



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

T E S I S

**Evaluación e inducción osteogénica de células
troncales papila apical de cerdo vietnamita en
andamio de PCL 3D como alternativa de
tratamiento a paladar hendido.**

PROYECTO PAPIIT IA207420

Que para obtener el título de:

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

FRANCO MUNGUÍA ERICKA SAMANTHA

Sinodales:

Dr. Raúl Rosales Ibáñez

M en C. Arely Montserrat González González

M en C. Rosario Morales de la Luz

Suplentes:

Dr. Álvaro Edgar González Aragón Pineda

Biól. Tomás Ernesto Villamar Duque





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Dedico este trabajo principalmente a Dios, a mi papá, Rei, a mi mamá, Karina y a mi hermana, Fernanda por ser el pilar más importante con su cariño y apoyo incondicional, ya que sin ellos no habría llegado hasta aquí.

De igual forma, agradezco a mi Director de Tesis, Dr. Raúl, que vio en mí el potencial para culminar este trabajo.

A mis asesores que gracias a sus conocimientos hoy puedo sentirme realizada y presentar este trabajo de la mejor forma.

Y a mí honorable institución, la UNAM por darme todas las herramientas para que el día de hoy pueda ser profesionista.

Gracias.

Índice.

1. Índice de tablas e ilustraciones.....	5
2. Índice de abreviaturas.	6
3. Introducción.....	7
4. Antecedentes.....	8
4.1 Embriología craneofacial.....	8
4.1.1 Cráneo (Neurocráneo y viscerocráneo).	8
4.1.2 Cara.....	9
4.1.3 Aparato faríngeo.....	11
4.1.4 Desarrollo de la lengua.....	12
4.2 Anomalías o malformaciones craneofaciales.....	13
4.2.1 Disostosis craneofaciales:	13
4.2.2 Craneosinostosis.....	14
4.3 Labio y/o paladar hendido (LPH).....	14
4.3.1 Clasificación Internacional de Enfermedades.....	14
4.3.2 Etiología del labio y/o paladar hendido.	15
4.3.3 Manifestaciones clínicas.....	16
4.3.4 Tratamiento.....	16
4.4 Ingeniería tisular.	17
4.4.1 Células troncales	17
4.4.2 Clasificación de las SC.....	17
4.4.3 SC bucales.....	18
4.4.4 SC estudiadas de otras especies para su aplicación en humanos.	20
4.5 Biomateriales	20
4.5.1 Andamios.....	21
4.6 Policaprolactona (PCL).	22
4.6.1 Propiedades de la PCL	22
4.6.2 Formas de fabricación de la PCL.....	22
4.6.3 PCL mezclado con otros materiales para mejorar sus propiedades.....	23

4.7 PCL en regeneración ósea y estudios previos.....	26
4.8 Inducción de SCAPs a linaje osteogénico.....	26
4.9 Ingeniería tisular ósea (ITO).....	27
4.9.1 Células para la ITO.	27
4.9.2 Andamios para la ITO.....	27
4.9.3 Medios inductores.....	28
4.9.4 Proteínas para medios de inducción.	28
4.9.5 Constructo tisular.	28
5. Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular.....	29
6. Planteamiento y definición del problema.....	30
7. Objetivos.	30
8. Hipótesis de investigación.....	31
9. Materiales y métodos.	31
9.1 Conteo y viabilidad celular.....	31
9.2 Ensayo de citotoxicidad celular.....	31
9.3. Análisis estadístico de resultados de prueba MTT.....	33
9.4 Inducción de las SCAPs a linaje osteogénico.....	33
9.5 Ensayos histológicos con las tinciones Von Kossa y Rojo de Alizarina.....	33
Resultados.....	34
10. 34	
10.1 Citotoxicidad celular por medio de ensayo MTT.....	34
10.2. Análisis estadístico de prueba MTT.	36
10.3 Adquisición del linaje osteogénico mediante la Tinción de Von Kossa.....	36
10.4 Adquisición del linaje osteogénico mediante tinción con Rojo de alizarina. .	37
11. Discusión.	38
12. Conclusiones.	41
13. Bibliografía.	42

1. Índice de tablas e ilustraciones.

Tabla 1- Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10, Tomada de Serrano, C. 2009	15
Tabla 2-Clasificación de materiales (40,41, 42,43).....	21
Tabla 3 - Formas de fabricación de andamios de PCL.....	23
Tabla 4. Materiales que se han mezclado con PCL, Tomado de Dwivedi, 2020.	26
Tabla 5 - Proteínas inductoras o moléculas bioactivas (78)	28
Tabla 6 - Resultados del espectrofotómetro	36
Tabla 6 - Resultados del espectrofotómetro	35
Tabla 7 - Ventajas y desventajas de los materiales para andamios (109).....	39
Ilustración 1 -Embrión de 30-32 días. Tomado de Moore 2013 (16).	10
Ilustración 2 - Representación de la posición de los arcos faríngeos. Tomado de Ramírez 2018. (91)	11
Ilustración 5- Figura de la placa donde se realizó la prueba MTT	34
Ilustración 7- Vista de la tinción Von Kossa a 28 días de cultivo	37
Ilustración 8 - Tinción rojo de alizarina a 28 días de cultivo	38
Ilustración 8 - Tinción rojo de alizarina a 28 días de cultivo	38

2. Índice de abreviaturas.

SC Células Troncales

SCAPs Células Troncales de la papila apical

VEU Vida extrauterina

VIU Vida intrauterina

PFN Proceso frontonasal

PMx Procesos maxilares

PMn Procesos mandibulares

CFA Malformaciones craneales

LPH Labio paladar hendido

LF Labio fisurado

PF Paladar fisurado

LPHu Labio y paladar hendido unilaterales

LPHb Labio y paladar hendido bilateral

GPP Gingivoperiosteoplastia

PSIO Ortopedia infantil prequirúrgica

PNAM el moldeado alveolar nasal prequirúrgico

PCL Policaprolactona

IPSC Células Troncales pluripotentes inducidas

SCE o ESC's Células Troncales embrionarias

SCA Células Troncales Adultas

MSC Células Troncales Mesenquimales

DPSCs Células Troncales de la pulpa dental de dientes permanentes

SHEDs Células Troncales de la pulpa de dientes deciduos exfoliados o temporales

DFPCs SC del folículo dental

SCAPs Células Troncales de la papila apical

PDLSCs Células troncales del ligamento periodontal

ITO Ingeniería tisular ósea

MEC Matriz extracelular

RPM Revoluciones por minuto

G Gravedades

3. Introducción

El paladar fisurado afecta aproximadamente a 1:700 nacidos vivos, dependiendo de su ubicación geográfica de nacimiento, características de raza, entre otras. Las poblaciones de más prevalencia son la asiática y amerindias con un índice de 1:500 (1). Esta patología es tratada mediante múltiples cirugías, en las cuales a veces es necesario el uso de injertos de hueso para corregir dicho defecto, y a su vez los injertos autólogos no son suficientes o presentan morbilidad del sitio donador, infecciones o daño a los nervios de la zona, entre otras complicaciones (2). Es por ello que, con la ayuda de la ingeniería tisular, que se encarga de diseñar constructos o sustitutos tisulares en el laboratorio con la posibilidad de ser trasladados y evaluados en ensayos preclínicos y clínicos, se buscan alternativas de tratamiento menos invasivas y más exitosas (3). El principal recurso del que se apoya la ingeniería tisular son las células troncales o *stem cells* (SC, por sus siglas en inglés), estas se pueden obtener de diferentes zonas del cuerpo incluyendo la cavidad oral, y dentro de ésta una de ellas son SC de papila apical o *stem cells apical papilla* (SCAPs, por sus siglas en inglés). Cuando los órganos dentarios están en desarrollo, la formación radicular inicia cuando las células del asa cervical proliferan y se dirigen apicalmente, formando la vaina epitelial de Hertwig. La papila apical se ve involucrada en la formación de los dientes y posteriormente se convertirá en tejido pulpar (4). La papila apical se puede obtener de premolares y de los terceros molares, dientes que se extraen a temprana edad por falta de espacio para los demás dientes en las arcadas de la boca. Las SCAPs tienen capacidad de proliferación, autorrenovación y formación de linajes celulares osteogénicos, odontogénicos, neurogénicos, adipogénicos, condrogénicos e incluso hepatogénicos (5). Las SCAPs presentan marcadores iguales a las SC mesenquimales (6), son primordiales en la formación radicular y también se ha demostrado que su potencial proliferativo es mayor que el de las SC de la pulpa dental (7). Se han estudiado a las SCAPs para diferenciarlas principalmente a tejidos dentales como pulpa, dentina, formación radicular (8), y hacia linaje osteogénico, ya que son una gran opción para la ingeniería de tejidos (9), para la reparación de defectos óseos congénitos e incluso para resolver los problemas más frecuentes de los injertos actuales (10) con el fin de dar solución a los desafíos más grandes de la odontología y de la cirugía maxilofacial, haciendo que todos los tratamientos para reparar defectos óseos embrionarios o derivados de traumas sean quirúrgicos pero utilicen biomateriales que imiten el tejido óseo

con terapias donde no existan problemas de rechazo inmunológico al injerto o donde se tenga que realizar una extracción ósea auto donante (injertos autólogos) (11).

Los biomateriales son de diferente naturaleza, la policaprolactona (PCL) es un polímero utilizado en procedimientos médicos, por su biocompatibilidad, la facilidad de manipular su arquitectura y por los tiempos de degradación bajos que tiene, siendo de los materiales más investigados (12). La PCL es un polímero biodegradable y termoplástico con gran capacidad de aplicación en ingeniería de tejido óseo, cartílago y otros, dando resultados favorecedores, ya que se degrada muy lentamente debido a su alta cristalinidad e hidrofobicidad, por lo cual, se puede aplicar en procedimientos que requieran un largo plazo de duración. En relación con su aplicación junto con las SCs, la PCL podría ser una gran herramienta para su uso en el campo de la medicina regenerativa ósea (90).

En ese sentido en la presente investigación se emplearán andamios de PCL hechos en 3D con SCAPs de cerdo Vietnamita, con el fin de estandarizar el uso de este constructo tisular como una alternativa a los injertos óseos actuales.

4. Antecedentes.

4.1 Embriología craneofacial.

La cabeza y cráneo se desarrollan de la cresta neural (tejido nervioso), durante la 3ª semana de desarrollo embrionario cuando inicia la formación del tubo neural a partir de las crestas neurales derivadas de la placa neural, así ocurre la diferenciación de los tejidos nerviosos (13) y de mesénquima verdadera, para más tarde dar paso al desarrollo de las células del tejido conjuntivo, células óseas etc. Durante el desarrollo craneofacial embrionario se pueden distinguir tres estructuras: cráneo (desmocráneo y neurocráneo), cara (viscerocráneo) y los arcos faríngeos (14,15).

4.1.1 Cráneo (Neurocráneo y viscerocráneo).

El cráneo está formado de mesénquima por la migración de las células de la cresta neural, se divide en neurocráneo (huesos colindantes al encéfalo) y viscerocráneo (huesos faciales). A su vez el neurocráneo se divide en neurocráneo cartilaginoso que al osificarse da origen a los huesos de la base craneal y el neurocráneo membranoso correspondiente al tejido fibroso,

que posteriormente formará las suturas de la bóveda craneal (16), estos espacios membranosos (fontanelas) son suturas amplias que permiten el crecimiento craneal y comienzan a osificarse aproximadamente desde los 7 meses hasta los 2 años de vida extrauterina (VEU) (14), y al término de la osificación el cráneo queda conformado por ocho huesos, cuatro impares (frontal, occipital, esfenoides y etmoides) y dos huesos pares (parietal y temporal) (17).

4.1.2 Cara.

En la cara se lleva a cabo el desarrollo del sistema estomatognático facial formado por las hendiduras faríngeas y el proceso frontonasal, Inicia su formación en la cuarta semana de vida intrauterina (VIU) y termina su desarrollo morfológico en la VEU (15). La cara proviene del viscerocráneo (14), el cual da forma a la parte anterior del cráneo y se desarrolla a partir del mesénquima de los arcos faríngeos (18). Este se encuentra formado por 3 huesos impares (mandíbula, vómer y etmoides) y seis huesos pares (maxilar, nasal, cornete nasal inferior, lagrimal, palatino y cigomático) (17). El desarrollo de la cara se da con la formación de cinco procesos alrededor del estomodeo (prominencias o procesos faciales):

4.1.2.1 Proceso frontonasal medial (PFN): Proviene del primer y segundo arcos faríngeos, es único y está ubicado en la parte media superior del estomodeo. Este recibe células de la cresta neural del prosencéfalo y está conformado por una porción frontal que dará origen a la frente, una porción nasal que dará origen a la nariz y una parte del PFN que rodea al prosencéfalo ventrolateralmente el cual formará las vesículas ópticas (16, 17).

4.1.2.2 Procesos maxilares (PMx): Son pares, ubicados uno a cada lado del estomodeo. Forman las partes laterales del labio superior al unirse con el filtrum (19).

4.1.2.3 Procesos mandibulares (PMn): Estos se ubican en la parte inferior del estomodeo y dan forma el labio inferior, la mandíbula y estructuras colindantes de la región inferior de la cara (19).

En conjunto, los procesos con su crecimiento paulatino y constante dado por la proliferación de las células de la cresta neural, conformarán la cara cuando comience a romperse la membrana bucofaríngea en la cuarta semana de VIU (15). Estos procesos son centros activos

de crecimiento (mesénquima), y esto mantiene la unión entre las prominencias faciales (16). Así inicia el crecimiento de las placodas nasales en el PFN y al inicio de la quinta semana comienza a proliferar el mesénquima para formar las prominencias nasales mediales y laterales (15). Para la semana 6ª de VIU se forman en la cara interna de los PMx los procesos palatinos que posteriormente se colocan horizontalmente para fusionarse con los bordes libres del paladar primario y así dar lugar al paladar secundario (20). A su vez la nariz estará formada gracias al PFN, a los procesos nasales externos y los procesos nasales internos (21). El labio superior se va a formar gracias a los PMx y nasomediales. El labio inferior tomará su forma a partir de los PMn, esto cuando el ectodermo del estomodeo dé origen a la lámina labiogingival (19), la cual formará al surco labiogingival que separa los labios de la encía delimitada por los procesos palatinos (20). Los PMx y nasolaterales se encuentran separados por ectodermo, formando el surco nasolagrimal, el ectodermo propio de este surco forma un cordón epitelial que se recanaliza cuando se unen los PMx formando el conducto nasolagrimal (20). Por último, los orificios nasales, que estaban dirigidos hacia arriba, van descendiendo y al mismo tiempo los esbozos oculares que estaban laterales migran hacia ventralmente, de esta manera aproximadamente a partir del día 44 de VIU ya se puede observar una cara más humana en el embrión (22).

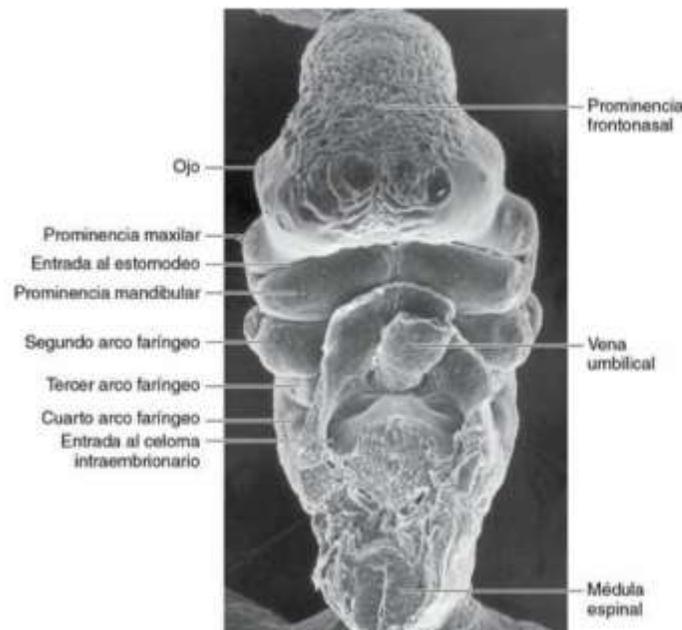


Ilustración 1 -Embrión de 30-32 días. Tomado de Moore 2013 (16).

4.1.3 Aparato faríngeo.

Consiste en conjunto de arcos, bolsas, surcos y membranas pares, ubicados en la región cefálica del embrión alrededor de la faringe primitiva. Este aparato comienza su desarrollo en la 4ª semana de VIU y es parte fundamental en la formación de la cara y cuello (23).

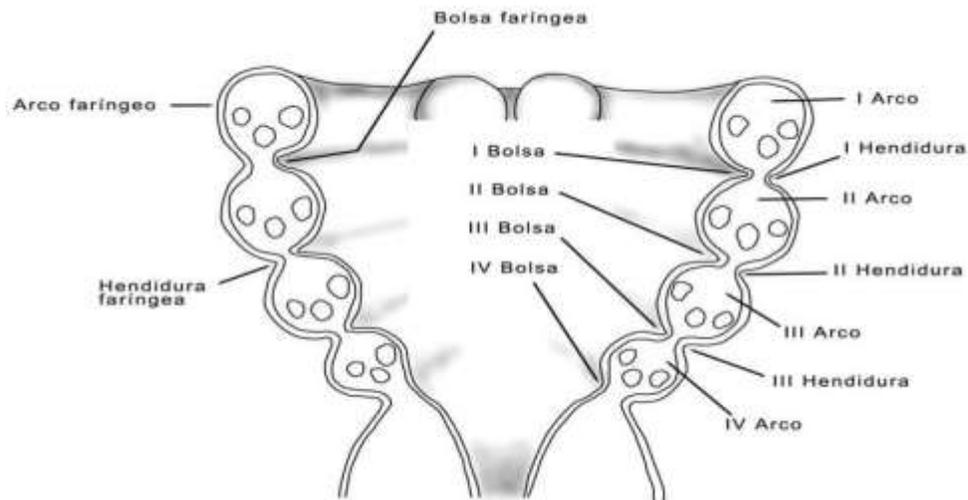


Ilustración 2 - Representación de la posición de los arcos faríngeos. Tomado de Ramírez 2018. (91)

Los arcos faríngeos inician su desarrollo por migración de las células de la cresta neural. En total son 6 pares y cada uno va acompañado de un nervio, un fascículo muscular y un arco vascular, así como un fascículo cartilaginoso (22). Estos arcos son:

4.1.3.1 Primer arco faríngeo (mandibular): Aparece aproximadamente a los 23 días de VIU (15). Está formado por el cartílago de Meckel dispuesto en forma de herradura, el cual se articula con la base del cráneo para formar dos huesecillos del oído (martillo y yunque) y el resto del cartílago inducirá la formación del hueso mandibular (16). El nervio asociado a este arco faríngeo es el V (trigémino) en sus ramas maxilar y mandibular, y está vascularizado por la arteria maxilar, así mismo el ectodermo y endodermo que se encuentran en este arco darán origen a la mucosa y a las glándulas de los dos tercios anteriores de la lengua (24).

4.1.3.2 Segundo arco faríngeo (hioideo): Aparece aproximadamente a los 24 días y junto con el primer arco faríngeo son los de mayor tamaño. Da forma al opérculo, el cual dará lugar al recubrimiento del cuello (22), a partir de este arco se desarrolla el tercer huesecillo del oído (estribo) y su músculo, la apófisis estiloides, el ligamento

estilohioideo y las astas menores del hueso hioides (16), el nervio craneal correspondiente a este arco es el VII (facial). Está irrigado por la arteria hioidea y la arteria estapedia (presentes solo en VIU) (24).

4.1.3.3 Tercer arco faríngeo: Se forma durante la quinta semana de VIU (16). De este arco deriva la parte posterior de las astas mayores del hioides, y de su parte anterior junto con el segundo arco forman el cuerpo del hueso hioides y el músculo estilofaríngeo, e igual participa en la formación de las estructuras faríngeas. El nervio correspondiente a este arco es el IX (glossofaríngeo) el cual dará inervación al músculo estilofaríngeo, a los músculos y mucosa de la faringe, este arco está vascularizado por la arteria carótida común y por la primera parte de la arteria carótida interna (24).

4.1.3.4 Cuarto, quinto y sexto arcos faríngeos: El quinto arco faríngeo se degenera rápidamente sin dejar vestigios, el cuarto y sexto arcos se fusionan y forman todos los cartílagos de la tiroides excepto a la epiglotis (18), también de aquí se originan los músculos laríngeos y faríngeos, del cuarto arco los músculos intrínsecos de la laringe y del sexto arco los músculos constrictores de la faringe y el músculo elevador del velo del paladar (22). El nervio asociado a estos arcos faríngeos es el X (vago) en su rama laríngea superior para el cuarto arco y para el sexto el nervio laríngeo recurrente, la vascularización está dada para el lado izquierdo del cuarto arco por el arco aórtico y para el lado derecho por la arteria subclavia, para el sexto arco faríngeo del lado izquierdo está la arteria pulmonar y el conducto arterioso, y para el lado derecho la arteria pulmonar (24).

4.1.4 Desarrollo de la lengua.

La lengua se ubica dentro de la cavidad bucal formando junto con sus músculos el piso de la boca, y se encuentra fija mediante músculos al hueso hioides, a la apófisis estiloides y a la mandíbula (17), inicia su formación al final de la 4ª semana de VIU a partir de los 3 primeros arcos faríngeos y se encuentra inervada por los pares craneales V, VII Y IX (16).

Aparece en un inicio como 2 protuberancias laterales y una media (tubérculo impar) y una eminencia hipobranquial (cópula) la cual guiará la formación de la epiglotis. Las protuberancias laterales se van a fusionar para formar el cuerpo de la lengua (25) y el tercio

posterior de la lengua o raíz estará formada por la eminencia hipobranquial, la unión de estos tercios deja visible un surco terminal conocido como la V lingual (15).

4.2 Anomalías o malformaciones craneofaciales.

Se desconoce la etiología del 50-60% de las malformaciones congénitas, las cuales son defectos en la forma, estructura o posición de un órgano debido a un desarrollo anormal intrínseco del mismo (16). Las malformaciones se pueden dar por una alteración en la migración de las células de la cresta neural en la etapa embrionaria, sin embargo, se han identificado agentes teratogénicos que impactan a la madre durante el embarazo, afectando el desarrollo craneofacial del embrión (15). También se ha establecido que en algunos casos pueden estar involucrados factores de crecimiento o sus propios receptores, provocando el cierre precoz de las suturas craneales, dando como resultado las malformaciones craneales (26). Las anomalías craneales-faciales también llamadas malformaciones craneales (CFA por sus siglas en inglés), se manifiestan desde la etapa embrionaria y clínicamente desde el nacimiento, aunque pueden ser detectadas antes del nacimiento por medio de ecografías, análisis de suero materno, amniocentesis, entre otras (25).

A estas condiciones se les da tratamiento quirúrgico durante la etapa infantil de la vida, donde suponen un riesgo para el desarrollo intelectual y físico del niño, e incluso lo ponen en una situación de vida o muerte si no son tratados correctamente, así como el impacto social tanto para el paciente como para su familia y su entorno, situaciones que pueden afectar su autoestima y vida social (27). A continuación se presentan las CFA más comunes.

4.2.1 Disostosis craneofaciales:

CFA referentes a los arcos faríngeos:

4.2.1.1 Primer arco faríngeo: Se dan durante la 4ª semana de VIU. Los síndromes son: Síndrome de Treacher Collins y la secuencia de Pierre Robin (28).

4.2.1.2 Segundo arco faríngeo: Síndrome de Goldenhar, Microsomia cráneo facial (28,29).

4.2.1.3 Tercer arco faríngeo: Aquí se presentan malformaciones del timo y de las glándulas paratiroides. Las patologías derivadas de este arco comprenden el hipoparatiroidismo congénito afectando principalmente el crecimiento del niño (28).

4.2.1.4 Cuarto, quinto y sexto arcos faríngeos: Estas anomalías pueden afectar el tamaño y/o forma del cartílago cricoides, causando patologías como estenosis subglótica congénita y laringomalacia (16,28).

Otras disostosis craneofaciales son el Síndrome de Nager y el Síndrome de Binder (26).

4.2.2 Craneosinostosis.

Estas malformaciones están dadas por un cierre prematuro en las suturas craneales, lo cual no permite el crecimiento y adaptación de los órganos craneales en la VEU ocasionando alteraciones en la forma craneal. Clínicamente se observará como un cráneo deformado al momento del nacimiento (30). Para clasificar a estas anomalías se toma en cuenta la forma del cráneo, y encontraremos las siguientes: Sinostosis sagital, Sinostosis metópica, Sinostosis bicoronal, Sinostosis unicoronal y Sinostosis lambdoidea (26).

Algunas de las malformaciones antes mencionadas pueden estar acompañadas de labio y/o paladar hendido.

4.3 Labio y/o paladar hendido (LPH).

Este defecto puede darse como parte de un síndrome o bien de manera aislada. Esta patología afecta el labio superior, el reborde alveolar, el paladar duro y por ende el paladar blando, lo que conlleva a una comunicación anormal entre la cavidad nasal y la cavidad oral, afectando también a las estructuras nasales y musculares orofaciales (31). Las hendiduras se pueden encontrar en las siguientes formas: Labio Fisurado (LF), Paladar Fisurado (PF), Labio y paladar hendido unilaterales (LPHu) y Labio y paladar hendido bilateral (LPHb) (32).

4.3.1 Clasificación Internacional de Enfermedades

Clasificación CIE-10 general	Clasificación CIE-10 específica	Lugar
Q35	Q35.1	Fisura paladar dura
Paladar	Q35.3	Fisura paladar blando
Hendido	Q35.5	Fisura de paladar duro y blando

	Q35.7	Fisura de úvula
	Q35.9	Fisura de paladar sin especificar
Q36 Labio Hendido	Q36.0	Fisura labial bilateral
	Q36.1	Fisura labial media
	Q36.9	Fisura labial unilateral
Q37 Labio y Paladar Hendido	Q37.0	Fisura de paladar duro con fisura bilateral de labio
	Q37.1	Fisura de paladar duro con fisura unilateral de labio
	Q37.2	Fisura de paladar blando con fisura bilateral de labio
	Q37.3	Fisura de paladar blando con fisura unilateral de labio
	Q37.4	Fisura de paladar duro y blando con fisura bilateral de labio
	Q37.5	Fisura de paladar duro y blando con fisura unilateral de labio
	Q37.8	Fisura de paladar sin especificar con fisura de labio bilateral
	Q37.9	Fisura de paladar sin especificar con fisura de labio unilateral

Tabla 1- Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10, Tomada de Serrano, C. 2009

4.3.2 Etiología del labio y/o paladar hendido.

Generalmente es de origen multifactorial, puede estar asociado a síndromes de falla cromosómica, predisposición genética, fármacos teratógenos, enfermedades virales en la madre, nutrición materna deficiente, consumo de tabaco o alcohol, e incluso la obesidad durante el embarazo, uso de drogas entre otros (28, 91).



Ilustración 3 - Lactante con LPH unilateral. Tomado de Moore 2013. (16)

4.3.3 Manifestaciones clínicas.

Dependerá del tipo de fisura que presente el paciente, sin embargo, generalmente se verá afectado el labio superior y sus músculos, el reborde alveolar superior, el paladar duro y el paladar blando, se observará una comunicación oroantral importante por el defecto en el paladar y a su vez se encontrarán afectados los huesos propios de la nariz (26). En la fisura más compleja se podrá observar a la premaxila separada del maxilar afectando en un futuro a los dientes correspondientes a este segmento, también se ve afectado el perfil facial y la cara del paciente se verá desviada hacia el lado donde no se encuentra la hendidura (28).

4.3.4 Tratamiento.

El tratamiento es multidisciplinario principalmente quirúrgico, como la gingivoperiosteoplastia (GPP), palatoplastía, cirugía ortognática, ortopedia infantil prequirúrgica (PSIO por sus siglas en inglés) (33) ortodoncia, y el modelado nasoalveolar (MNA). Sin embargo, estas técnicas pueden afectar o frenar el desarrollo maxilar y del tercio medio facial, así como afectar la brecha alveolar teniendo que someter al paciente a más de una cirugía (34), a injertos de hueso alveolar (autólogos, aloplásticos, entre otros) (35), siendo los injertos autólogos los más estudiados y utilizados durante el tratamiento de esta patología. Los injertos se han utilizado para brindar soporte óseo dental en la zona de la hendidura, para ayudar a fusionar los segmentos afectados y así mismo dar volumen a los labios mejorando la estética facial (36). El injerto de hueso autólogo brinda muchas ventajas, sin embargo, presenta problemáticas como la extracción necesaria del injerto por cirugía invasiva, la cantidad disponible del mismo es poca, existe un potencial rechazo del injerto, afecciones en el sitio donante, entre otras (37).

Por lo tanto, la ingeniería tisular, pretende dar una nueva alternativa de tratamiento (37), en la cual se pueda realizar la diferenciación de SCAPs a células osteogénicas para lograr un injerto sin riesgos de rechazo, y que resuelva uno o más de los problemas que están registrados referentes a los tratamientos antes mencionados, y así tener tejidos competentes que incluso tengan músculo, inervación y vascularización.

4.4 Ingeniería tisular.

Es un campo de investigación en el cual se pueden formar nuevos tejidos, regenerarlos, sustituirlos o mejorarlos, para ayudar en el tratamiento de lesiones o en caso de insuficiencia de órganos o tejidos (38). La ingeniería tisular parte de elementos que nos dicen que la regeneración de los tejidos se da al combinar células, biomateriales y factores de crecimiento junto con medios inductores. Si estos elementos actúan de manera armoniosa dará como resultado la regeneración y/o formación de tejidos (39).

4.4.1 Células troncales

Las células troncales o *Stem Cells* (SC, por sus siglas en inglés), son células primitivas de forma fibroblastoide de origen mesodérmico y funcionan como una unidad de desarrollo en la etapa embrionaria y de regeneración en la etapa adulta humana (48). Estas células se pueden obtener de diferentes tejidos como de la médula ósea, piel, tejido adiposo, membranas sinoviales, hueso trabecular, sistema nervioso e incluso de la cavidad bucal (49). Para que las SC sean viables para su uso en regeneración tisular deben cumplir ciertos criterios como: tener adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo, tener morfología fibroblastoide, expresar marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 (positivos), CD34, CD45, CD14, CD11, CD79, CD19 y HLA-DR (negativos), que menos de un 3% de la población los exprese y por último tener capacidad multipotencial osteogénica, condrogénica y adipogénica *in vitro* (50).

4.4.2 Clasificación de las SC.

La clasificación de estas células está dividida por su origen y por su potencial o capacidad de diferenciación (48).

4.4.2.1 Por su origen, las SC se dividen de la siguiente forma:

- **Embrionarias (SCE o ESCs por sus siglas en inglés):** Son células pluripotentes que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de célula del organismo y también pueden dividirse un número “ilimitado” de veces (51).

- **Adultas (ASCs por sus siglas en inglés):** Son células con capacidad de autorrenovación por cierto periodo de tiempo y pueden diferenciarse especializándose en el mismo tipo celular de donde se derivó (51).
- **Células Troncales Pluripotentes inducidas (iPSC por sus siglas en inglés):** Estas fueron descubiertas por Takahashi, y col. Y demostraron que era posible reprogramar el desarrollo celular y obtener células con características muy similares las ESC's (52). Recientemente, usando una metodología similar, varios estudios han reportado la obtención de iPSC humanas (53), por lo cual no se requiere la utilización de embriones y esto permite a la comunidad científica tener una fuente de células pluripotentes viable y socialmente aceptable (54).

4.4.2.2 Por su **potencialidad o capacidad de diferenciación** podemos encontrar:

- **Totipotenciales:** Pueden dar origen a todas las células embrionarias, se derivan de la mórula y solo están presentes en la etapa embrionaria (48,55)
- **Pluripotenciales:** Proviene del blastocisto, éstas no pueden generar un embrión completo, pero pueden diferenciarse en endodermo, mesodermo y ectodermo pero solo se encuentran en la etapa embrionaria (56, 57).
- **Multipotenciales:** Tienen un rango limitado de diferenciación a linajes celulares de acuerdo con su localización, son autorrenovables de por vida y se ha visto que en los organismos adultos o *in vivo*, estas células pueden dividirse repetidamente para repoblar un tejido (57).
- **Oligopotenciales:** Dan origen a dos o más tipos celulares en un tejido (51).
- **Unipotenciales:** Son capaces de generar un solo tipo de linaje celular (58).

4.4.3 SC bucales.

En la cavidad bucal, las células troncales mesénquimales (MSC por sus siglas en inglés) tienen potencial de multidiferenciación, incluyendo linaje osteodontogénico, adipogénico y neurogénico. Estas células se pueden clasificar en las que se derivan de órganos dentarios y las que se derivan de la mucosa bucal (59).

MSC derivadas de tejido dental:

- **SC de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSCs por sus siglas en inglés):** Son multipotenciales y tienen capacidad de adherencia en cultivo (60), estas pueden regenerar tejidos dentales y se obtienen frecuentemente de la pulpa de los terceros molares extraídos (61).
- **SC de la pulpa de dientes deciduos exfoliados o temporales (SHEDs por sus siglas en inglés):** Estas pueden diferenciarse a células nerviosas, adipocitos y a células odontogénicas (62).
- **SC del folículo dental (DFPCs por sus siglas en inglés):** Son células desarrolladas del mesénquima que rodea al germen dentario cuando se desarrolla y se pueden obtener antes de que el órgano dental erupcione (63).
- **SC de la papila apical (SCAPs por sus siglas en inglés):** Tienen un alto potencial proliferativo y gran capacidad de autorrenovación, también son capaces de diferenciarse a distintos linajes de células (osteogénicas, odontogénicas, neurogénicas, adipogénicas, condrogénicas y hepatogénicas) (5).

MSC de tejidos blandos:

- **SC del ligamento periodontal (PDLSCs):** Estas células son capaces de formar cemento radicular y tejidos periodontales (64).

MSC derivadas de la mucosa:

- **SC de la mucosa bucal y las SC de la encía:** Tienen capacidades parecidas tales como capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotente (65).

La aplicación de las SC en odontología está dirigida a diferentes tratamientos como la reparación de defectos óseos, regeneración de tejido dental, trasplante de dientes, regeneración y formación del complejo dentinopulpar, formación de tejido periodontal, formación de biorraíces, e incluso se ha llegado a investigar la formación de un órgano dentario en su totalidad (66).

4.4.4 SC estudiadas de otras especies para su aplicación en humanos.

Se han obtenido SC de distintos animales como roedores, que en particular son animales frecuentemente utilizados para la obtención de estas células e incluso estudios demuestran que bajo condiciones adecuadas las células obtenidas de rata pueden actuar como células embrionarias (67). Se han estudiado *in vitro* SC derivadas de tejido adiposo, de médula ósea, cordón umbilical e incluso ligamento periodontal obtenidas de equino (68). Otro animal del que se han obtenido iPSC es el conejo (106), mismas que se han utilizado para su diferenciación a tejido cardiaco *in vitro* (69). Se ha realizado la obtención de SC de hurones (70), y de búfalos (107), pero debido a que la investigación busca semejanza entre el humano y el animal del que se obtendrán las células, los cerdos han tomado ventaja por la similitud en el tamaño de sus órganos con el de los humanos, también porque es un animal accesible, y al realizar ensayos *in vitro* y posteriormente ensayos clínicos, los cerdos son modelos grandes, esto ayuda para llevar a cabo los ensayos que se quieran realizar (71).

4.5 Biomateriales

Estos son materiales utilizados para sustituir o suplir temporalmente la matriz extracelular y la fisiología de tejidos previamente perdidos o faltantes dentro de un organismo vivo, estos deben ser compatibles biológicamente y se emplean también para la elaboración de andamios utilizados en la ingeniería tisular (94), por lo tanto, existen diversas variedades como metales, cerámicas, vidrios, acero y aleaciones metálicas, polímeros sintéticos, polímeros naturales entre otros (40).

Clasificación	Tipo de material
Materiales poliméricos	<ul style="list-style-type: none">• Policaprolactona (PCL)• Poli (ácido L-láctico) (PLA)• Poli (ácido DL láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)• Polímeros a base de polietilenglicol (PEG)• Poli (tereftalato de etileno) (PET)• Poli (fumarato de propileno) (PPF)• Alcohol polivinílico (PVA)

	<ul style="list-style-type: none"> • Poli (amino-amina) (PAA) • Poliuretanos (PU) • Poli (metacrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo-co-metacrilato de metilo) (HEMA / HEMA-MMA) • Poli (N-2- (hidroxipropil metacrilamida) (PHPMA) • Hidrogeles
Cerámicos	<ul style="list-style-type: none"> • fosfato tricálcico beta (β-TCP) • Hidroxiapatita • Cemento de fosfato cálcico • Cerámicas bioactivas • Óxido de aluminio • Biovidrios
Metales	<ul style="list-style-type: none"> • Aceros inoxidable • Aleaciones tales como Co-Cr, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Ni • Titanio

Tabla 2-Clasificación de materiales (40,41, 42,43).

4.5.1 Andamios.

Los andamios cumplen la función de una matriz extracelular (MEC) que al interactuar con las células permite el transporte de señales químicas celulares, da soporte estructural y regula la transferencia de las fuerzas mecánicas celulares, así mismo la estructura de los andamios modifica la respuesta celular (41). Sin embargo, los andamios deben tener características en su diseño tales como biocompatibilidad, conductividad para la fijación y proliferación celular, capacidad de combinación con los factores de crecimiento, favorecer la neovascularización, tener soporte mecánico, que su degradación sea paulatina y no tóxica, y deben tener un tamaño adecuado en su estructura que se ajuste a las necesidades del cultivo que se quiere realizar (42).

4.6 Policaprolactona (PCL).

Este es un material polimérico hidrofóbico, biodegradable, semicristalino, este tiene ventajas tales como su capacidad de moldearse, es muy resistente, elástico, su temperatura de fusión es baja (60°C), es biocompatible, bio absorbible y resulta de fácil fabricación lo que permite que se le puedan dar muchas presentaciones para sus diferentes usos (44). También se pueden modificar sus propiedades de adhesión y biocompatibilidad si se le añaden grupos químicos funcionales. La PCL es un poliéster del grupo de los poli- α -hidroxiácidos y lo conforma una sola cadena repetida de ϵ – *caprolactona* (97), está aprobado por la FDA por lo cual se ha utilizado en el uso de fármacos y productos médicos de curación (46), y a su vez al mezclarse con otros elementos se han realizado membranas poliméricas para regeneración ósea (47). Este material es bioactivamente bajo y esto le proporciona desventajas en la aplicación en regeneración tisular, sin embargo, actualmente se le incorporan fases cerámicas que fungen como osteoconductores/osteoinductores lo que hace que la PCL se convierta en uno de los materiales de elección hoy en día (96) aunque estudios han demostrado que la PCL por si sola es osteoinductor y osteoconductor (99).

4.6.1 Propiedades de la PCL

Principalmente la PCL presenta resistencia mecánica, resistencia a la compresión, resistencia elástica y resistencia a la tracción (95), este material tiene un número de peso molecular de 530 a 630 000 Mn/g mol-1, su densidad es de 1.071 a 1.200 ρ /g cm-3, su temperatura de transición del vidrio es de -65 a -60 Tg/°C, su temperatura de fusión es de 56 a 65Tm/°C, su temperatura de descomposición es de 350°C, su viscosidad inherente es de 100 a 130 η_{inh} / Cm3 g-1, su viscosidad intrínseca es de 0.9 η_{inh} / Cm3 g-1, su fuerza de tensión es de 4 a 785 σ /MPa y su capacidad de elongación es de 20–1000 ϵ /% (98).

4.6.2 Formas de fabricación de la PCL.

Las formas de fabricación de este material más conocidas son:

Modelado por deposición fundida (FDM)	Tipo de impresión 3D, es una técnica de manufactura que por medio de capas genera formas con el material fundido de elección (99, 100).
---------------------------------------	---

Electrohilado	Técnica en la cual se realizan fibras ultrafinas para obtener nanofibras (99, 101).
Lixiviación de porógenos	Esta técnica consiste en colocar un compuesto porógeno dentro de una solución polimérica, se mezcla y se seca para dar forma tridimensional, después disolverá el compuesto porógeno formando así la red 3D (99, 102).
Espumado con gas	En esta técnica, se forman discos comprimidos de polímero, estos se calientan por encima de su temperatura de transición vítrea y luego con CO ₂ a presión, disminuyéndola poco a poco para así formar los poros en la matriz, los cuales dependen del CO ₂ inyectado en la tasa de reducción de la presión del gas que se ha inyectado (99, 102).

Tabla 3 - Formas de fabricación de andamios de PCL

4.6.3 PCL mezclado con otros materiales para mejorar sus propiedades.

La PCL se ha mezclado con diferentes materiales para brindarle a este material mejores propiedades mecánicas, tasas de degradación controlables y bioactividad mejorada (Tabla 4).

NATURALES	PCL-Quitano (CS) (Hidrogel 3D)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por liofilización • Buena respuesta celular • Menos rugosidad en la superficie del andamio • Menos resistencia a la tracción • Resistencia a la compresión quedó igual
	CS + Nanofibrilación al 5- 10% = PCL electrohilable.	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricada por Electrospinning • Mayor humectabilidad • Mayor resistencia a la tracción • Mayor proliferación y adhesión celular
	Seda	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por liofilización • Buena adhesión • Buen crecimiento y proliferación celular • Gran biodegradabilidad y biocompatibilidad

		<ul style="list-style-type: none"> • Si cambia el contenido de seda los resultados no son los mismos.
	Seda de araña + Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado con Electrospinning • Alta porosidad • Buena citocompatibilidad.
	Colágeno	<ul style="list-style-type: none"> • Electrospinning • Aumento lineal de la densidad de fibroblastos dérmicos humanos.
	Alginato	<ul style="list-style-type: none"> • Adhesión celular enriquecida • Angiogénesis
SINTÉTICOS	PLLA y MWCNT	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por fase de separación • La cinética de degradación se puede controlar variando el contenido de MWCNT
	PLA / HA	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por Electrospinning • Mayor bioactividad • Reducción gradual de las propiedades mecánicas.
	PCL / PU	<ul style="list-style-type: none"> • Fibras de PCL hiladas por gravedad con fibras elásticas de poliuretano (PU), fundición por solvente • Formación de monocapa de células endoteliales funcionales estables • Control en la liberación de moléculas bioactivas.
	PLGA	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por Electrospinning • Mayor biocompatibilidad • Buena adhesión celular
	PLLA-PCL en membranas porosas	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por extracción por congelación • Mayor tiempo de degradación • Pérdida de propiedades mecánicas

	Poliestireno (PS)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricadas por recubrimiento por centrifugación • Películas delgadas de PCL-Poliestireno.
	PGA	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricada por fase de separación • Porosidad y tamaño de poros similares al hueso
	PLA	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricada por autoaglomeración de nanofibras inducida térmicamente o por Electrohilado • Mejores propiedades mecánicas • Bioactividad <i>in vitro</i> • Mejor viabilidad • Diferenciación osteogénica
CERÁMICOS	Forsterita (Mg ₂ SiO ₄)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricada por fundición por disolventes y lixiviación de partículas • Mejores propiedades mecánicas • Mejor bioactividad • Mejor biodegradación • No es citotóxico
	Alginato de Ca	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por fase de separación • Poros homogéneos • Porosidad similar a la ósea
	Óxido de aluminio PCL (AL ₂ O ₃)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por Electrospinning • Mejores propiedades mecánicas
	Fosfato de magnesio (MP-PCL)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por lixiviación de partículas • Mejoró el tiempo de degradación
	Fosfato de calcio	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por espuma de gas • <i>In vitro</i> hubo mejor adhesión, crecimiento y proliferación celular

Nanohidroxiapatita para formar PCL / nHA	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por lixiviación • Gran compatibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Microesferas de vidrio bioactivo y fibras de vidrio de vidrio de fosfato de calcio (50P 2 O 5 + 50CaO)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por fundición con disolvente • Se mostró un desempeño mejorado
Fumarato de polidiisopropilo	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricado por fundición de disolventes • Mejoras en sus propiedades físicas, mecánicas y osteoinductivas.

Tabla 4. Materiales que se han mezclado con PCL (Dwivedi, 2020).

4.7 PCL en regeneración ósea y estudios previos.

Este material se ha usado para cubrir heridas, para realizar elementos biocompatibles como implantes vasculares electrohilados (45). Estudios han demostrado que los andamios electrohilados de PLGA / PCL modificados mediante iones de plata son una matriz funcional que presenta propiedades biocompatibles, osteogénicas y antibacterianas indicativas de su potencial terapéutico para la regeneración ósea craneofacial (103). Otras investigaciones demostraron en estudios *in vitro*, que células troncales de tejido adiposo sembradas en nano andamios de PCL/ALG presentaron capacidad de diferenciación osteogénica y también una respuesta favorable para su mineralización (104). La PCL también se ha conjugado con proteína morfogenética ósea, lo cual también produce una diferenciación osteogénica rápida de células adiposas, por lo cual estos andamios pueden ser utilizados para la regeneración ósea (105).

4.8 Inducción de SCAPs a linaje osteogénico.

Se han realizado estudios a las SCAP donde se ha visto que estas expresan marcadores CD146, CD105, CD73 y CD90, pero no expresan marcadores CD34, CD45 y CD14 SCAP y tienen la capacidad de formar tejidos calcificados *de novo* en portadores de hidroxiapatita / fosfato tricálcico (72). Así mismo, estudios han indicado que las SCAPs humanas tratadas

con biomateriales pueden diferenciarse en osteoblastos u odontoblastos, y a su vez estos pueden formar tejidos similares a huesos o dentina en condiciones *in vitro* adecuadas (73). También se han realizado estudios *in vivo* donde se demuestra que la presencia de proteínas específicas es fundamental en la diferenciación odonto-osteogénica y mineralización de las SCAPs (74).

4.9 Ingeniería tisular ósea (ITO).

Los injertos óseos fabricados con ingeniería tisular se posicionan como opciones muy favorables por las desventajas que aún presentan los injertos autólogos: biodisponibilidad limitada, escasa osteoinducción de los xenoinjertos, posible rechazo de estos últimos (75), e incluso la falta de las características principales de los injertos, las cuales son: osteoconducción, osteoinducción, osteogénesis y osteointegración (76).

4.9.1 Células para la ITO.

Las células para ser utilizadas deben elegirse con mucho cuidado ya que van a interactuar con el andamio y van a segregar una matriz extracelular (MEC), cuyas características beneficiarán o afectarán la futura regeneración ósea. De esta manera, las MSC son una gran opción por sus características mencionadas anteriormente (39).

4.9.2 Andamios para la ITO.

Son matrices tridimensionales en donde las células van a realizar su desarrollo y diferenciación hasta conseguir el tejido deseado. Deben tener las siguientes características: bioabsorbilidad, biocompatibilidad, biomimesis, biodegradabilidad, bioactividad, microarquitectura, porosidad, propiedades de superficie, osteoinductividad y propiedades mecánicas (77). Así mismo, un andamio dirigido al tratamiento de defectos óseos debe tener características como: dar soporte mecánico que proteja el área del defecto y la periferia, prevenir la fibrosis, ser osteoconductor, ayudar a la neovascularización y permitir el crecimiento normal de la zona donde se coloque el injerto, en dado caso que lo requiera (42).

4.9.3 Medios inductores.

Son proteínas y moléculas orgánicas que promueven la regeneración y proliferación celular por medio de estímulos de activación sobre las mismas para que estas se dividan, migren, se puedan diferenciar y posteriormente se mantengan o sufran apoptosis (93) y también pueden activar los mecanismos de reparación de los tejidos *in vivo* (78). Ver Tabla 5.

Proteínas	Factores	Agentes de uso clínico
<ul style="list-style-type: none">• Proteínas Notch• Proteína 2 unida al factor de crecimiento de insulina• Proteína morfogénica ósea-4• Proteínas de la vía Hedgehog• Citosinas• Enzimas	<ul style="list-style-type: none">• Factor de las SC• Factor de crecimiento 1 de los fibroblastos por la trombospondina• Prostaglandina E2	<ul style="list-style-type: none">• Factor estimulante de colonias de granulocitos• Factor de las células stem• Antagonista del receptor 4 de la quimiocina CXCR4

Tabla 5 - Proteínas inductoras o moléculas bioactivas (78)

4.9.4 Proteínas para medios de inducción.

Las proteínas ayudan estimulando el crecimiento, diferenciación y maduración de las células y unidas en los medios inductores pueden iniciar el proceso de formación de tejidos especializados, los factores de crecimiento más utilizados para la ITO son las proteínas morfogenéticas óseas (BMP por sus siglas en inglés) (39), el factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF por sus siglas en inglés) y ácido (aFGF por sus siglas en inglés) (79).

4.9.5 Constructo tisular.

Se le denomina de esta manera al producto o sistema compuesto por el andamio, las células sembradas y medios inductores que una vez dada la diferenciación de las células troncales se

obtiene una estructura capaz de promover la regeneración tisular de un órgano o tejido que no se encuentre en estado de salud o que falte en el organismo (108).

5. Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular.

La citotoxicidad celular es la alteración que sufren las células en su fisiología básica que le puede presentar la muerte. Por esta razón se han adaptado pruebas y ensayos para estudiar las reacciones tóxicas que lleguen a desarrollar los andamios sobre las células (80). Estos ensayos son utilizados para conocer la biocompatibilidad de los biomateriales con las células. Estos nos van a permitir observar si existe crecimiento celular o inhibición del mismo y/o registrar si existe daño o muerte celular causada por el biomaterial (81).

A continuación, se describen algunos de los ensayos de citotoxicidad y viabilidad más utilizados:

5.1 Live/Dead kit: El Kit de viabilidad de LIVE / DEAD es utilizado para reconocer de manera sencilla y rápida las células muertas de las vivas, realizando tinción en las células de manera distinta, ya que el activo yoduro de propidio penetrará en las células dañadas, y dará como resultado dos tinciones, una mostrará las membranas celulares intactas o vivas, mientras que la otra mostrará a las células con membranas dañadas (82).

5.2 MTT Kit: El kit determina el número celular por medio de lecturas de absorbancia con microplacas. Este puede medir las tasas de crecimiento celular por medio de indicadores fluorescentes determinación del número de células usando indicadores fluorescentes o cromogénicos, convierte el MTT soluble (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) a un formazan insoluble (83).

5.3 Ensayo Alamar Blue: Este ensayo va a analizar a la célula viva en un ambiente químico reductor, utilizando la resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-io-3-ona) como principio activo, el cual permite la constante monitorización de las células cultivadas. La resazurina es tinción azul que al sufrir reducción se convierte en resorufina (tinción rosa). Este cambio de color se da por la captación de electrones celulares, reductasas mitocondriales y enzimas. La lectura de la viabilidad se dará por el cambio de color visible por lecturas colorimétricas/fluorimétricas (84).

6. Planteamiento y definición del problema.

El labio y paladar fisurado es la principal anomalía craneofacial que afecta a Latinoamérica, y tiene una incidencia de aproximadamente 1.2 a 1.6 por 1000 nacimientos vivos. Esta patología afecta varias áreas de la vida del individuo que la padece (86), por lo cual debe ser tratada con el fin de recuperar en el paciente las funciones bucofaciales que se encuentran mermadas por esta malformación (87). Esta patología es tratada mediante múltiples cirugías que implican el uso de injertos de hueso para colocarlo en la fisura (88), sin embargo, siguen teniendo desventajas (89) y requieren de tratamientos complementarios multidisciplinarios (87). Se ha estudiado el potencial de las SC de diferentes tejidos para el tratamiento de este padecimiento, sin embargo, se siguen haciendo estudios para mejorar la calidad del constructo formado e incluso conocer en que andamios se da un mejor resultado en la diferenciación (75). En ese sentido, la presente investigación tiene como fin utilizar andamios hechos en PCL por medio de impresión 3D sembrados con SCAPs de cerdos Vietnamita, para elaborar y evaluar constructos tisulares óseos y de esta manera aportar alternativas a la escases de donaciones de tejidos, buscando una solución para futuros ensayos *in vivo* y así poder determinar su factibilidad en aplicaciones para tratamientos en humanos (34).

7. Objetivos.

7.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades osteogénicas de constructos de PCL 3D con SCAPs obtenidas de cerdos Vietnamita para su probable aplicación en ingeniería tisular ósea.

Objetivos específicos

- 7.1.1** Evaluar la citotoxicidad del andamio de PCL 3D sobre las SCAPs de cerdo vietnamita por medio de ensayos de vida y muerte y MTT.
- 7.1.2** Evaluar la diferenciación a linaje osteogénico de las SCAPs obtenidas de papila apical de cerdo Vietnamita en los andamios de PCL 3D, y comprobar con las tinciones Von Kossa y rojo de alizarina la presencia de nódulos cálcicos.

8. Hipótesis de investigación.

El andamio permitirá la viabilidad y proliferación de las SCAPs de cerdo vietnamita y permitirá su adecuada diferenciación a linaje osteogénico, con lo cual puede ser propuesto para uso en la ingeniería tisular ósea.

9. Materiales y métodos.

Se utilizaron SCAPs de un cerdo vietnamita macho de 1 año. Los procedimientos para los ensayos *in vitro* se realizaron dentro de una cabina de bioseguridad tipo II con flujo laminar vertical. (Telstar Bio II Advance).

9.1 Conteo y viabilidad celular.

Para realizar los ensayos correspondientes se despegaron las células de las cajas de cultivo y se contabilizaron. Para ello, se retiró el medio de cultivo que contenía la caja y se lavó con PBS, se adicionaron 2 ml de TrypLE Express (GIBCO), se incubó durante 5 minutos a 37°, posteriormente se agregaron 2 ml de DMEM bajo en glucosa (Biowest) suplementado al 10% con SFB y 1% de antibiótico y antimicótico con el fin de inactivar el efecto disociativo del Tryple express. Se colocó en un tubo de 15 ml (TPP) y se centrifugó durante 10 minutos a 600 G (SIGMA 2-16 KL). El sobrenadante se retiró y se le colocó 1 ml de medio de cultivo fresco para resuspender el botón celular.

Para el conteo celular se tomaron 90 µl de la suspensión celular y se colocó en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, se agregaron 10 µl de Azul tripano, se resuspendió y se colocaron 10 µl de la solución en una cámara de Neubauer. Se observó al microscopio para realizar el conteo celular, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\# \text{ de células vivas (10,000)}(2)}{4}$$

Se sembraron 5,000 células por pozo en una placa de 96 pozos para realizar los ensayos de citotoxicidad y de diferenciación osteogénica.

9.2 Ensayo de citotoxicidad celular

Se realizó el procedimiento anteriormente descrito para sembrar 5000 células por pozo.

El andamio (PCL 3D) se cortó sobre una caja Petri en cubos de aproximadamente 6x6x6 mm (Ilustración 4), y se colocaron en pozos en una placa de cultivo de 96 pozos (TPP), uno por

pozo. El ensayo se realizó por quintuplicado. Los andamios fueron realizados por el Dr. Luis Rodríguez en España. La 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 ± 1000 , 100% puro, Haarlem, Países Bajos). Para la fabricación de los andamios se utilizó el Hephestos 2 (Prusa i3 - BQ, Madrid, España) con cama calefactable. La extrusora fue un engranaje de accionamiento doble, con una boquilla de $400 \mu\text{m}$.

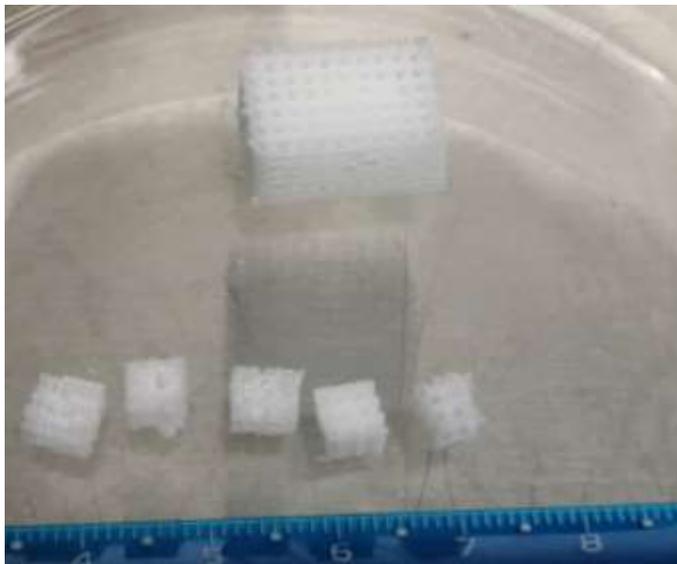


Ilustración 4 - Andamios de PCL 3D

Se sembraron 5000 células sobre cada andamio y se sembró el mismo volumen en pozos sin andamio como grupo control. Se incubó por 20 minutos para permitir la adherencia celular a los andamios y a los pozos. Se colocaron $200 \mu\text{l}$ de medio de cultivo en cada pozo y se mantuvo bajo condiciones de cultivo estándar. El ensayo se diseñó para analizarlo a los 3, 7 y 10 días de cultivo.

El ensayo de citotoxicidad celular se realizó con el *Cell Proliferation Kit 1* (MTT Roche), de acuerdo con las indicaciones del fabricante, siempre protegido de la luz, dejando en cada pozo $100 \mu\text{l}$ de medio de cultivo y agregando $10 \mu\text{l}$ del reactivo de MTT (al 10% del volumen de medio de cultivo contenido en el pozo). Se incubó a 37°C durante 4 horas, para después adicionar en cada pozo $100 \mu\text{l}$ de solubilizante isopropanol y se dejó actuar durante toda la noche. Se realizaron lecturas a 570 y 630 nm en el espectrofotómetro y posteriormente se realizó el análisis de los datos obtenidos.

9.3. Análisis estadístico de resultados de prueba MTT.

Se utilizó el programa estadístico Stata v. 14 (Stata Corp, College Station, TX, USA). Primero, se realizó un análisis descriptivo del ensayo MTT para la lectura de cada pozo a los 3, 7 y 10 días, tanto del andamio como del control. Posteriormente, se realizó un análisis bivariado para comparar el resultado de los pozos entre andamio y control. Se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

9.4 Inducción de las SCAPs a linaje osteogénico.

Se despegaron las células con el procedimiento descrito en el punto 9.1.

En una placa de 24 pocillos, el sembrado se realizó en grupos de tres. El primer grupo fue el control, en el cual solo se sembraron 5000 células por pozo con medio DMEM completo bajo en glucosa, el segundo fueron 5000 células sobre el pozo utilizando medio inductor osteogénico (STEM CELL) y el andamio de PCL 3D, el tercer grupo fue de 5000 células sobre el andamio PCL 3D con medio DMEM completo bajo en glucosa.

Cada tercer día se realizó el cambio de medio, manteniendo los cultivos durante 28 días.

Para corroborar la adquisición del fenotipo osteogénico se realizaron tinciones con Von Kossa y Rojo de Alizarina.

9.5 Ensayos histológicos con las tinciones Von Kossa y Rojo de Alizarina

Tanto los pozos experimentales, como los pozos control se lavaron con PBS dos veces, cuidando que no permanecieran secos durante más de 1 minuto, y se fijaron con paraformaldehído al 3.7%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se lavó con agua destilada tres veces y se le colocó a seis de los pozos (dos por grupo) la tinción Von Kossa Stain Kit (NovaUltra) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron 200 μ l por cada pozo de nitrato de plata, se incubó con luz UV durante 60 minutos y posteriormente se lavó con agua destilada. Seguido de ello, se colocaron 200 μ l de solución de toisulfato de sodio en cada pozo, y se dejó actuar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo se lavó con agua destilada, se colocaron 200 μ l de solución nuclear roja rápida en cada pozo, se dejó actuar durante 5 minutos, se lavó con agua destilada y finalmente se observaron los pozos al microscopio óptico (LEICA).

Para el Rojo de Alizarina (Sigma-Aldrich) se colocó la tinción en los siguientes seis pozos (dos por grupo) y se dejó actuar durante una hora, se retiró la tinción, posteriormente se lavó con agua destilada hasta que el agua saliera limpia y se observaron bajo el microscopio óptico.

10. Resultados.

10.1 Citotoxicidad celular por medio de ensayo MTT.

En el ensayo MTT, el color amarillo del reactivo se torna de color azul (por las sales de formazan) gracias a la actividad mitocondrial de las MSC, el número de células vivas es proporcional a la coloración por el formazan que se haya producido a los diferentes días de incubación.

Para este proyecto se realizó el ensayo MTT con el fin de evaluar la citotoxicidad del andamio de PCL 3D sobre las SCAPs para evaluarlas a los 3,7 y 10 días de cultivo, comparando los pozos que contenían a las SCAPs en el andamio de PCL y los pozos controles que solo contenían a las células. Este ensayo se realizó por quintuplicado, para mayor precisión en los resultados, como se observa en la siguiente figura.

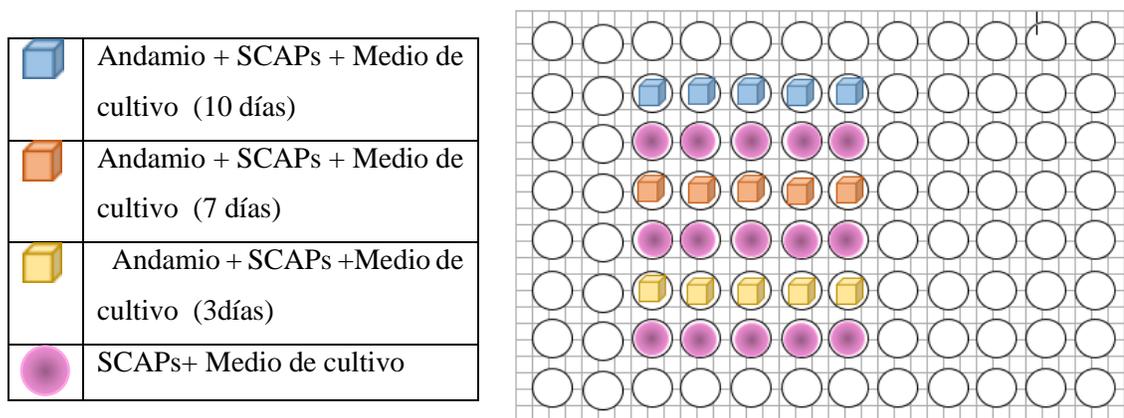


Ilustración 5- Figura de la placa donde se realizó la prueba MTT

Se realizó el procedimiento antes descrito y se obtuvieron los siguientes resultados después de realizar la lectura con el espectrofotómetro:

Días de sembrado	Contenido del pozo	Resultado de lectura de cada pozo					Promedio	Desviación estándar
3 días	Andamio	1.098	1.228	0.765	0.89	1.044	1.005	0.18
	Control	1.208	1.989	1.299	1.747	1.438	1.5362	1.21
7 días	Andamio	1.306	2.228	1.497	0.907	1.579	1.5034	0.48
	Control	2.413	2.372	2.16	1.784	1.745	2.0948	0.32
10 días	Andamio	2.174	2.064	1.304	1.452	1.9	1.7788	0.38
	Control	2.419	2.321	2.091	2.026	1.719	2.1152	0.27

Tabla 7 - Resultados del espectrofotómetro

Se graficaron los resultados (Figura 6)

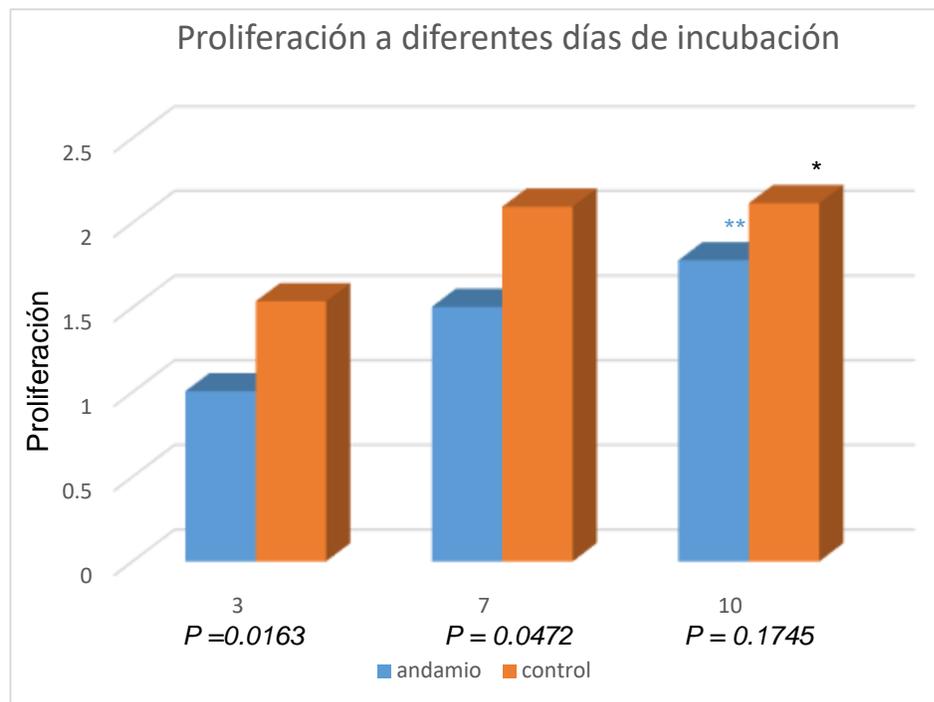


Ilustración 6 - Grafico comparativo del ensayo MTT

10.2. Análisis estadístico de prueba MTT.

Los datos se midieron en base a porcentajes, siendo los resultados de los controles de cada día de cultivo tomado como 100% y así poder asignar un porcentaje a los resultados de los cultivos con el andamio, y quedo de la siguiente manera:

DÍA DE CULTIVO	% DE PROLIFERACIÓN CONFORME AL CONTROL	VALORES DE <i>P</i>
3	65%	$P = 0.0163$
7	72%	$P = 0.0472$
10	84%	$P = 0.1745$

*De la prueba U de Mann Whitney

Como se puede observar en los resultados en los días de cultivo 3 y 7 se observó una diferencia estadística significativa, sin embargo, al día 10 de cultivo no existe diferencia ya que en porcentaje el resultado se acerca mucho al 100% que representa el control, esto lo podemos interpretar como que el andamio y el control pueden llegar a ser iguales.

Por lo que se puede decir que el andamio si permite de manera favorable la proliferación de las células.

10.3 Adquisición del linaje osteogénico mediante la Tinción de Von Kossa.

Es una técnica cualitativa para teñir los depósitos de fosfato inorgánico del hueso, al hacer que las sales de nitrato de plata reaccionen con los iones presentes en los depósitos cálcicos. Se colocó la tinción en 6 pozos donde se sembraron tres grupos, el primero con SCAPs y medio DMEM, el segundo con SCAPs en el andamio PCL 3D con medio inductor osteogénico y el tercero SCAPs en el andamio PCL 3D con medio DMEM. A los 28 días de cultivo se podían observar como se muestra en la ilustración 7.

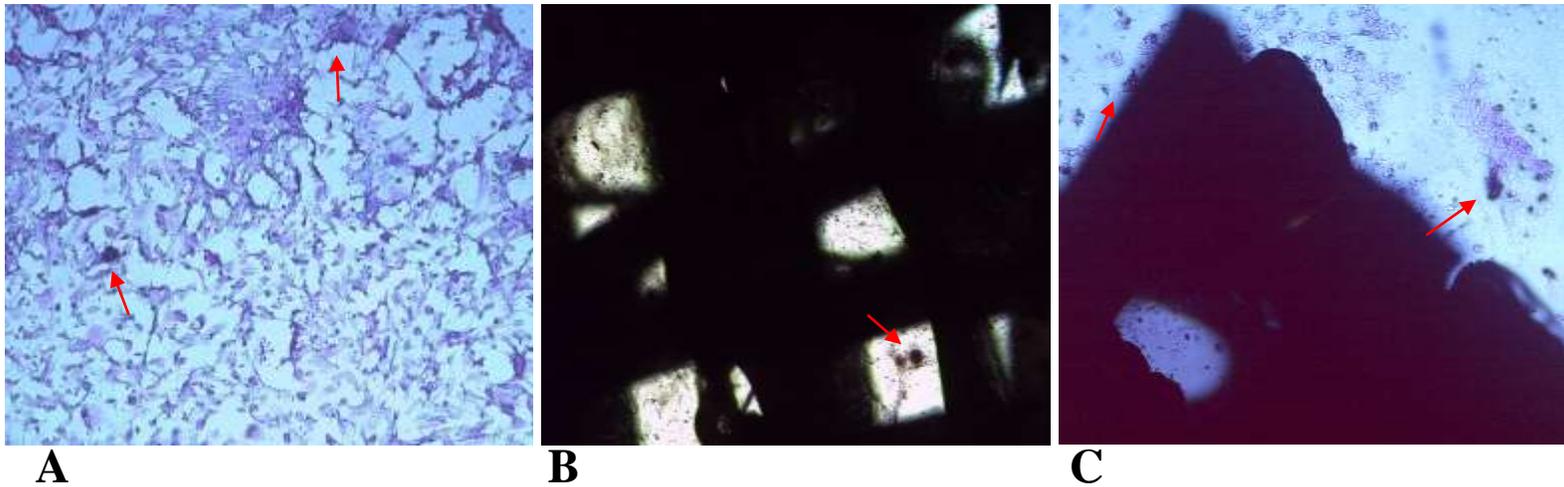


Ilustración 7- Vista de la tinción Von Kossa a 28 días de cultivo

Ilustración 7A. En los pozos donde solo se encontraban las células en el pozo en medio DMEM no se observó presencia significativa de tinciones cálcicas, solo pequeños cúmulos aislados al fondo del pozo.

Ilustración 7B. La tinción sobre las células en el andamio con el medio de diferenciación fue significativa, se observaron nódulos cálcicos en el fondo del pozo cercanos al andamio y en ciertas zonas se observó una concentración mayor de los mismos.

Ilustración 7C. En los pozos donde se encontraban las células con el andamio en medio DMEM se observó presencia de nódulos cálcicos cercanos al andamio.

10.4 Adquisición del linaje osteogénico mediante tinción con Rojo de alizarina.

El rojo de Alizarina se utiliza para reforzar e identificar si había presencia de calcificaciones en los cultivos realizados. En el grupo control se registró una tinción media y concentrada al día 28 en ciertas zonas del pozo como se muestra en la ilustración 8A.

En el grupo que tenía las células en el andamio PCL 3D con medio de cultivo DMEM, se observó una tinción constante en forma de perlas cerca del andamio con una zona de mineralización importante en un costado del andamio como se observa en la ilustración 8B.

En los pozos donde se encontraban las células con el medio de diferenciación en el andamio de PCL 3D, se observaron zonas mineralizadas aisladas tanto cerca del andamio como lejos del mismo. No se observó una diferencia significativa en el aumento de la calcificación en

comparación al grupo control y al grupo que no contaba con el medio de diferenciación, como se observa en la ilustración 8C.



A **B** **C**
Ilustración 8 - Tinción rojo de alizarina a 28 días de cultivo

Ilustración 8A. Se observan depósitos cálcicos en un pozo de control al día 28 de cultivo. Las deposiciones de matriz calcificada se visualizaron con tinción rojo de alizarina, estas zonas se observan de color marrón rojizo. Se observaron con microscopio invertido.

Ilustración 8B. Se observan nódulos cálcicos pequeños de color marrón rojizo en la zona cercana al andamio con microscopio invertido al día 28 de cultivo.

Ilustración 8C. Se observan zonas calcificadas cerca del andamio, pero también lejos de este. Se pueden observar nódulos cálcicos, esto al día 28 de cultivo.

11. Discusión.

Para tratar los defectos óseos, la ingeniería de tejidos ha tenido un gran papel por las ventajas que ha logrado representar ante las demás terapias existentes actualmente, esta ciencia funciona gracias a sus componentes que en conjunto ayudan a la formación de tejidos sustitutos para tratar distintas patologías, estos componentes son las células, los factores de crecimiento y el andamio. Cada componente debe tener características específicas que en conjunto brinden las condiciones adecuadas para una óptima proliferación celular.

Hasta ahora se han realizado múltiples estudios con diferentes andamios para encontrar el más adecuado para la ingeniería tisular ósea, y aunque por ahora no se ha encontrado un andamio totalmente efectivo conocemos que éste debe contar con características específicas,

como que debe ser biocompatible, debe proporcionar conductividad para la fijación y proliferación celular, tener capacidad de combinarse con los factores de crecimiento, favorecer la neo vascularización, tener soporte mecánico, que su degradación sea paulatina y no tóxica, y tener un tamaño adecuado en su estructura que se ajuste a las necesidades del cultivo que se quiere realizar (42).

Los andamios pueden ser fabricados de distintas maneras, específicamente los andamios que en su estructura son porosos se pueden fabricar por medio de técnicas tales como: espuma de gas, separación de fases, congelar casting, Electrospinning, fabricación aditiva, sol-gel, lixiviación de partículas y liofilización (111). Estos son hechos de diferentes materiales, aunque por ahora ninguno ha demostrado cumplir con todos los requisitos que debería tener un andamio para ingeniería tisular ósea íntegra, tal como se muestra en la tabla número 7, donde se resume las ventajas y desventajas más evidentes de los materiales:

MATERIAL DEL ANDAMIO	VENTAJA	DESVENTAJA
Polímeros	Son biodegradables, son osteoconductores.	No tienen resistencia mecánica.
Cerámicas	Buena resistencia mecánica, buenas osteoinductores.	Tendencia a la fractura.
Metales	Gran resistencia mecánica.	No son biodegradables.
Materiales compuestos	Mejoran la resistencia mecánica, la biocompatibilidad	Se tienen que agregar factores de crecimiento adecuados, debe existir una porosidad adecuada

Tabla 8 - Ventajas y desventajas de los materiales para andamios (109)

La Policaprolactona es un material sintético, semicristalino e hidrófobo, tiene una gran resistencia mecánica, punto de fusión bajo y es biodegradable (110), haciendo que la PCL sea un material de gran interés ante otros materiales. Este material se ha utilizado en insumos médicos como suturas, apósitos para heridas, anticonceptivos, y también como andamio en la ingeniería tisular (112).

En esta tesis, se realiza una propuesta para utilizar un andamio de PCL fabricado en 3D y la siembra de SCAPs de cerdo vietnamita y factores de crecimiento para sentar las bases de futuros ensayos preclínicos para restituir el hueso en pacientes con paladar fisurado, ya que en Latinoamérica encontramos un déficit de atención para este defecto craneofacial.

El andamio de PCL 3D, demuestra ventajas notables sobre otros andamios ya que muestra mejoras en la bioactividad, se promueve la unión, proliferación y diferenciación celular al andamio, haciéndolo adecuado para su aplicación en la ingeniería de tejidos óseos. Así mismo su estructura 3D permite el crecimiento tisular, la difusión de nutrientes, gases, biomoléculas, así como la eliminación de desechos (113).

Las células troncales se han utilizado en diferentes campos médicos para su uso en diferentes terapias, sin embargo, las células troncales bucales representan una nueva fuente viable de obtención. En la ingeniería de tejidos las células bucales más ocupadas son las células troncales de la pulpa dental, ya que tienen ventajas tales como diferenciación multilínea, estas pueden formar un complejo similar a la dentina, a los odontoblastos y también al hueso (114), aunque una opción viable ante la utilización de las SC de la pulpa dental es el uso de las células troncales de la papila apical, ya que han sido comparadas con las DPSC y aun así las SCAPS han demostrado tener una gran capacidad de regeneración tisular y mayor supervivencia, así mismo estudios demuestran que si se expone a los inductores adecuados estas son una fuente excelente en la regeneración de tejidos (115).

Todo esto sumado a que estas células se pueden obtener de los premolares ya que en ocasiones en el ámbito clínico los pacientes con LPH requieren la extracción de estos dientes por la falta de espacio en las arcadas dentales, del mismo modo estas células se pueden obtener de terceros molares que regularmente son planeados para extracción después de una planificación multidisciplinaria (116), en ese sentido el tejido de la papila apical puede procesarse para obtener células troncales con potencialidad de diferenciarse a linaje osteogénico y para su probable aplicación de defectos óseos de los mismos pacientes.

12. Conclusiones.

La ingeniería tisular ha abierto varios campos de investigación en la odontología, por lo que es necesario adentrarnos más en cómo ayudar a las diferentes patologías que están dentro de nuestra profesión, el LPH es una de estas, por lo que con esta investigación sumada a las ya existentes nos podemos acercar poco a poco a que la regeneración tisular sea un éxito para estos pacientes, superando las desventajas que los han afectado por años.

En este estudio encontramos que, de acuerdo a la prueba estadística el andamio permitió la viabilidad y proliferación de las SCAPS, con más de un 80% de proliferación celular sobre el andamio al día 10 de cultivo, por lo tanto, se demostró que no es citotóxico.

También se demostró que hubo diferenciación osteogénica, después de las tinciones, siendo una alternativa de tratamiento adecuada que debe seguir siendo estudiada, pero que demostró resultados alentadores para nuestra investigación. Por lo tanto, se logró obtener constructos tisulares con propiedades osteogénicas.

13. Bibliografía.

1. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011 Mar;12(3):167-78
2. Rodríguez, M. B., & GONZÁLEZ, L. G. V. (2012). Labio y paladar hendido: tendencias actuales en el manejo exitoso. *Archivos de Medicina (Col)*, 12(1), 107-119.
3. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2016 Jan;51(1):8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022. Epub 2015 Nov 10.
4. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, Xu GT, Liang A, Liu S. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2015 Mar; 33(3):627-38.
5. Kang, J., Fan, W., Deng, Q., He, H., & Huang, F. (2019). Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy. *BioMed research international*, 2019.
6. Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M. D., Meseguer, L., Meseguer-Henarejos, A. B., Marín, N., Martínez, S., & Moraleda, J. M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 17(6), e1062–e1067.
7. Gaitán, A. J. C., Velosa, T. C., Rodríguez, A. E. D., Rodríguez, A. A., & Niño, J. C. M. (2017). Células troncales mesenquimales de la papila apical y su papel prometedor en la biología radicular. *Revista Mexicana de Estomatología*, 3(2), 61-74.
8. Huang, G. T., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., & Shi, S. (2008). The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of endodontics*, 34(6), 645–651.
9. Amirikia M, Ali Jorsaraei SG, Ali Shariatzadeh SM, Mehranjani MS. Differentiation of stem cells from the apical papilla into osteoblasts by the elastic modulus of porous silk fibroin scaffolds. *Biologicals.* 2019 Jan;57:1-8.
10. Fujii, Y., Kawase-Koga, Y., Hojo, H., Yano, F., Sato, M., Chung, U. I. & Chikazu, D. (2018). Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-12.

11. Soto Góngora, S., & Taxis González, M. G. (2005). Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Revista Cubana de estomatología*, 42(1), 0-0.
12. Tavares, V. A. C. D. B. (2011). *Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos* (Doctoral dissertation, FCT-UNL).
13. Pachajoa, H., & Moreno, F. (2015). Células de la cresta neural: Evolución, bases embrionarias y desarrollo cráneo-facial. Revisión sistemática de la literatura. *Rev. estomat. salud*, 45-56.
14. Rohen, J. y Lutjen-Drecoll, E. Desarrollo de la cabeza. *Embriología funcional: Una perspectiva desde la biología del desarrollo*. (pp. 111 - 146). Madrid España: Panamericana
15. Arteaga, S. y Pelaez, M. Desarrollo de cara y cuello: *Embriología humana y biología del desarrollo* (pp. 248-275) México: Panamericana.
16. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Embriología Clínica*. 9ª ed. Barcelona, España: Ed. Elsevier Saunders. 2013. p. 1-501. -Sadler TW. Langman.
17. Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2010). *PRINCIPIOS DE ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA* (11a. ed., 4a. reimp.). BUENOS AIRES: MEDICA PANAMERICANA.
18. Moore K.L. *Anatomía Humana con Orientación Clínica* Editorial Médica Panamericana. Barcelona (1993)
19. Hib, J. (1994). *Embriología médica*. Interamericana. McGraw-Hill.
20. Serra Renom, I., & Serra Renom, J. M. (1983). Estudio embriológico facial: concepto actual. *Acta Pediátrica Española*, 1983, vol. 41, num. 5, p. 166-171
21. Sorolla, P. J. P. (2010). Anomalías craneofaciales. *Revista Médica Clínica las Condes*, 21(1), 5-15.
22. Webster, S. y Wreede, R. Desarrollo de los aparatos y sistemas: *Embriología: Lo esencial de un vistazo*. (pp. 85-93). Madrid España: Panamericana
23. García, C., O'Brien, A., Villanueva, E., & Parra, R. (2007). Anomalías congénitas del aparato branquial: estudio de imágenes. *Revista chilena de radiología*, 13(3), 147-153.
24. Ávila, F. F., & Bejarano, O. R. *ANOMALÍAS DEL APARATO FARÍNGEO*.
25. Langman, Sadler- *Embriología Médica*, 11º Edición, Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
26. Eslava-Schmalbach, J. H. (Ed.). (2014). *Semiología quirúrgica*. Universidad Nacional de Colombia. (Pp. 281)

27. Otero, T., Gallo, J., Atienza, L., & Martínez, V. (2003). Malformaciones craneofaciales y su tratamiento. *Revista Nascere e Crescere*, (12 (4)), S293-S297.
28. Carlson BM. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 4ª ed. Barcelona, España: Ed. Elsevier Mosby. 2009. p. 3-550.
29. Palafox, D., Ogando-Rivas, E., Herrera-Rodríguez, D., & Queipo, G. (2012). Malformaciones craneofaciales. De las bases moleculares al tratamiento quirúrgico. *Rev Med Hosp Gen Méx*, 75(7), 50-9. 24
30. Pérez, I. S. T., Monterroza, J. F. S., & Vergara, A. C. Z. (2016). Craneosinostosis: Revisión de literatura. *Universidad Y Salud*, 18(1), 182-189.
31. García Zúñiga, M. D. M., Monge Padilla, M. L., Picado Monge, G., Porras Calvo, K., Rodríguez Villalobos, G., Rojas Mora, Y., & Rodríguez Palomo, D. (2012). Anencefalia y labio-paladar hendido. *Medicina Legal de Costa Rica*, 29(2), 121-137.
32. Serrano, C. A., Ruiz, J. M., Quiceno, L. F., & Rodríguez, M. J. (2009). Labio y/o paladar hendido: una revisión. *Ustasalud*, 8(1), 44-52.
33. Hosseini, H. R., Kaklamanos, E. G., & Athanasiou, A. E. (2017). Treatment outcomes of pre-surgical infant orthopedics in patients with non-syndromic cleft lip and/or palate: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS one*, 12(7), e0181768.
34. Shi, B., & Losee, J. E. (2015). The impact of cleft lip and palate repair on maxillofacial growth. *International journal of oral science*, 7(1), 14–17.
35. Dao, AM y Goudy, SL (2016). Reparación del paladar hendido, gingivoperiosteoplastia e injerto óseo alveolar. *Clínicas de cirugía plástica facial*, 24 (4), 467-476.
36. Scalzone, A., Flores-Mir, C., Carozza, D., d'Apuzzo, F., Grassia, V., & Perillo, L. (2019). Secondary alveolar bone grafting using autologous versus alloplastic material in the treatment of cleft lip and palate patients: systematic review and meta-analysis. *Progress in orthodontics*, 20(1), 6.
37. Martín-Del-Campo, M., Rosales-Ibañez, R., & Rojo, L. (2019). Biomaterials for Cleft Lip and Palate Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2176.
38. Ude, C. C., Miskon, A., Idrus, R., & Abu Bakar, M. B. (2018). Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine. *Military Medical Research*, 5(1), 7.

39. Barreto, J. F. A. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de estudios transdisciplinarios*, 1(2), 98-109.
40. Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)*, 101(1), 227-249.
41. Janoušková O. (2018). Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering. *Physiological research*, 67(Suppl 2), S335–S348.
42. Morales Navarro, D. (2014). Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Revista Cubana de Estomatología*, 51(3), 288-304.
43. de la Cierva, E. R. G. (2018). TRABAJO FIN DE GRADO “BIOMATERIALES CERÁMICOS Y POLIMÉRICOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA.” (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
44. Cordero-Umaña, B. A. (2018). Automatización del proceso de fabricación de microfilamentos de policaprolactona.
45. Atehortúa Jiménez, J. C. (2020). Efecto hemolítico, biocompatible y funcional de membrana electrohiladas de policaprolactona-colagénico celularizados con fibroblastos como posible uso para implantes vasculares (Bachelor's thesis, Escuela de Ingenierías).
46. HERRERA, L. A. C. (2017). Modificación superficial de andamios electrohilado de policaprolactona mediante plasma de aire para su uso potencial en ingeniería de tejidos (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
47. Villanueva Lumbreras, J. A. (2019). Fabricación y caracterización de membranas nanoestructuradas de policaprolactona, nanohidroxiapatita y *Humulus lupulus L*, con potencial aplicación en regeneración ósea (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
48. Jucht, D., Rujano, R., Romero, M., & Rondón, L. (2014). Utilización de células madre en el ámbito odontológico. Revisión de la literatura. *Acta Bioclínica*, 101-23.
49. Brizuela, C., Galleguillos, S., Carrión, F., Cabrera, C., Luz, P., & Inostroza, C. (2013). Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *International Journal of Morphology*, 31(2), 739-746.
50. Brizuela, C., Galleguillos, S., Carrión, F., Cabrera, C., Luz, P., & Inostroza, C. (2013). Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *International Journal of Morphology*, 31(2), 739-746.

51. Camacho Assef, J. A., Camacho Escalante, L., Gómez Mantilla, N., Camacho Assef, V., López Borroto, K., & García Garriga, H. (2017). Células madre. Generalidades (Parte I). *MediCiego*, 23(2), 71-85.
52. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
53. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.
54. Chaparro, O., & Beltrán, O. (2009). Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas. *Revista Med*, 17(2), 252-263.
55. González-Andrade, F. (2009). Células madre: definiciones y aproximación conceptual. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 34(1-2), 66-72
56. Yunta, E. R. (2003). El potencial terapéutico de las células madre. Eficacia del uso de las células madre embrionarias. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, 32(2), 162-164
57. Anzaldúa Arce, S. R., Cornejo Cortés, M. Á., Mosqueda, J., de Lourdes, M., Meraz Ríos, M. A., Ríos Mas, M. C., & Villaseñor Gaona, H. (2007). ¿Qué son las células troncales o células madre? *Veterinaria Mexico*.
58. Pimentel-Parra, G. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2017). Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), 28-33.
59. Orta, L. J. G., Rytzner, A. F., & de Nova García, J. (2011). Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. *Gaceta dental: Industria y profesiones*, (223), 118-129.
60. Potdar, P. D., & Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World journal of stem cells*, 7(5), 839.
61. Santiago Dager, E., LaO Salas, N., Urgellés Pérez, Y., Riesgo Cosme, Y., Pérez, A., & Aurora, N. (2014). Ventajas y usos de las células madre en estomatología. *MEDISAN*, 18(9), 1282-1292
62. Victor, A. K., & Reiter, L. T. (2017). Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Human molecular genetics*, 26(R2), R166-R171
63. Cea-Sanhueza, M., & Sánchez-Sanhueza, G. (2016). Células madre mesenquimales orales: estado del arte en Odontología. *Avances en Odontología*, 32(2), 97-105.

64. Iwasaki, K., Akazawa, K., Nagata, M., Komaki, M., Honda, I., Morioka, C..... & Kimura, T. (2019). The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 192.
65. Zhang, Q. Z., Nguyen, A. L., Yu, W. H., & Le, A. D. (2012). Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *Journal of dental research*, 91(11), 1011-1018.
66. Alajbeg, I. (2018). Isolation, characterization and differentiation potential of oral mucosa stem cells. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti*, (533=45), 61-69.
67. Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., ... & Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 135(7), 1287-1298.
68. Ranera Beltrán, B., Rodellar Penella, C., & Martín Burriel, I. Células madre mesenquimales equinas: Obtención y análisis de sus propiedades in vitro (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).
69. Phakdeedindan, P., Setthawong, P., Tiptanavattana, N., Rungarunlert, S., Ingrungruangleert, P., Israsena, N., Techakumphu, M., & Tharasanit, T. (2019). Rabbit induced pluripotent stem cells retain capability of in vitro cardiac differentiation. *Experimental animals*, 68(1), 35–47.
70. Gao, J., Petraki, S., Sun, X., Brooks, L. A., Lynch, T. J., Hsieh, C. L., Elteriefi, R., Lorenzana, Z., Punj, V., Engelhardt, J. F., Parekh, K. R., & Ryan, A. L. (2020). Derivation of induced pluripotent stem cells from ferret somatic cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 318(4), L671–L683.
71. Xu, J., Yu, L., Guo, J., Xiang, J., Zheng, Z., Gao, D., ... & Han, J. (2019). Generation of pig induced pluripotent stem cells using an extended pluripotent stem cell culture system. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-16.
72. Tanaka, Y., Sonoda, S., Yamaza, H., Murata, S., Nishida, K., Hama, S., Kyumoto-Nakamura, Y., Uehara, N., Nonaka, K., Kukita, T., & Yamaza, T. (2018). Suppression of AKT-mTOR signal pathway enhances osteogenic/dentinogenic capacity of stem cells from apical papilla. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 334.
73. Saberi E, Farhad-Mollashahi N, Sargolzaei Aval F, Saberi M. Proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation, and cytokine production by human stem cells of

- the apical papilla induced by biomaterials: a comparative study. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2019 Jul 12;11:181-193.
74. Zhang, Y., Yuan, L., Meng, L., Fang, M., Guo, S., Wang, D., Ma, J., & Wang, L. (2019). Guanine and nucleotide binding protein 3 promotes odonto/osteogenic differentiation of apical papilla stem cells via JNK and ERK signaling pathways. *International journal of molecular medicine*, 43(1), 382–392.
75. Martín Gil, L. (2020). Evaluación de un modelo experimental en rata dirigido a la regeneración ósea con células madre obtenidas de pulpa dental.
76. Suárez, D. (2012). Principios básicos en regeneración ósea guiada. *Acta Bioclínica*, 2(3), 89-116.
77. Martin-Piedra, A., & Martin-Piedra, L. (2019). Matrices para Ingeniería del tejido óseo.
78. Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2014). Estrategias para la regeneración de tejidos: células, inductores bioquímicos, bionanomateriales y bioconstrucciones. *Alcances clínico quirúrgicos. Cirugía y Cirujanos*, 82(5), 578-589.
79. Diago, M. P., Martínez-González, J. M., & Bielsa, J. M. S. (2001). Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia y Osteointegración*, 11(3), 205-216.
80. Arrebola, D., Fernández, L., & Sánchez, D. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista toxicológica en línea*, 40-53.
81. Hernández, M. R., & Cañas, J. C. (2006). Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 37(3), 173-176.
82. LIVE/DEAD ® FungaLight™ Yeast Viability Kit, Molecular Probes, Invitrogen detection technologies, product information 20-junio-2005
83. Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154). Product information 2002
84. Rampersad, SN (2012). Múltiples aplicaciones de Alamar Blue como indicador de función metabólica y salud celular en bioensayos de viabilidad celular. *Sensores*, 12 (9), 12347-12360.

85. Barcellona, M. L., & Gratton, E. (1991). A molecular approach to 4', 6-diamidine-2-phenylindole (DAPI) photophysical behaviour at different pH values. *Biophysical chemistry*, 40(3), 223-229.
86. Fijałkowska, M., & Antoszewski, B. (2019). Frequency of Various Craniofacial Clefts Observed in a Single Center during a Period of 34 Years. *Polski przegląd chirurgiczny*, 92(1), 29-33.
87. Shah, C. P., & Wong, D. (1980). Management of children with cleft lip and palate. *Canadian Medical Association journal*, 122(1), 19–24.
88. Bajestan, M. N., Rajan, A., Edwards, S. P., Aronovich, S., Cevidanes, L. H., Polymeri, A., & Kaigler, D. (2017). Stem cell therapy for reconstruction of alveolar cleft and trauma defects in adults: a randomized controlled, clinical trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 19(5), 793-801.
89. Sahai S, Wilkerson M, Xue H, Moreno N, Carrillo L, Flores R, Greives MR, Olson SD, Cox CS Jr, Triolo F. Wharton's Jelly for Augmented Cleft Palate Repair in a Rat Critical-Size Alveolar Bone Defect Model. *Tissue Eng Part A*. 2020 Jun;26(11-12):591-601.
90. McKeen, 2017. McKeen, L, 2017. Renewable Resource and Biodegradable Polymers, Film Properties of Plastics and Elastomers. Fourth Edition. *Plastics Design Library*, Pages 449-479
91. Ramírez, J. M. R. (2018). Morfogénesis embrionariasomítica y faríngea:: cara y cuello. *Acta odontológica venezolana*, 56(1), 17-18.
92. Villa, L., Flores, F., & Santibáñez, L. (2017). Células madre de la pulpa dental (DPSC): perspectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas. *Salud Jalisco*, 4(3), 168-177.
93. Rosales Ibáñez, R., Alvarado Estrada, K. N., & Ojeda Gutiérrez, F. (2012). Ingeniería tisular en Odontología. *Revista ADM [internet]*. Julio-agosto, 164-67.
94. Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)*, 101(1), 227-249.
95. Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020). Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 10(1), 381–388.

96. Daniel Aparecido Lopes Vieira da Cunha, Paulo Inforçatti Neto, Kelli Cristina Micocci, Caroline Faria Bellani, Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo, Zilda Castro Silveira, Marcia Cristina Branciforti , " Fabricación y Caracterización de Andamios de Poli (ϵ - caprolactona) / Biosilicato ® Biocomposites Prepared by Generative Manufacturing Process ", Revista Internacional de Biomateriales , vol. 2019 , ID de artículo 2131467 , 11 páginas , 2019 . <https://doi.org/10.1155/2019/2131467>
97. Christen, M. O., & Vercesi, F. (2020). Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 13, 31–48.
98. Labet, M. y Thielemans, W. (2009). Síntesis de policaprolactona: una revisión. *Revisión de la sociedad química* , 38 (12), 3484-3504.
99. Schmid, J., Schwarz, S., Fischer, M., Sudhop, S., Clausen-Schaumann, H., Schieker, M., & Huber, R. (2019). A laser-cutting-based manufacturing process for the generation of three-dimensional scaffolds for tissue engineering using Polycaprolactone/Hydroxyapatite composite polymer. *Journal of tissue engineering*, 10, 2041731419859157.
100. Alvarez, K. L., Lagos, R. F., & Aizpun, M. (2016). Influencia del porcentaje de relleno en la resistencia mecánica en impresión 3D, por medio del método de Modelado por Deposición Fundida (FDM). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 24(ESPECIAL), 17-24.
101. Robles-García, M. A., Francisco, R. F., Márquez-Ríos, E., Barrera-Rodríguez, A., Aguilar-Martínez, J., & Del toro-Sánchez, C. L. (2014). Aplicaciones biomédicas, textiles y alimentarias de nanoestructuras elaboradas por electrohilado. *Biotecnia*, 16(2), 44-52.
102. Sabino, M. A., Loaiza, M., Dernowsek, J., Rezende, R., & Da Silva, J. V. (2017). TÉCNICAS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS CON APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS (TECHNIQUES FOR MANUFACTURING POLYMER SCAFFOLDS WITH POTENTIAL APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING). *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 120-146.

103. Qian Y, Zhou X, Zhang F, Diekwisch TGH, Luan X, Yang J. Triple PLGA/PCL Scaffold Modification Including Silver Impregnation, Collagen Coating, and Electrospinning Significantly Improve Biocompatibility, Antimicrobial, and Osteogenic Properties for Orofacial Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Oct 16;11(41):37381-37396.
104. Hany E, Yahia S, Elsherbeny MF, Salama NM, Ateia IM, Abou El-Khier NT, El-Sherbiny I, Abou Elkhier MT. Evaluation of the osteogenic potential of rat adipose-derived stem cells with different polycaprolactone/alginate-based nanofibrous scaffolds: an in vitro study. *Stem Cell Investig*. 2020 Aug 7;7:14.
105. Kim, K. J., Choi, M. S., Shim, J. H., & Rhie, J. W. (2019). Bone Morphogenetic Protein 2-Conjugated Silica Particles Enhanced Early Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells on the Polycaprolactone Scaffold. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 16(4), 395–403.
106. Tapponnier, Y., Afanassieff, M., Aksoy, I., Aubry, M., Moulin, A., Medjani, L., Bouchereau, W., Mayère, C., Osteil, P., Nurse-Francis, J., Oikonomakos, I., Joly, T., Jouneau, L., Archilla, C., Schmaltz-Panneau, B., Peynot, N., Barasc, H., Pinton, A., Lecardonnell, J., Gocza, E., ... Savatier, P. (2017). Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Krüppel-like factors. *Stem cell research*, 24, 106–117.
107. Muzaffar, M., Selokar, N. L., Singh, K. P., Zandi, M., Singh, M. K., Shah, R. A., Chauhan, M. S., Singla, S. K., Palta, P., & Manik, R. (2012). Equivalency of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cells derived from fertilized, parthenogenetic, and hand-made cloned embryos. *Cellular reprogramming*, 14(3), 267–279.
108. Campos, F., Garzón Bello, I. J., Rodríguez, I., & Martín-Piedra, M. Á. (2016). Evaluación de la viabilidad celular en constructos tisulares. Estudio preliminar.
109. Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The archives of bone and joint surgery*, 6(2), 90–99.
110. Cakmak, A. M., Unal, S., Sahin, A., Oktar, F. N., Sengor, M., Ekren, N., Gunduz, O., & Kalaskar, D. M. (2020). 3D Printed Polycaprolactone/Gelatin/Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue

- Engineering. *Polymers*, 12(9), 1962. Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., Ao, Y., Boyan, B. D., & Chen, H. (2019). Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 25(1), 14–29.
111. Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., Ao, Y., Boyan, B. D., & Chen, H. (2019). Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 25(1), 14–29.
112. Naik, C., Srinath, N., Ranganath, M. K., Umashankar, D. N., & Gupta, H. (2020). Evaluation of polycaprolactone scaffold for guided bone regeneration in maxillary and mandibular defects: A clinical study. *National journal of maxillofacial surgery*, 11(2), 207–212.
113. Vyas, C., Zhang, J., Øvrebø, Ø., Huang, B., Roberts, I., Setty, M., Allardyce, B., Haugen, H., Rajkhowa, R., & Bartolo, P. (2021). 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 118, 111433.
114. Huang, G. T., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792–806.
115. Saberi, E., Farhad-Mollashahi, N., Sargolzaei Aval, F., & Saberi, M. (2019). Proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation, and cytokine production by human stem cells of the apical papilla induced by biomaterials: a comparative study. *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*, 11, 181–193.
116. Araújo, T. M., & Caldas, L. D. (2019). Tooth extractions in Orthodontics: first or second premolars?. *Dental press journal of orthodontics*, 24(3), 88–98.