cumplían con los criterios necesarios científicos ni clínicos para clasificarlos dentro de alguna de estas clasificaciones mencionadas. Posteriormente otros sistemas de clasificación como el de Millard, Davis, etc seguían presentando controversias, hasta que en el año de 1981 el Comité de Nomenclatura y Clasificación de las Anomalías Craneofaciales derivado de la Asociación Americana de Fisura Labio-palatina propone una clasificación simple, dividida en cinco categorías (Linton, 1981):

- I- Fisuras Faciales/ Encefalocelos/ Disostosis
- II- Atrofia/ Hipoplasia
- III- Neoplasias
- IV- Craneosinostosis
- V- Inclasificables

### Labio fisurado y paladar Hendido

El labio fisurado y paladar hendido son los defectos craneofaciales más comunes, se estima que una cuarta parte por millón de niños recién nacidos al año nace con tales defectos alrededor del mundo. Este se genera como consecuencia de una falla en la fusión de los procesos embriológicos (OMS,2015).

El desarrollo normal de los labios ocurre entre las semanas 4 y 8 de gestación. Al final de la semana 4, la prominencia frontonasal se forma a partir de las células migratorias de la cresta neural del primer arco faríngeo. Las placodas nasales, que representan el engrosamiento ectodérmico, se



desarrollan en el extremo caudal de esta estructura y dividen los procesos nasales medial y lateral. El paladar primario se forma a partir de la fusión de los procesos nasales medianos apareados en la semana 6, dando lugar a la premaxila, que comprende el *filtrum* subnasal, arco alveolar maxilar y cuatro dientes incisivos, y paladar duro anterior al agujero incisivo. Posterior a esto, en el paladar secundario durante las semanas 6-12, las proyecciones mediales de los procesos maxilares forman estantes palatales que se elevan por encima de la lengua para fusionarse medialmente entre ellas, anteriormente con el paladar primario y superiormente con el tabique nasal. El agujero incisivo marca la extensión anterior del paladar secundario. La formación de los paladares primario y secundario completa la separación de las cavidades nasal y oral, permitiendo la respiración simultánea y la masticación (Sadler, 2014).

La enfermedad tiene un impacto importante sobre todo en el individuo afectado, sus familias y la sociedad ya que necesita una larga rehabilitación entre el nacimiento y la edad adulta. Los efectos sobre la nutrición, el habla, la audición, la apariencia, la integración social de un individuo y el aspecto psicológico pueden conducir a resultados adversos de larga duración para la salud y el bienestar.

## **Fisura alveolo-palatina**

La fisura alveolo-palatina puede surgir independientemente del labio fisurado. Las deformidades del paladar son el resultado de la interrupción del desarrollo normal de los tejidos duros del maxilar. La gravedad está dictada por el momento, la gravedad y la cantidad de interrupción. Un período crítico es inmediatamente antes de la formación del paladar primario, ya que el proceso nasal lateral experimenta un estallido de crecimiento mitótico. Durante este período, el desarrollo es altamente vulnerable a los efectos genéticos y teratogénico, por lo cual, su etiología es muy compleja y su base molecular sigue siendo desconocida (Mahdi, 2013).

## **Técnicas actuales para el manejo de paladar fisurado**

### **Gingivoperiostioplastia**

La gingivoperiostioplastia consiste en crear un túnel perióstico entre los segmentos alveolares a ambos lados de la hendidura removiendo el tejido blando de su interior para inducir la formación ósea dentro de este túnel sin necesidad de un injerto ni la morbilidad del sitio donador. Se lleva a cabo utilizando colgajos de fibromucosa palatina y mucosa nasal, y a veces del vómer, que se suturan en la línea media para separar la cavidad oral de la cavidad nasal, sin interposición de hueso. Típicamente, estos tejidos son obtenidos a partir de la fibromucosa palatina que recubre el hueso palatino remanente lateralmente a la fisura, mediante la denudación de hueso (Torikai, 2009).

Aunque estas técnicas de estafilorrafia son ampliamente utilizadas, pueden existir limitaciones como la obtención de colgajos locales, la cual no siempre es posible, especialmente en casos con fisuras de gran tamaño y gran separación entre los bordes palatinos, lo cual obliga a buscar fuentes alternativas de tejido para la reparación de la fisura palatina, además, la ausencia de un tejido duro a este nivel puede ser el responsable de los resultados sub-óptimos como la hipoplasia maxilar que se presenta en algunos casos debido a la retracción que sufren los colgajos reposicionados al ser afrontados. En conjunto, las complicaciones de las técnicas mediante estafilorrafia no parecen depender del grosor del colgajo o de las técnicas utilizadas, sino de la propia carencia de tejido óseo o blando que ya enfrenta el cuerpo y la técnica con la que se le corrige, por lo cual, hace necesarias

actuaciones posteriores quirúrgicas mediante injertos óseos y/o aparatología ortopédica (Cho, 2013).

### **Injerto óseo alveolar (Osteoplastia)**

La reconstrucción de la hendidura alveolar ha sido un tema controversial desde la primera publicación sobre el uso de injertos óseos en la literatura científica del siglo XX, y su realización con éxito en el año 1955. En 1901 el Dr. Von Eiselberg, realizó un injerto óseo pediculado para cierre del defecto alveolar; sin embargo, no fue hasta 1952 cuando el Dr. Axhausen estableció los conceptos de «trasplante» óseo y osteogénesis mediante el principio, según el cual, a partir del injerto autólogo se incrementa el índice celular de la osteogénesis. Por otra parte, resaltó la importancia de la estabilización del arco maxilar y la preservación de la dentición. Más tarde en 1954, Schmidt reportó el cierre quirúrgico de una fístula nasolabial y la colocación de un injerto óseo en la brecha alveolar obtenido de la cresta iliaca. El objetivo principal del injerto es prevenir el colapso maxilar y las distorsiones oclusales, además de disminuir la incidencia de fístulas oronasales (Coots, 2012).

Este procedimiento, dependiendo del momento de la cirugía, se puede clasificar de la siguiente manera:

- Osteoplastia primaria: Se realiza en una etapa previa a la dentición temporal. Es decir, antes de que los dientes temporales erupcionen del remanente el arco maxilar (Ruwaiti, 2014).
- Osteoplastia secundaria: Fue propuesta por Boyne y Sands en 1976, su enfoque es el más ampliamente aceptado y consiste en la realización del injerto alveolar durante la dentición mixta, entre los 9 y 12 años. Juega un rol importante en la estabilidad de los arcos y para el reemplazo de los dientes ausentes (Theologie, 2014).
- Osteoplastia terciaria: Se lleva a cabo cuando ya se cuenta con la dentición permanente y el crecimiento está concluyendo, pero la hendidura está todavía presente (Theologie, 2014).

El injerto óseo secundario, que como se ha señalado es el más utilizado, forma una parte integral del tratamiento de las personas con fisuras alveolares uni y bilaterales, y ha sido ampliamente utilizado para reconstruir la hendidura alveolar. Sin embargo, todavía existe cierta controversia al respecto, y algunos autores limitan sus indicaciones a los casos de fisuras bilaterales, con una amplia brecha y una mala posición de la premaxila (Cho, 2013).

El estándar de oro para la reparación de la hendidura alveolar es el uso de injerto óseo autólogo, el cual, se obtiene mediante un procedimiento quirúrgico de la cresta iliaca o la sínfisis mandibular. Sin embargo, incluso aunque estos métodos han mostrado un alto porcentaje de éxito, ambos conllevan riesgos y complicaciones al sitio donante, la literatura reporta que las complicaciones más frecuentes en el proceso de obtención de hueso a partir de la cresta ilíaca son infección e inestabilidad pélvica mientras que los accidentes relacionados a la obtención de hueso del mentón pueden ser parestesia y daño en la raíz apical de los órganos dentales (Moreau, 2007).

## Fístulas palatinas recurrentes

Los procedimientos anteriormente mencionados son los que más se realizan, sin embargo, existe la posibilidad de que después de este procedimiento, se presenten fístulas recurrentes, esto debido a la disminución de la vascularización que sobreviene con cada intervención, así como a la fibrosis desencadenada por la forma de cicatrización. Se ha reportado una incidencia de 0 a 76% de fístulas palatinas posterior a palatoplastia primaria. La recurrencia posterior a la reparación de una fístula nasopalatina es aún mayor; se reporta entre 25 y 33%. Los sitios más comunes de fistulización son el paladar duro y la unión del paladar duro con el paladar blando, aunque también puede manifestarse en el paladar blando, esto sugiere una gran limitación que implica un aumento en el coste económico para solventar los recursos humanos y materiales propios a los actos quirúrgicos, además del coste emocional respectivo de los padres o tutores, así como del recién nacido (Wongworawat, 2003)

### **Ingeniería tisular aplicada al manejo de paladar hendido con células orales**

Uno de los primeros enfoques de la ingeniería tisular con el cual se eliminaba la necesidad de llevar a cabo un procedimiento quirúrgico para la obtención de hueso autólogo, fue por medio de los injertos heterólogos, los cuales consistían en materiales derivados de algas, animales o el coral. Sin embargo, la calidad de los sustitutos dejó mucho que desear pues estos presentaron una menor proliferación celular, lo cual repercutía en la vascularización del injerto y además que presentaban una tasa de reabsorción más alta en comparación con los injertos autólogos, lo que resulta en una tasa más lenta de neoformación ósea (Oklund, 1986).

Actualmente se aplican otras dos líneas de investigación respecto a la ingeniería tisular con relación a la estrategia empleada para lograr obtener tejido óseo. El primer enfoque, se basa en la aplicación de factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas de la familia TGF, sin embargo, un posible inconveniente de este enfoque es que se necesitan altas concentraciones para obtener el efecto osteoinductivo deseado, lo cual podrá traer consigo posibles efectos adversos y altos costos. El segundo enfoque se basa en la combinación de células osteogénicas vivas con andamios de biomateriales *ex vivo* para permitir el desarrollo de una estructura tisular tridimensional (Meijer, 2007).

Desde las primeras publicaciones de Friedenstein y sus colegas en la década de 1980, se dio a conocer que las células madre mesenquimales (MSC) se pueden utilizar para diseñar tejidos como hueso y el cartílago. Por lo tanto, bajo este antecedente, científicos, a través de la ingeniería tisular, se han centrado en estrategias con las cuales se puedan diversificar y mejorar los procedimientos de cosecha de células troncales, las cuales puedan ser inducidas para formar un tejido predilecto, aunque también se podría aplicar para extender el volumen óseo autólogo cosechado o para mejorar la calidad de los injertos (Hibi, 2006).

Una de las primeras aplicaciones de un constructo tisular se reportó en un estudio realizado en un perro, en este se evaluó la capacidad de regeneración ósea a partir de células troncales derivadas de tejido adiposo comparando su efectividad versus un injerto óseo autógeno en un modelo de hendidura alveolar maxilar. Las células troncales obtenidas de tejido adiposo subcutáneo se incubaron con un andamio de hidroxiapatita / fosfato beta-tricálcico, en medio osteogénico específico durante 21 días. A los perros se les crearon defectos en el paladar, tales defectos

alcanzaban el piso de fosas nasales. La reparación fue seguida por un injerto óseo diseñado con tejido de células madre derivadas de tejido adiposo en un lado y un injerto cortical tibial en el otro lado. Los resultados no fueron del todo satisfactorios, sin embargo, no fueron decepcionantes pues la formación de hueso en los lados del autoinjerto fue mayor que en los lados de las células troncales a los 15 y 60 días. Por tal motivo, el autoinjerto sigue siendo el estándar de oro para la regeneración ósea mientras que el hueso diseñado por tejido podría ser calificada como una alternativa aceptable. Esta conclusión deriva una nueva línea de investigación en la cual se pretenda buscar andamios que mejoren o igualen al hueso autólogo (Pourebrahim, 2012).

Otro estudio realizado por Jahanbin, en el año 2015, con células mesenquimales derivadas de la pulpa dental, obtenida de terceros molares, extraídos de una joven de 20 años a la cual se le extrajeron como plan de tratamiento para ortodoncia. Las células se extrajeron y aislaron de la pulpa dental por método enzimático mediante colagenasa tipo I. El cultivo celular se mantuvo en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal, posteriormente las células fueron estimuladas para la diferenciación osteogénica en medios de cultivo suministrados con dexametasona, ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato, penicilina y estreptomina. Posteriormente, fueron sembradas en andamios de colágeno junto con el medio osteogénico, la diferenciación ocurrió después del día 14, y una semana después casi todas las células mostraron osteoblastos. Para este estudio in vivo, se utilizaron ratas Wistar hembras, las cuales fueron sometidas a anestesia general para el acto quirúrgico en el que se les creó un defecto palatino con 7 mm longitud anteroposterior, ancho mediolateral de 4 mm y profundidad de 2 mm, posteriormente se colocaron las membranas de colágeno de 8 x5 mm las cuales se adaptaron e insertaron en el área del defecto, como control se usaron ratas a las cuales se les insertó hueso autólogo obtenido de la cresta iliaca. Los colgajos se cerraron con suturas de nylon 4-0, las ratas fueron sacrificadas a los 60 días, las muestras de tejido obtenidas del sitio de defectos óseos anteriores se prepararon para análisis histológico, en los resultados se demostró que la formación máxima de hueso maduro se encontraba en la rata a la que se realizó el injerto de hueso ilíaco, mientras que las del injerto, mostraban un tejido inmaduro y poco mineralizado, se concluye que hubiera sido conveniente evaluar los constructos en un lapso más largo para definir la calidad del hueso que se forma y el periodo en el que se logra (Jahanbin, 2015).

Piedra y su equipo, en el año 2016, desarrollaron un sustituto multicapa del paladar con hueso y tejidos de la mucosa oral usando células obtenidas tejido adiposo y la mucosa palatina del conejo junto con biomateriales sometidos a técnicas nanotecnológicas basadas en compresión plástica. El sustituto del paladar fue injertado autólogo *in vivo* en ocho conejos neozelandeses de 3 a 4 semanas de edad y se utilizaron análisis histológicos e histoquímicos para evaluarlo, los resultados sugirieron que el sustituto fue capaz de integrarse en el huésped por lo cual el tejido podría contribuir al desarrollo normal del paladar, sin embargo, la maduración y diferenciación del tejido fueron adecuadas, pero no hubo una diferenciación completa (Martín, 2016).

## **La Policaprolactona (PCL)**

La policaprolactona es un polímero biodegradable y termoplástico con gran capacidad de aplicación en ingeniería de tejido óseo, cartílago y otros tejidos, dando resultados favorecedores. Cuenta con una excelente estabilidad térmica, a tal grado que su punto de congelación ocurre hasta los -60 °C y su punto de ebullición es los 60°C, y aun así sigue conservando todas sus propiedades hasta los 350 °C. La policaprolactona, se degrada muy lentamente, más lento que el ácido poliláctico (PLA) o

el ácido poliglicólico (PGA), esto debido a su alta cristalinidad e hidrofobicidad, por lo cual, se puede aplicar en procedimientos que requieran un largo plazo. En relación con su aplicación junto con células troncales, la PCL podría ser una gran herramienta para su aplicación en el campo de la medicina regenerativa ósea (McKeen,2017).

La policaprolactona usada en este proyecto, La policaprolactona (PCL) utilizada en este proyecto se proporcionó directamente como  $1,75 \pm 0,005$  mm de filamento para impresoras 3D estándar (3D4makers.com, Mw:  $84500 \pm 1000$ , 100% puro, Haarlem, Países Bajos). Para la fabricación de los andamios, un se utilizó el Hephastos 2 (Prusa i3 - BQ, Madrid, España) con cama calefactable. La extrusora era un engranaje de accionamiento doble, con una boquilla de  $400 \mu\text{m}$ .



Figura 1: Fotografía del andamio de PCL impreso en 3D.

### **Estudios con células troncales y PCL**

Un estudio realizado por Yilgor y su equipo en 2008, elaboraron un andamio de PCL mediante impresión 3D y lo evaluaron. Se fabricó mediante el sistema CAD/CAM Bioplotter, derritiendo el PCL a  $130^{\circ}\text{C}$  y colocándolo en una jeringa de acero inoxidable, a la cual se le sometió de presión con  $\text{CO}_2$  a través una tapa presurizada. Por medio de la extrusión del polímero en forma de fibras, se crearon cubos de  $20 \times 20$  mm, los cuales contaban con 10 capas de fibras, su porosidad oscilaba entre el 50 y 70 %. Las células troncales de médula ósea fueron obtenidas del fémur de ratas macho de 6 semanas de edad, se extrajo la médula, se lavaron y centrifugaron para obtener cultivos primarios, los cuales fueron incubados durante 2 días, durante este tiempo se eliminaron células hematopoyéticas y de otros tipos para aislar las células troncales, una vez aisladas, fueron sembradas en medio osteogénico y congeladas en nitrógeno líquido para su uso posteriormente. Los bloques de PCL fueron sembrados con las células a una densidad de 5000 células por bloque, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  junto con medio DMEM suplementado con glicerofosfato, ácido ascórbico, dexametasona y penicilina. Los estudios de viabilidad y proliferación se llevaron a cabo en los días 7, 14 y 21, Pasado este tiempo, se determinó mediante ensayos de Azul de Alamar y pruebas de fosfatasa alcalina (ALP). Se observó una buena adherencia y proliferación de células osteoblásticas en la superficie de las fibras del andamio, el examen de ALP funciona en relación a que mientras exista mayor actividad de ALP, existe una menor proliferación celular y en el estudio con los andamios, la actividad de la ALP fue muy baja o nula, lo cual indica, que el andamio de PCL, junto con las células mesenquimales, lograron formar un constructo óseo, lo cual plantea la posibilidad de que en un futuro éste pueda ser aplicable en estudios *in vivo* y posteriormente, este se pudiera aplicar en humanos (Yilgor, 2008).

Liao y su equipo, en el 2015, decidieron evaluar otra vez un andamio de PCL, pero esta vez, optaron por diversificar la fuente de obtención de células troncales empleando células troncales derivadas

de tejido adiposo de puerco, también se optó por probar otra técnica para la elaboración del andamio, esta se basó en sinterización selectiva por láser. Las células madre derivadas de tejido adiposo porcino se obtuvieron de la zona inguinal del cerdo, posteriormente, el tejido adiposo se cortó en trozos muy pequeños con unas tijeras en un procedimiento estéril. El tejido graso cortado en cubitos se revolvió junto con colagenasa al 0,05% en un agitador de baño de agua a 37 ° C y posteriormente se centrifugó a 165 rpm durante 30 min. La actividad de la enzima se neutralizó añadiendo un volumen igual de medio de control que contenía DMEM y suero bovino fetal al 10% y se volvieron a centrifugar 250 g de la mezcla durante 10 minutos para obtener un sedimento celular de alta densidad. El sedimento celular se incubó durante la noche a 37 ° C con el 5% de CO<sub>2</sub> en un medio de control con DMEM, después de la incubación, las placas se lavaron extensamente para posteriormente inducir las células a diferenciación osteogénica con medio DMEM, suplementado con glicerofosfato, dexametasona y ácido ascórbico. Los andamios se realizaron en una máquina de sinterización láser selectiva la cual consiste en un láser de CO<sub>2</sub>, un escáner, una plataforma con un sistema de precalentamiento, una revista de construcción y una computadora para ingresar el archivo CAD 3D. La cámara de construcción se calienta a una temperatura justo por debajo del punto de fusión del polvo. Esto se hace para que el calor del láser solo necesite elevar la temperatura ligeramente para causar la sinterización. Luego, el polvo de PCL se coloca sobre el lecho de polvo en la cámara de construcción de manera uniforme y un rayo láser de CO<sub>2</sub> dirigido por un sistema de escaneo dibuja la sección transversal 2D en la superficie del material de construcción, sinterizando el polvo de PCL, posteriormente el pistón de la cámara de construcción desciende un espesor de capa, entonces, el polvo de PCL nuevamente se llena en la revista de compilación, donde la siguiente sección transversal se sinteriza a la anterior y este proceso continúa hasta que se completa el andamio deseado. El andamio poroso se diseñó como una forma circular con un total de cuatro capas su tamaño era de 1,2 mm de diámetro y 2 mm de altura y se les sembraron alrededor de 1,100 células troncales derivadas de tejido adiposo, posteriormente, el andamio junto con las células se sumergieron en medio osteogénico durante 14 días, pasado ese tiempo, se evaluó in vitro mediante el ensayo de MTS y ALP, los resultados fueron favorables para la viabilidad, proliferación y diferenciación osteogénica de las células (Liao, 2011).

Dado los avances que tuvo el estudio de la policaprolactona, en el año 2018, se decidió evaluarla mediante su aplicación in vivo, por lo cual Chul y su equipo, fabricaron un andamio compuesto de policaprolactona (PCL) y fosfato tricálcico (TCP), el TCP se añadió esperando que este aumentara la hidrofilia y la osteoconductividad. El andamio de PCL fue realizado mediante impresión 3D mediante el sistema 3D Bio Printer de Corea, ese sistema funciona derritiendo la PCL a 100 ° C y posteriormente se le añadió el 10 % en peso de TCP. Las mezclas de PCL /  $\beta$ -TCP se expulsaron a través de una boquilla calentada de aire seco, los puntales del andamio se trazaron con una deposición capa por capa para crear bloques, los cuales poseían un tamaño de poro de entre 240 y 260  $\mu$ m. Posteriormente, se hicieron cilindros con diámetro de 8 mm y altura de 1,9 mm, posteriormente se sembraron células troncales derivadas de médula ósea, las cuales previamente se habían sumergido en medio osteogénico, el objetivo principal de este estudio era evaluar la efectividad del andamio in vivo, por lo cual, se crearon cuatro defectos redondos de 8 mm en el cráneo de 10 conejos blancos machos de Nueva Zelanda y se les insertó en andamio junto con las células. Con el propósito de proteger de la migración de células epiteliales, se les colocó una membrana entre el defecto junto con el andamio y el tejido conectivo, los animales fueron sacrificados a las 2 semanas y la otra mitad hasta las 8 semanas después del procedimiento quirúrgico y se recogieron las

muestras, los conjuntos se procesaron en formato Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM), los resultados fueron favorables pues se observó nueva formación de hueso en el interior del andamio, mostrando además una alta biocompatibilidad con un gran mantenimiento de volumen, la adición de  $\beta$ -TCP a PCL favoreció las propiedades del andamio al aumentar la hidrofilia y la osteoconductividad. Este estudio concluye que el andamio de PCL/ TCP podría ser muy bueno en su aplicación, sin embargo, se esperan modificaciones mecánicas y químicas utilizando diversas técnicas de ingeniería de tejidos (Chul, 2018)

### **Estudios con células troncales orales y PCL**

Dados los avances de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular se han diversificado las fuentes de obtención de las células troncales, actualmente, las células mesenquimales obtenidas de tejidos orales se presentan como un área de oportunidad debido a que son más fáciles de obtener en relación con células de otros tejidos. Por lo anterior, ya se han realizado algunos estudios con PCL para evaluarle junto con células orales en su viabilidad, proliferación y diferenciación para tejido óseo, sin embargo, esta información sigue siendo limitada, justo por esta razón es que se elabora esta tesis, con el fin de ampliar los conocimientos respecto a esta relación.

En uno de los primeros estudios realizados por Jensen y sus colaboradores, se decidió evaluar un andamio de policaprolactona (PCL), junto con ácido hialurónico, y fosfato tricálcico (TCP) junto con células troncales derivadas de pulpa dental. El andamio se realizó mediante impresión 3D por medio de un prototipo rápido compuesto de malla tridimensional, los andamios se sometieron en NaOH, agua y 1,4-dioxano y se sometieron a procesos de liofilización con la finalidad de mejorar la interconectividad, geometría, distribución y tamaño de los poros, a los andamios PCL se le agregó una solución HA-TCP y se colocaron en un desecador de vacío por 12 horas. Finalmente, los andamios se colocaron en un liofilizador una vez más a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 4 días. Para la obtención de células derivadas de la pulpa dental, se extrajeron terceros molares de 2 jóvenes de 20 y 23 años, una vez realizada la extracción, la pulpa se recuperó inmediatamente después de la cirugía y se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio DMEM para su proliferación, los andamios se colocaron en placas de 6 pocillos recubiertas de agarosa, las células que se encontraban en suspensión se aplicaron gota a gota. se permitió que las células se adhirieran durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera humidificada de 5% de  $\text{CO}_2$ , después de 7 días, el medio se cambió a medio osteogénico que consistía en medio de proliferación suplementado con dexametasona, glicerofosfato y ácido ascórbico. Las células se cultivaron en medio osteogénico hasta el día 21. Los medios fueron cambiados dos veces por semana durante todo el estudio. Todos los análisis se realizaron para todos los grupos de andamios en los días 1, 7, 14 y 21. Se utilizó como una medida relativa para el número de células la cuantificación del ADN bicatenario en cada armazón usando el ensayo Quant-iT™ Pico reen® de Invitrogen, también se realizaron estudios con fosfatasa alcalina, además de la técnica de PCR para evaluar viabilidad, proliferación y diferenciación, los resultados de todas estas pruebas concluyen en una distribución celular homogénea, se notó un acomodo celular a lado de las fibras de PCL, pero además se notó una adhesión pues la célula se encontraba alargada hacia el andamio, la expresión de marcadores como colágeno tipo I, osteoponina y osteocalcina también se llevó a cabo. La conclusión general de esta investigación es que la complementación de andamios de policaprolactona con ácido hialurónico y -TCP facilita la migración y la diferenciación osteogénica de células madre de pulpa dental humana (Jensen, 2012).

Con el interés de diversificar las fuentes de células troncales orales, Ta y sus colaboradores, decidieron estudiar un andamio con células derivadas de dientes deciduos exfoliados. Las células fueron obtenidas del diente de un niño de 7 años, la cámara pulpar fue cuidadosamente extraída y por medio de digestión enzimática con colagenasa, fue que se aislaron las SHED's, estas, fueron sembradas en medio Alfa- Eagle, modificado con suero bovino, ácido ascórbico y factor de crecimiento fibroblástico. Para la construcción del andamio, se utilizó PCL y fibras de fosfato de estroncio para aumentar la hidrofilia, las fibras de PCL, se fabricaron utilizando un sistema de giro eléctrico compuesto por una bomba de jeringa y un catéter punta roma calibre 18 y un adaptador, El PCL y el fosfato de estroncio se disolvieron en ácido fórmico, una vez hecho esto, se dejó reposar la muestra 10 horas, posteriormente fueron lavadas con agua bidestilada para eliminar el ácido, posteriormente, se sembraron las células, el andamio fue evaluado mediante el ensayo MTT para evaluar la actividad mitocondrial, esta fue buena, lo cual indica una buena salud de las células en el andamio, se sembraron junto con medio osteogénico alfa- MEM, el medio se reemplazó cada tercer día hasta los 21 días. Para evaluar la diferenciación de las células a linaje osteogénico, se realizaron pruebas de transcriptasa inversa en tiempo real de colágeno tipo I, osteoponina, osteocalcina y el factor GAPDH. Se encontró, que además de mejorar la hidrofilia, el estroncio aumentó la resistencia a la compresión, el PCL solo resistía 1.2 MPa, y compuesto aumentó a 1.65 MPa, por lo cual, en esta investigación se concluye que fuentes orales de células troncales como las SHEDS también representan un área de oportunidad para usarse junto con la PCL y mejorar las características del constructo, además menciona que es necesario realizar más pruebas con otros compuestos que pudieran mejorar las cualidades del PCL y poder emplearlo como una alternativa en ingeniería de tejido óseo ( Ta, 2015).

Con relación a la evaluación de la policaprolactona exclusivamente para tejido óseo, Jensen y sus colaboradores decidieron darle seguimiento a la investigación que realizó en el 2012, así que reportó la aplicación de las células troncales derivadas de pulpa dental comparada con células derivadas de médula ósea para ingeniería tisular de tejido óseo in vivo. El andamio fue realizado a partir de la deposición en capas de hebras de polímero mediante la extrusión de PCL fundido a partir de un troquel de extrusión con un diámetro interno de 200  $\mu$ m, para favorecer las características del andamio, se les añadió fosfato tricálcico (TCP) e hidroxiapatita (HA), para la evaluación in vivo, también se iba a evaluar el andamio de PCL solo, se escogieron y utilizaron catorce cerdas danesas criollas, maduras esqueléticamente. Un mes antes de la cirugía, se extrajeron células troncales de premolares y médula ósea de cada cerdo individual. Usando un elevador dental, se desprendió un premolar de la mandíbula superior e inferior de los ligamentos circundantes y se extrajo con unas pinzas de extracción. La pulpa de los dientes premolares se recuperó y se incubó a 37 ° C durante 30 minutos en Medio Eagle, posteriormente se lavaron y se expandieron en DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, después de la expansión, se estableció una línea de base para los estudios de monocapa. Para evaluar la proliferación, los dos tipos de células se cultivaron por separado junto con el andamio de PCL/HA/TCP en medio osteogénico durante 40 días pues ya existía 80 % de diferenciación. El protocolo quirúrgico se llevó a cabo creando seis defectos no penetrantes en el cráneo de los cerdos usando una broca canulada plana personalizada, es el defecto se colocaron los andamios de PCL/TCP/HA, ya sea con células derivadas de la pulpa o derivadas de médula, después de 5 semanas, se sacrificaron los cerdos para llevar a cabo un análisis mediante tomografía computarizada e histomorfometría, Las conclusiones fueron las siguientes. De primera instancia, hubo una mayor proliferación y diferenciación en los andamios que fueron sembrados con células derivadas de la pulpa dental, estos demostraron una deposición de calcio mostró un aumento más uniforme y más grande dentro de los cultivos, la segunda circunstancia, es que, la



viabilidad y proliferación se mostró mejorada en el andamio de 3 componentes, esto debido a que el TCP aumenta la hidrofilia, por lo cual, le es más fácil adaptarse al constructo con los líquidos de medio circundante, además el papel de la HA, fue fundamental pues esta tiene la cualidad de aumentar u mejorar la osteoconductividad. Dadas estas conclusiones, se cree que la policaprolactona podría tener muy buenas aplicaciones en ingeniería tisular de tejido óseo para paladar fisurado, sin embargo, es necesario evaluar otras condiciones como las características de resistencia a la compresión y los estados de remodelación que esta presenta en un lapso más largo (Jensen, 2016).

## Justificación

La fisura palatina es un defecto que se puede presentar en la anomalía congénita de labio y paladar hendidos, al ser éste uno de los defectos congénitos más comunes, existe la necesidad de diversificar los tratamientos empleados debido a las complicaciones que se presentan cuando el defecto es grande y se necesita obtener más tejido para corregirlo. Por otro lado, las intervenciones quirúrgicas que se llevan a cabo para corregir la fisura palatina, tienen la finalidad de separar las cavidades expuestas mediante la interposición de tejido, esto se puede realizar con tejido de la periferia de la zona o mediante injertos, estos procedimientos son los más frecuentes en la práctica clínica, sin embargo, existe la posibilidad de que se presenten fístulas recurrentes, esto quiere decir, que una vez cerrado el defecto, éste puede volver a presentarse, debido a la disminución de la vascularización que sobreviene con cada intervención, así como la fibrosis desencadenada por la forma de cicatrización. Se ha reportado una incidencia de hasta el 76% de fístulas palatinas posterior a osteoplastia primaria. La recurrencia posterior a la reparación de una fístula nasopalatina, se reporta entre 25 y 33%. Los sitios más comunes de fistulización son el paladar duro y la unión del paladar duro con el paladar blando. Este panorama sugiere una gran limitación que implica un aumento en el coste económico para solventar los recursos humanos y materiales propios de los actos quirúrgicos, retraso en los procesos normales de nutrición y fonación del recién nacido, así como un desgaste emocional de los padres o tutores y el propio afectado.

Los biomateriales son usados en la fabricación de sistemas biológicos, éstos cumplirán el papel de matriz extracelular artificial que favorecerá la función biológica y mecánica de las células que en éste se encuentren. Se clasifican en naturales, sintéticos e híbridos y dependiendo su naturaleza tendrá diferentes propiedades, mismas que se pueden configurar en un laboratorio con la finalidad de potenciarlas, una de sus mayores bondades es su capacidad de absorción al degradarse a una velocidad comparable al crecimiento de tejido nuevo en el sitio de implantación, por lo cual, ya no es necesaria la reprogramación de otra cirugía en la cual se deba retirar el aditamento, tal como sucede con las placas ortopédicas de titanio. La policaprolactona (PCL), es un biomaterial sintético polimérico que se obtiene de la polimerización de caprolactona, un poliéster alifático biodegradable. Al tener un bajo punto de fusión, es utilizado como un plástico capaz de ser modelado a mano o por impresión 3D en la fabricación de prototipos e implantes. La PCL se degrada por hidrólisis de sus vínculos ésteres en condiciones fisiológicas y debido a su lenta y progresiva degradación, ideal para su aplicación en medicina regenerativa ósea, sobre todo aplicada a defectos craneofaciales, en los cuales, la PCL se diseña por medio de un software y se imprime en 3D para adaptarse a las deficiencias de tejido óseo causadas por fisuras o neoplasias.

Actualmente, se están dando grandes avances en las disciplinas médicas y uno de los campos más prometedores es la biotecnología, ayudando a mejorar tratamientos médicos gracias a la transdisciplina entre profesionales de la ingeniería, las matemáticas, la programación y la tecnología formando parte de equipos médicos permiten ofertar terapias y dispositivos que favorecen la mejora de salud de las personas, en ese sentido, las impresoras en tercera dimensión (3D). La impresión en 3D es un proceso mecánico mediante el cual se crean objetos sólidos al imprimir capas sucesivas de material para replicar una forma modelada por medio de un software de computadora, uno de los mayores beneficios de este sistema, es que se pueden configurar los componentes del biomaterial que y se tiene un absoluto control sobre la forma y el tamaño de porosidad del andamio. Las bondades de la aplicación de este sistema en el manejo de las fistulas craneofaciales consiste en la configuración de estas para cada paciente, lo cual, garantizará la cobertura total del defecto, garantizando un menor riesgo de fistulización recurrente.

De acuerdo con la bibliografía, algunos biomateriales elaborados en tercera dimensión sembrados junto con células troncales de una fuente de fácil acceso y que en ocasiones son tejidos de desecho (terceros molares y premolares por razones de ortodoncia) presentan una tasa de proliferación mayor en comparación con las de médula ósea e inductores o biomoléculas, éstas pueden coadyuvar a la obtención de constructos tisulares con propiedades osteogénicas para la formación de hueso. Llevando a cabo la relación de estos pensamientos, se podría pensar que las células troncales con un constructo ideal pudieran servir como esta terapia celular que facilite y

mejore los procedimientos para corregir tal defecto. **Objetivos**

### **Objetivo general**

Detectar la presencia de iones de calcio en los constructos osteogénicos generados con andamios de policaprolactona impresos en tercera dimensión y la siembra de células troncales de pulpa dental de cerdo vietnamita.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar el inmunofenotipo de las células troncales.
- Evaluar la viabilidad y proliferación de células troncales derivadas de pulpa dental de cerdo en un andamio 3D a base de PCL.
- Evaluar la inducción osteogénica del constructo tisular.
- Detectar la presencia de iones de calcio en el constructo osteogénico.

### **Metodología**

Lugar de elaboración: Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, ubicado en la Clínica Odontológica Cuauhtepc, UNAM.

Proyecto financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM, IA207420

## 1. Obtencion de las células

En el laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional se trabaja con distintos tipos de células troncales mesenquimales y para este estudio fueron utilizadas células derivadas de pulpa dental de cerdo, obtenidas de un tercer pase celular después del proceso de aislamiento celular mediante digestión enzimática.

Las células se expandieron de una caja de cultivo tipo T de 75 cm<sup>3</sup>, a 3 cajas T de 25 cm<sup>3</sup> hasta que alcanzaron entre un 70% u 80 % de confluencia, para evitar que el fenotipo mesenquimal pueda verse modificado

## 2. Conteo celular

Para determinar la cantidad aproximada de células se realizó lo siguiente:

2.1-Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se agregaron 5 ml de Tryple Express dejándolas incubar durante 4 minutos a 37°C.

2.2-Se desactivó la acción del Tryple Express colocando 5 ml de medio de cultivo con SFB al 10% y se recolectaron los 10 ml con ayuda de una pipeta serológica en un tubo de 15 ml y se centrifugaron por 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente.

2.3-Se retiró el sobrenadante, y al pellet obtenido se le agregó medio mililitro de medio de cultivo para resuspender las células.

2.4-Se tomaron 10 µl de azul tripán, 10 µl de la solución celular y se colocaron en un tubo cónico Eppendorft de 1.5 ml para resuspenderlos.

2.5-De esta solución celular y azul tripán de 20 µl se tomaron 10µl para colocarlos en la cámara de Neubauer, donde se dejaron reposar para que el colorante hiciera su efecto.

Para su visualización se situaron bajo el microscopio invertido de campo claro con el objetivo de 20x y se contaron las células dentro de los límites de los cuadrados delimitados con el número 1. (Fig. 2)

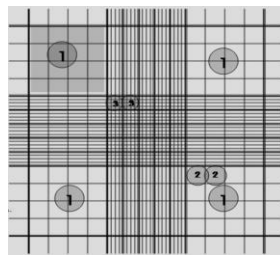


Fig. 2: Cámara Neubauer.

Los números 1 denotan los cuadrantes dentro de los cuales se realizó el conteo celular.

2.7- Las células se contabilizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular en 1 ml} = \frac{\text{Total de Células x 10,000}}{\text{Número de cuadros.}}$$

2.8- Realizado este procedimiento se determinó la cantidad de microlitros que debían sembrarse por pozo con la siguiente regla de tres:

Número total de células. — 1,000  $\mu$ l  
 5,000 Células. — X  $\mu$ l

2.9 -Se sembró el número de microlitros obtenidos de acuerdo al número de células requerido para cada ensayo

### 3. Estudio de inmunofenotipo

Este ensayo permitió verificar la troncalidad de las células, se realizó en cubreobjetos redondo, se sembraron 1000 células, se analizó el anticuerpo CD29 y CD90 y se realizó por duplicado.



Prueba en pozo con 1000 células en portaobjetos redondo	Ensayo 1	Ensayo 2
Duplicado 	CD29	CD29
Duplicado 	CD90	CD90

Tabla 7: Representación de la planificación de las pruebas de inmunofenotipo.

Para cada prueba se realizó lo siguiente:

- 3.1- Se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS Tween al 2%, 3 veces por 2 minutos.
- 3.2- Para fijar las células se colocaron 100  $\mu$ l de formalina sobre la muestra y se esperó por 20 minutos.
- 3.3- Se retiró la formalina y se lavó nuevamente con PBS Tween al 2%, 3 veces durante 2 minutos.
- 3.4- Para permeabilizar se colocaron 100  $\mu$ l de Tritón x-100 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 3.5- Se retiró el Tritón x-100 y se colocaron 100  $\mu$ l de albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) cada muestra, dejándolas incubar por 30 minutos.
- 3.6 -La muestra se lavó nuevamente con PBS Tween al 2%, 3 veces por 2 minutos para colocar 100  $\mu$ l de cada anticuerpo (AntiCD29 y AntiCD90 en proporción 1:100 en BSA al 0.05%) y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente para cada muestra.

3.7 -Cada uno de los anticuerpos se retiró y se lavó con PBS Tween 3 veces por 2 minutos para poder colocar el fluorocromo (Alexa Fluor 488 goat anti-porcine igG (H+L) life technologies)(1:100 en BSA al 0.05%), el cual fue incubado en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3.8- Finalmente se lavó cada muestra con agua destilada y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia ZEISS HXP 120 C (Software ZEN LITE 2012), con el objetivo 10x.

Una vez determinada la troncalidad de las células, se procedió a la planificación de las pruebas de viabilidad y proliferación, las cuales se realizaron de la siguiente forma.

Ensayo	Placas de pozos para sembrado requeridas.	Células por pozo requeridas
Viabilidad - Vida & Muerte.	24	5000
<i>Proliferación- Azul de Alamar (sobre andamio de PCL)</i>	96	5000

Tabla 8: Planificación de los ensayos de viabilidad y proliferación.

#### 4. Ensayo de viabilidad Vida y Muerte

El principio de este ensayo consiste en evaluar la integridad de la membrana celular, si la membrana se encuentra íntegra, se mostrará en color verde por la calceína, en cambio sí se muestra de rojo, es por el etidio, lo cual indica que la membrana se desintegró. Se realizó el ensayo Vida y muerte para evaluar la viabilidad de las células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental de cerdo a los días 3 y 7, con el reactivo LIVE&DEAD (Cell Viability Assays, Thermo Fisher Scientific) por triplicado.

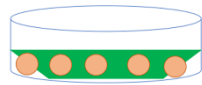
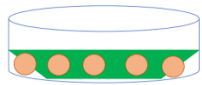
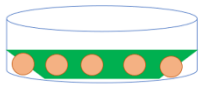
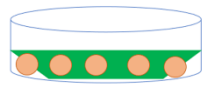
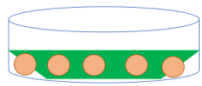
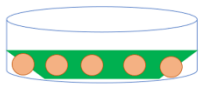
	Pozo con 5,000 células	Pozo con 5,000 células	Pozo con 5,000 células	Periodo de evaluación.
Triplicado				Día 3.
Triplicado				Día 7.

Tabla 9: Planificación de elaboración de los ensayos de viabilidad con reactivo *Live and Dead*.

4.1 - Para la preparar la solución de trabajo de este ensayo se empleó un volumen total de 1000 µl, de los cuales; 997.5 µl fueron son de buffer fosfato salino (PBS) más 0.5 µl de calceína AM y 2 µl de EthD-1.

4.2 - Se retiró el medio de cultivo de los pozos y se lavó con 100 µl de solución PBS cada muestra.4.3 -Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, aislándolas completamente de la luz.4.4- Se observaron las células bajo microscopio invertido de epifluorescencia: Emisión 494/517 nm / Excitación 517/617 nm

### 5. Ensayo de proliferación con Azul de Alamar.

El ensayo con azul de alamar, sirve para medir la actividad metabólica de la célula, esto mediante la oxidación de la rezasurina por parte de las células, esta oxidación se mostrará mediante una coloración rosada, entre más rosada, más actividad metabólica y por ende quiere decir que el andamio no es citotóxico.

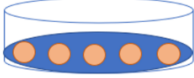
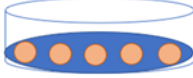
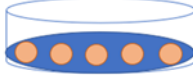


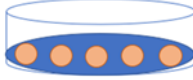
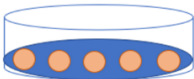
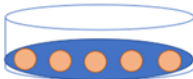
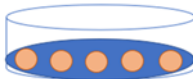
	Pozo con 5,000 células y andamio	Pozo con 5,000 células	Pozo con 5,000 células	Periodo de evaluación.
Triplicado				48 hrs.
Triplicado				Día 3.
Triplicado				Día 7.

Tabla 10: Planificación de elaboración de los ensayos de proliferación con Azul de Alamar de las células sobre el andamio de PCL.

5.1 Se realizó la preparación de una solución de Azul de alamar (AB, alamarBlue Assay - Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando 299  $\mu$ l de medio de cultivo sin rojo fenol junto con 1  $\mu$ l de reactivo de AB y se empleó un volumen total para cada pozo de 300  $\mu$ l.

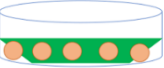

5.2- Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS, se colocaron 300  $\mu$ l de la solución con AB en cada pozo y se incubaron durante 3 horas.

5.3 -Se retiran los 300  $\mu$ l y se colocaron en otra placa de 96 pozos.

5.4 -Se leyeron las muestras en lector de placas a una longitud de onda de 570 nm y una segunda lectura a 630 nm.

Nota: La absorbancia relativa se correlaciona directamente con el número de células viables, es decir, un rosa brillante indica mayor actividad metabólica.

### 6. Inducción al linaje osteogénico.

Pruebas en placa de 24 pozos.	Andamio con 5000 células con medio nutritivo	Andamio con 5000 células y medio MesenCult Osteogenic Differentiation	Días de las evaluaciones
Rojo de alizarina			21 días



Von Kossa			28 días (4 semanas)
-----------	---	---	---------------------

Tabla 11: Planificación de elaboración de las pruebas para inducción al linaje osteogénico.

6.1- Se sembraron las células troncales mesenquimales de pulpa de cerdo sobre los andamios de PCL y se mantuvieron con medio de cultivo, el cual fue cambiado cada 3 días hasta que se observó que las células cubrían el andamio

6.2- Después de dos semanas se retiró el medio de cultivo y se agregaron 300 µl de medio de diferenciación osteogénica (MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit - Human) a cada pozo

6.3- Se cambió el medio de inducción cada tercer día y después de los 21 y 28 días requeridos para cada prueba, se aspiró el medio, primero del control y luego del pozo inducido y se lavó con 1 ml de agua destilada, dos veces durante 2 minutos.

6.4- Se fijó con formalina neutra al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente para realizar posteriormente los ensayos que permitirían verificar la adquisición del fenotipo osteogénico, los cuales incluyen la prueba con rojo de alizarina y la prueba con Von Kossa.

### 7. Ensayo con rojo de alizarina

El rojo de alizarina es una tinción que se utiliza para evaluar los depósitos minerales ricos en calcio durante el proceso de diferenciación osteogénica de los constructos inducidos.

7.1- Para preparar la solución de trabajo de rojo de alizarina, se pesó 1 g de colorante y se disolvió en 50 ml de agua destilada y se dejó en agitación durante una hora aproximadamente.

7.2- Se ajusta el pH a 4.2 con hidróxido de amonio y se guardó en frasco ámbar hasta su uso.

7.3.- Se retiró la formalina, primero de los pozos control y luego de los medios inducidos.

7.4- Se agregó suavemente 1 ml de agua destilada a cada pozo.

7.5- Inmediatamente se retiró el agua destilada y se coloca 1 ml de la solución de trabajo de rojo de alizarina, de tal modo que se cubriera completamente el andamio y se dejó reposar durante 20 minutos.

7.6- Se lavó con agua destilada 2 veces

7.7- Se dejó secar y se observó al microscopio óptico invertido.

### 8- Ensayo con Von Kossa

El principio de esta tinción consiste en la sustitución de iones intratisulares en forma de fosfatos o carbonatos por iones de plata, por lo cual se tiñen de color marrón-negro.

8.2- Las muestras fijadas se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

8.3- Se incubaron las muestras con nitrato de plata al 2% en agua destilada durante 1 hora bajo fuente de luz UV.

8.4 - Se lavaron las células 2 veces con agua destilada durante 5 minutos.

8.5-Se colocaron en solución de tiosulfato sodio (5%) por 2 o 3 minutos

8.6- Lavamos las muestras 2 veces con agua destilada durante 5 minutos.

8.7- Se deshidrataron con etanol al 100% durante 15 min.

8.8- Finalmente se realizó la observación al microscopio óptico invertido.

## Resultados

### Estudio de inmunofenotipo por inmunofluorescencia

En el ensayo para corroborar el fenotipo de células troncales mesenquimales se analizaron las proteínas de superficie CD29 y CD90 (Tabla 12)

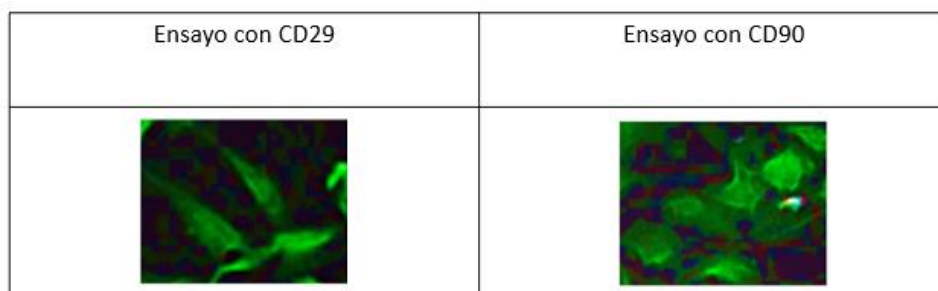


Tabla 12: Imágenes de epifluorescencia, en verde se observan las proteínas de superficie CD29 y CD90.

### Ensayo de viabilidad Vida & Muerte.

El análisis de vida y muerte se realizó con epifluorescencia con el reactivo Live&Dead para evaluar la integridad de la membrana plasmática. Las imágenes obtenidas (Tabla 13) mostraron células vivas en color verde y células muertas de color rojo. Se observa una viabilidad celular alta debido a que no se observaron muy pocas células en color rojo, además de eso se alcanza a observar cómo hay más células vivas en el día 7 en comparación al día 3.

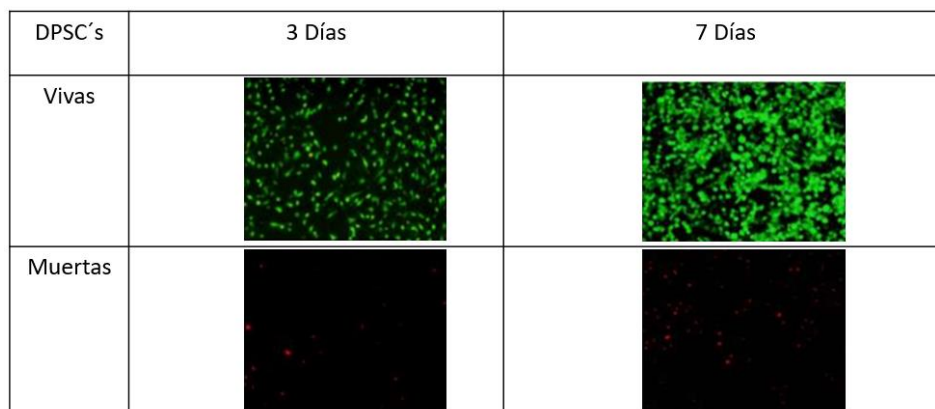




Tabla 13: Resultados fotográficos de la prueba de viabilidad de las células troncales de cerdo vietnamita a los días 3 y 7.

Para poder cuantificar estos datos, posteriormente, se utilizó el programa IMAGE J de FIJI. Para el procedimiento, se estandarizaron los canales de los colores para unificarlos y se asignó de manera automatizada el número de píxeles para los núcleos, siendo 255 para el color negro y 0 para el color blanco, esto nos sirvió para binarizar la imagen, es decir, solo trabajar con blancos y negros para que fuera más rápido y fácil realizar el conteo. En las imágenes se separaron las células que están empalmadas y los núcleos. Por último, se realizó el conteo de manera automática y el programa emitió una tabla de resultados. El conteo se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio, para reducir las posibilidades de error.

CÉLULAS	DÍA 3	DÍA 7
MUERTAS (M)	21	56
VIVAS (V)	353	614

Tabla 14: Resultados del conteo celular del ensayo Vida y Muerte por medio del Software Image J.

### Ensayo de proliferación con Azul de Alamar.

Con el ensayo de AB medimos cuantitativamente la viabilidad celular de las células troncales en el andamio. Los resultados de las lecturas a 570 nm y 630 nm a las 48 hrs, 3 y 7 días arrojaron lo siguiente:

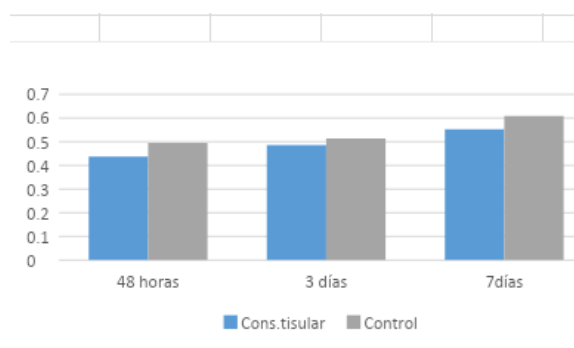


Gráfico 1: Resultados arrojados de las lecturas de las células troncales mesenquimales sembradas sobre el andamio de PCL graficadas.

En la gráfica se alcanza a observar cómo es que la actividad celular fue incrementándose con el transcurso de los días, lo cual indica que el andamio no era citotóxico.

### Inducción al linaje osteogénico.

#### Rojo de alizarina.

Con la tinción de rojo de alizarina se evaluaron los depósitos minerales ricos en calcio durante el proceso de diferenciación osteogénica de los constructos tisulares.

Los resultados fueron los siguientes:

Vista macroscópica.

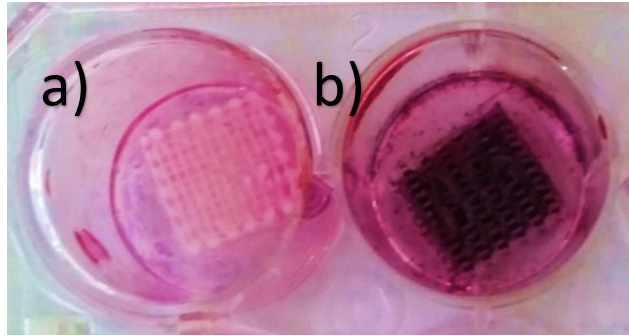


Figura 3: Vista macroscópica del constructo con rojo de alizarina, a) Sumergido en medio nutritivo, b) Sumergido en medio osteogénico.

En esta vista se alcanza a apreciar la tinción del andamio al color rojo, lo cual indica que hay presencia de depósitos de calcio, por lo tanto, si hubo una diferenciación al linaje osteogénico.

Vista microscópica de las células, inducidas y no inducidas:

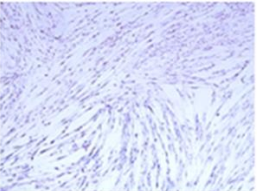
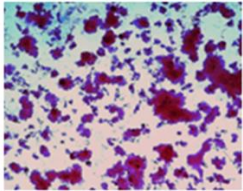
Diferenciación	Células + medio de cultivo	Células + medio MesenCult Osteogenic Differentiation.
Rojo de Alizarina		

Tabla 15: Resultados fotográficos de los ensayos con rojo de alizarina junto con las células troncales en medio de cultivo y medio MesenCult Osteogenic Differentiation.

### Tinción de Diferenciación Osteogénica con Von Kossa

Como parte de la evaluación de la adquisición del fenotipo osteogénico, se realizó un ensayo con Von Kossa y se obtuvieron las siguientes imágenes:

Vista macroscópica:

Como se alcanza a apreciar en esta fotografía, macroscópicamente se nota el cambio de coloración de las células con la tinción Von Kossa, por lo cual se infiere que si hubo una diferenciación

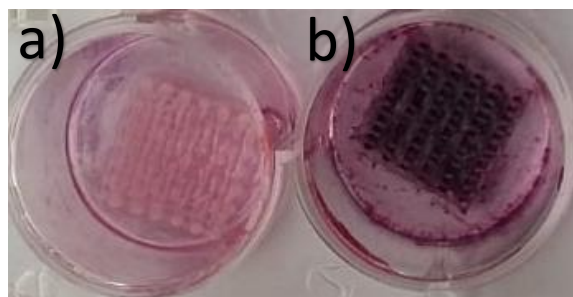


Figura 4: Vista macroscópica del constructo con tinción Von Kossa, a) Sumergido en medio nutritivo, b) Sumergido en medio osteogénico.

Diferenciación	Células + medio de cultivo	Células + medio MesenCult Osteogenic Differentiation.
Von Kossa		

Tabla 16: Resultados fotográficos de los ensayos con Von Kossa junto con las células troncales en medio de cultivo, control y medio MesenCult Osteogenic Differentiation, nótese el color marrón negro que se encuentra en las células.

## Discusión

Durante las últimas décadas, ha existido un aumento en la búsqueda de alternativas a sustitutos de tejido óseo en demanda a la atención de fracturas, neoplasias o malformaciones congénitas, las cuales resultan en la deficiencia de dicho tejido. El labio fisurado con o sin paladar hendido, es la malformación congénita con mayor prevalencia afectando al 1 % de todos los nacidos alrededor del mundo, su etiología corresponde al desarrollo embrionario alterado de los tejidos blandos y duros alrededor de la cavidad oral y la cara. Esta condición repercute de manera importante en la nutrición, el lenguaje y aspectos psicológicos de quien la padece. El abordaje tradicional pretende establecer la división entre la cavidad oral y nasal mediante la tracción de colgajos mucoperiosticos o mediante injertos de tejido duro y/o blando, sin embargo, es común que una vez practicado alguno de estos procedimientos, se presenten las denominadas fístulas recurrentes, las cuales corresponden a hendiduras dadas por la disminución en la vascularización del tejido circundante y la fibrosis generada por los procesos de cicatrización, lo cual provoca una retracción del tejido al ceder la inflamación (Wongworawat, 2003).

La ingeniería tisular aplica los principios de la medicina regenerativa para restaurar la función de órganos o tejidos mediante la combinación de células troncales, inductores y biomateriales, éstos últimos se encargarán de recrear la arquitectura tridimensional del tejido y fungir como matriz extracelular para la nutrición de las células además de facilitar la adaptación inmunológica del constructo al medio biológico que lo contenga. La combinación final de estos 3 elementos (Biomaterial, célula troncal e inductor) constituirán un “constructo tisular” (Atala, 2004).

Gronthos fue el primero en aislar células troncales a partir de la pulpa dental en los terceros molares impactados. A partir de eso, comenzó una revolución en la ciencia médica y odontológica, ya que se buscaron más fuentes de obtención de las células troncales orales, esto debido a la accesibilidad y seguridad para la obtención de estas en comparación con los procesos para la obtención de células troncales de médula ósea, por ejemplo. Tras esta búsqueda, se descubrió que la cavidad oral resultaría ser una gran fuente para la obtención de células troncales, de tal modo que actualmente,

se encuentran documentados al menos 8 fuentes de obtención, mismas que se pueden obtener fácilmente de tejidos que formarían parte de desechos, tales como los órganos dentales sanos extraídos por motivos de ortodoncia tal como terceros molares o premolares (Bianco,2008). La ingeniería tisular, también se dio a la tarea de comenzar con la búsqueda de biomateriales en los cuáles se permita la viabilidad celular y proliferación, los biomateriales se clasificaron de acuerdo a su origen en naturales, sintéticos y biosintéticos. Dentro de estos, los materiales sintéticos llamaron la atención debido a la capacidad de configuración de sus propiedades y sobre todo la flexibilidad que presentan en los procesos de fabricación, actualmente, uno de los más populares corresponde a la impresión 3D que es un proceso mecánico mediante el cual se crean objetos sólidos al imprimir capas sucesivas de material para replicar una forma modelada por medio de un software de computadora. Uno de los mayores beneficios de este sistema, es que se pueden configurar los componentes del biomaterial que y se tiene un absoluto control sobre la forma y el tamaño de porosidad del andamio (Ratner,2012).

La policaprolactona, corresponde a un biomaterial sintético, el cual es un polímero biodegradable y termoplástico con gran capacidad de aplicación en ingeniería de tejido óseo, cartílago y otros tejidos, dando resultados favorecedores. Cuenta con una excelente estabilidad térmica, a tal grado que su punto de congelación es hasta los  $-60^{\circ}\text{C}$  y su punto de ebullición es hasta los  $60^{\circ}\text{C}$ , y aun así sigue conservando todas sus propiedades hasta los  $350^{\circ}\text{C}$ . La policaprolactona, se degrada muy lentamente, más lento que el PLA o el PGA, esto debido a su alta cristalinidad e hidrofobicidad, por lo cual, se puede aplicar en procedimientos que requieran un largo plazo (McKeen,2017).

En la actualidad, diversos estudios resaltan el enorme potencial de las aplicaciones de ingeniería tisular en la medicina regenerativa, pero aún se requiere una amplia investigación científica y clínica para confirmar los mecanismos moleculares de la colonización oral de células madre, la viabilidad y la función en los seres humanos, sobre todo para su aplicación en el manejo del labio y paladar fisurados. Por lo cual, el tema de discusión en este trabajo, resultó en analizar si es que existe la probabilidad de usar la policaprolactona, como un andamio para su aplicación en el defecto de labio y paladar fisurados, y si es que este método resultaría más efectivo para la reparación del defecto en comparación con las técnicas quirúrgicas actuales, sobre todo por la limitante que representan la aparición de fístulas recurrentes.

## Conclusiones

- Se lograron o expandir células troncales derivadas de pulpa dental de cerdo para realizar los ensayos necesarios para este estudio.
- Se logró verificar su troncalidad por medio de la detección de inmunofenotipo con los marcadores CD29 y CD90.
- La viabilidad se pudo comprobar por medio del ensayo Vida y Muerte.
- Se logró evaluar la proliferación por medio del ensayo con Azul de alamar.
- Se llevó cabo la inducción al linaje osteogénico de las células denle el constructo con el medio Mesencult Osteogenic Differentiation.
- Se logró corroborar la inducción de las células y de los constructos por medio de los ensayos con Rojo de alizarina y Von Kossa.

Ya que el andamio de policaprolactona no presentó ningún indicio de citotoxicidad, se puede continuar estudiando sus aplicaciones en modelos *in vivo*.

## Referencias

1. Langer, R & Vacanti, J, (1993), Tissue engineering, Science, New Series, Vol. 260, No. 5110. (May 14, 1993), pp. 920-926.
2. Atala, A, (2004), Tissue engineering of artificial organs, J. of End. Vol. 14, No. 1, <https://doi.org/10.1089/end.2000.14.49>.
3. Luzzani, C, & Miriuka, S, (2017) Pluripotential stem cells as a robust source of mesenchymal stem cells, Rev and Rep, Springer Science + Business Media Nueva York 13: 68.
4. Anderson, D, Gage, F, & Weissman, I.L, (2001), Can stem cells cross lineage boundaries? Nat. Med. 7, 393–39
5. Caplan, A, (1991), Mesenchymal stem cells, J. Orthop Res, Vol. 9, No. 5, 641-650, The Skeletal Research Center, Department of Biology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, U.S.A.
6. Solomon, E, (2013), Biología, 9° Edición, Pearson Cengage Learning, México.
7. Zhao, T, et al, (2010), Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Nature Vol 474, pp. 212–215.
8. Chopra, H, et al, (2013), Stem cells- the hidden treasure: A strategic review. Dent Res J (Isfahan); 10 (4), 421: 427.
9. Li, Y, et al, (2014), In vitro organogénesis from pluripotent stem cells. Organogenesis 10:2, 159–163; April/May/June 2014; © 2014 Landes Bioscience
10. Zhao, M& Prather, R, (2011), The multi-potentiality of skin-derived stem cells in pigs, Theriogenology Volume 75, Issue 8, May 2011, Pages 1372-1380
11. Farnini, A, et al, (2014), Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Diseases, Stem Cells International Volume 2014, Article ID 306573, 11 pages
12. Senoo, M, (2013), Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin, Adv. Wound Care (New Rochelle), 2(6): 273: 282.
13. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS, (1970), The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970 Oct; 3(4):393-403.
14. Owen M, Friedenstein AJ. Ciba Found. Symp. 1988;136:42–60.
15. Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell stem cell, 2(4), 313–319.
16. Scheller, E, Krebsbach, P,& Kohn, D, (2009), Tissue engineering: State of the art in oral rehabilitation. J. Oral Rehabil 36 (5): 368-89.
17. Gronthos, S, et al, (2000), Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, pp. 13625-13630, vol. 97.
18. Seo, J, et al, (2004), Investigation of multi-potent postnatal stem cells from human periodontal ligament, Lancet, pp. 149-155, vol. 364.
19. Miura, M, et al., SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, Proc Natl Acad Sci USA, 2003, pp. 5807-5812, vol. 100.
20. Sonoyama, W, et al. (2006), Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine, pp. 1-8, vol. 1, No. 1.
21. Morsczeck, C, et al, (2005), Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth, Matrix Biol. Apr;24(2):155-65.
22. Yalvac, M, et al, (2009), Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis, Pharmacogenomics J. 2010 Apr;10(2):105-13.

23. Yang, H, et al, (2013), Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions, *Biomaterials*, Volume 34, Issue 29, September 2013, Pages 7033-7047.
24. Huang, H, et al, (2008), Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth, *J Oral Pathol Med*. Oct;37(9):571-4.
25. Broccaioli, E, (2013), Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue, *Biores Open Access*. Apr;2(2):107-17.
26. Lanza, R, Langer, R & Vacanti, J, (2000), *Principles of Tissue Engineering*, Third Edition, American Press- Elsevier.
27. Lu, T, et al, (2013), Techniques for fabrication and construction of three dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 8:337-350.
28. Ratner, B, D, et al, (2012), *Biomaterials science: An introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, Disponible en: <http://ilkerpolatoglu.cbu.edu.tr/docs/Introduction%20to%20Materials.pdf>, Consultado: Agosto, 23, 2019.
29. Kokubo, S, et al, (2004), Long-term stability of bone tissues induced by an osteoinductive biomaterial, recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a biodegradable carrier, *Biomaterials*. May;25(10):1795-803.
30. Vallet, R, (2006), Revisiting ceramics form medical applications, *Dalton Truns*, 44:5211-20.
31. Ilench, L, (1973), Ceramics, glasses and composites in medicine, *Med Instrum*, 7:136- 144.
32. Valimaki, V, Aro, H, (2006), Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute, *Scand J Surg* 95:95: 102.
33. Herrera, J, et al, (1995), Implantation of sepiolite-collagen complexes in surgically created rat calvaria defects, *Biomaterials*, 16:625-631.
34. Kohane, D, (2008), *Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering*, *Pediatr Res* 63, 487-491.
35. Ikada, D, (2006), Challenges in tissue engineering, *Journal of The Royal Society Interface*, 3 (10): 589-601.
36. McKeen, L, (2017), *Renewable Resource and Biodegradable Polymers, Film Properties of Plastics and Elastomers (Fourth Edition)* Plastics Design Library, Pages 449-479.
37. Osorio, et al, (2016), Biomedical applications of polymeric biomaterials, *DYNA*, Volumen 84, Número 201, p. 241-252.
38. Faulk, D, Badylak, S, (2014), *Natural Biomaterials for Regenerative Medicine Applications, Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, Pages 101-112.
39. Hoenich, N, (2006), "Cellulose for Medical Applications: Past, Present and Future," *BioResources* 1(2), 270-280.
40. Dutta, P, et al, (2011). Chitosan : A Promising Biomaterial for Tissue Engineering Scaffolds, (March). doi:10.1007/12
41. Monzack, E, et al, (2012). *Natural Materials in Tissue Engineering Applications*. doi:10.1007/978-3-7091-0385-2
42. Rehm, B, (2009). *Alginates: Biology and Applications: Biology and Applications*. doi:10.1007/978-3-540-92679-5
43. Nisbet, D, et al, (2008), Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels, *Journal of biomedical materials research, Part B, Applied biomaterials*, 87 (1), 251-63.

44. Carriel, V, et al, (2013), Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration , Journal of neural engineering, 10 (2), 206-22.
45. Ruzszczak, Z & Friess, W, (2003), Collagen as a Carrier for on-site delivery of antibacterial drugs, Adv Drug Deliv Rev, 55:1679-1698.
46. Yang, P, Lee, C, (2007), Hyaluronic acid interaction with chitosan conjugated magnetite particles and its purification. Biochem Eng J, 33: 284,289.
47. Dewick, P.M. (2009). *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. UK: John Wiley and Sons. ISBN 978-0-470-74168-9.
48. Mallory FB (1983) Pathological techniques: A practical manual for workers in pathological histology including directions for the performance of autopsies and for microphotography. In: Mallory NY (eds) WB Saunders, Philadelphia, PA, pp 143–144
49. Komori T (Jan de 2008). «Regulation of bone development and maintenance by Runx2». *Front Biosci* 13: 898-903. PMID 17981598
50. García, A, (2012), Osteocalcina: nexo de unión entre homeostasis ósea y metabolismo energético, Elsevier, Vol. 60. Núm. 5.páginas 260-263
51. Daamen, W, et al, (2007), Elastin as a biomaterial for tissue engineering, Biomaterials, Volume 28, Issue 30, October, Pages 4378-4398.
52. Chen, G, Ushida, T&Tateishi, T, (2000), Hybrid Biomaterials for Tissue Engineering, Advanced Materials, Volume12, Issue6 ,March, 2000, Pages 455-457
53. Romagnoli, C, et al, (2013), Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering, Clin Cases Miner Bone Metab, 10 (3): 155-161.
54. Meng, X, et al, (2014), Stem Cells in a three-dimensional scaffold environment, Springerplus, 3:80.
55. Nieto, R, et al, (2011), Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin- agarose scaffold, J Biomater Appl, 25 (7): 743:768.
56. Yang, B et al, (2017), Application of Stem Cells in Oral Disease Therapy: Progresses and Perspectives, Frontiers in Physiology, Vol.8 No. 197, 1-17.
57. Altasair, J, et al, (2009), Dental Pulp Stem Cells: what, where, how?, International Journal of Pediatric Dentistry, 19:61-70.
58. Bullock, G & Petrusz, P. (1989) . Techniques in immuno-cytochemistry. Vol. 4, Academic Press.
59. Duffó, G, (2006), Biomateriales, una mejor calidad de vida, EUDEBA, serie Ciencia Jóven, Buenos Aires
60. Mahon, N, et al, (2015), The 50 Most Cited Papers in Craniofacial Anomalies and Craniofacial Surgery, Arch Plast Surg. 2015 Sep; 42(5): 559–566.
61. Aslantürk, Ö. S. (2018). *In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages* (Vol. 2, p. 64). InTechDOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
62. Präbst, K, et al, (2017), Basic colorimetric proliferation assay: MTT, WST and Resazurin. In Gilbert, D, Friedrich, O, editors. Cell Viability Assays Methods in Molecular Biology. Vol. 1601, New York, Humana Press; DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1)
63. Mosmann, T (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, Vol. 65 (1-2): 55-63.



64. Page, B, et al, (1993), A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro, *International Journal of Oncology*, 3:473-476 DOI: 10.3892/ijo.3.3.473
65. Fotakis, G (2006), In vitro cytotoxicity assays, *Toxicology letters*, 160: 171-177.
66. Invitrogen, (2005), LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit \*for mammalian cells\*, Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, MP 03224, URL: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>, Consultado: 27-Sep-2019.
67. Máris, L, et al; (2011), Frequency of congenital craniofacial malformations in a Brazilian Reference Center, *Rev Bras Epidemiol* 2011; 14(1): 151-60
68. Klein D, (1968), Genetic factors and classifications of craniofacial anomalies derived from a perturbation of the first branchial arch. In: Longacre JJ, editor. *Craniofacial anomalies: athogenesis and repair*. Philadelphia: JB Lippincott; 1968.
69. Linton, A, (1981), A Proposed New Classification of Craniofacial Anomalies, *Cleft Palate Journal*, July Vol.18 No.3, 161-176.
70. Parameswaran, A, (2017), Hemifacial Microsomia, *Journal of Indian Orthodontic Society*, Volume 52, Issue 3, July-September, 151- 166.
71. Martelli, H, (2010), Goldenhar syndrome: clinical features with orofacial emphasis, *Journal of Applied Oral Science*, Nov-Dec; 18(6): 646–649.
72. Ambarkova, V, (2017), Treacher Collins Syndrome, *Int. Biol. Biomed. J. Autumn* ; Vol 3, No 4, 158-161.
73. Yogesh, C, (2008), Maxillonasal dysplasia (Binder's syndrome) and its treatment with costal cartilage graft: A follow-up study, *Indian J Plast Surg*. 2008 Jul-Dec; 41(2): 151–159.
74. Sadler, T, (2014), *Langman: Embriología Médica (9ª. Edición)*, Editorial Médica Panamericana, México.
75. Mahdi, A, (2013), Cleft Lip – A Comprehensive Review, *Frontiers in Pediatrics*, 1: 53, 1-10.
76. Torikai, K, et al, (2009), Primary alveolar bone grafting and gingivoperiosteoplasty or gingivomucoperiosteal flap at the time of 1- stage repair of unilateral cleft lip and palate, *J. Craniofac. Surg*. 20 (2): 1792- 1732.
77. Cho, L, et al, (2013), Review of secondary alveolar cleft repair, *Ann. Maxillofac. Surg*. 3(1): 46-50.
78. Coots B, (2012), Alveolar bone grafting: past, present, and new horizons. *Semin Plast Surg*; 26 (4): 178-183.
79. Theologie, L (2014), et al, Development of surgical techniques of secondary osteoplasty in cleft patients following 12 years experience. *J Craniomaxillofac Surg [Internet]*. 2014 [citado 14 May 2015];42:839-45. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010518213003326>
80. Dominici, L, et al, (2006), Minimal criterio for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement, Cytotherapy* 8 (4): 315- 317.
81. Ruwathi, A, et al, (2014), Interdisciplinary treatment of an adult with a unilateral cleft lip and palate. *J Orthod Sci*.;3(1):17-24. Citado en Pubmed; PMC: 4072390.
82. Ratajczak, J, et al, (2016), *The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering*. Hindawi Publishing Corporation, *Stem Cells International*, 17 pages DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9762871>



83. Wongworawat, A, et al, (2003), Management of alveolar clefts. *J Craniofac Surg.*14(6):840-6. Citado en PubMed; PMC: 14600625.
84. Chul, H, et al, (2018), 3D-printed polycaprolactone scaffold mixed with  $\beta$ -tricalcium phosphate as a bone regenerative material in rabbit calvarial defects, Society for biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials.* Doi:10.1002/jbm.b.3421
85. Jensen, J, et al, (2012), Functionalization of Polycaprolactone Scaffolds with Hyaluronic Acid and  $\beta$ -TCP Facilitates Migration and Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells in vitro, *SICOT ,Tissue engineering* , 21 (3-4), 729-739. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0177>
86. Ta, W, et al, (2015), Osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth on polycaprolactone nanofibers containing strontium phosphate, *Materials Science and Engineering C* 46(2015) 427–434 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.076> 0928-493.
87. Maraldi, T, et al, (2013), Fibroin Scaffold Repairs Critical-Size Bone Defects Supported by Human Amniotic Fluid and Dental Pulp Stem Cells, *TISSUE ENGINEERING: Part A Volume 18, Numbers 9 and 10.*
88. Moreau, J, Caccamese, & J, Coletti, D, (2007), Tissue engineering solutions for cleft palates, *J Oral Maxillofac Surg.* Dec;65(12):2503-11.
89. Oklund,S, Prolo ,D, & Gutierrez ,R. (1986), Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop* ;205:269–291.
90. Hibi, H, et al, (2006), Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material, *Volume 35, Issue 6, Pages 551-555.*
91. Meijer, G, et al, (2007). Cell-based bone tissue engineering. *PLoS medicine*, 4(2), e9. doi:10.1371/journal.pmed.0040009
92. Pourebrahim, N, et al, (2012), A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Volume 42, Issue 5, May, Pages 562-568.
93. Yuanzheng C, Yan G, Ting L, Yanjie F, Peng W, Nan B (2015) Enhancement of the repair of dog alveolar cleft by an autologous iliac bone, bone marrow-derived mesenchymal stem cell, and platelet-rich fibrin mixture. *Plast Reconstr Surg* 135(5):1405–1412
94. Martín, P, et al, (2016). Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(3), 377–388. doi:10.1007/s00418-016-1489-5.
95. Jensen, J, et al (2016), Dental pulp-derived stromal cells exhibit a higher osteogenic potency than bone marrow-derived stromal cells in vitro and in a porcine critical-size bone defect model, *SICOT ,Tissue engineering* 16. DOI: 10.1051/sicotj/2016004
96. Jahanbin, A, et al ,(2015), Success of maxillary alveolar defect repair in rat using osteoblasts differentiated human deciduous dental pulp Stem Cells, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, doi: 10.1016/j.joms.2015.11.3.