



Caracterización de fibroblastos aislados de la mucosa palatina de individuos con defectos de labio y/o paladar hendido no sindrómico en cultivo 2D y 3D

Characterization of fibroblasts isolated from the palatal mucosa of individuals with non-syndromic cleft lip and/or palate defects in 2D and 3D culture

Sandra Liliana Alfonso García

Tesis para optar al título de
Doctora en Ciencias Odontológicas por la Universidad de Antioquia

Director: David Arboleda Toro. PhD. Neurociencias.
Codirectora: Mónica Tatiana Parada Sánchez. PhD. Biología Oral

Universidad de Antioquia
Facultad de odontología
Doctorado en ciencias Odontológicas
Medellín
2022

Cita	Alfonso García (1)
Referencia	(1) Alfonso García S.L. Caracterización de fibroblastos aislados de la mucosa palatina de individuos con defectos de labio y/o paladar hendido no sindrómico en cultivo 2D y 3D. Tesis Doctoral. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2022.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Doctorado en Ciencias Odontológicas. Cohorte II
 Grupo de Investigación Estudios Biosociales del Cuerpo (EBSC).
 Centro de Investigación Odontológicas (CIFO).



Biblioteca Odontología
Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano: Angela María Franco Cortés

Jefe departamento: Carlos Arturo Gómez Tabarez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Tabla de contenido

Resumen	15
Abstract	16
Introducción	17
1. Objetivos.....	21
1.1. Objetivo general	21
1.2. Objetivos específicos	21
2. Problema de Investigación	22
3. Hipótesis.....	24
3.1. H ₀	24
3.2. H ₁	24
CAPITULO 1.....	25
4. Marco teórico.....	25
4.1. Embriología facial.....	25
4.2. Anatomía y formación del paladar	26
4.3. Hendiduras del labio ± el paladar.....	29
4.3.1. Epidemiología.....	30
4.3.2. Lateralidad de las hendiduras	31
4.3.3. Etiología del labio ± paladar hendido	32
4.3.4. Etiología del labio ± paladar hendido sindrómico	33
4.3.5. Etiología del labio ± paladar hendido no sindrómico	33
4.4. Limitaciones del tratamiento quirúrgico del CL ± P	35
4.5. Terapias avanzadas y medicina regenerativa	36
4.6. Terapias avanzadas en el tratamiento de CL ± P no sindrómico	37

4.7. Los fibroblastos: células con potencial regenerativo	39
4.8. Fibroblastos de la mucosa masticatoria	42
4.9. Fibroblastos gingivales humanos, ECM y mecanotransducción	45
4.10. Fibroblastos gingivales humanos en la curación de heridas	48
4.11. Capacidad inmunológica e inmunomoduladora de los hGF	54
4.12. Potencial regenerativo de los fibroblastos gingivales humanos	55
4.12.1. Fibroblastos gingivales humanos en la regeneración del tejido óseo	59
4.13. Mecanotransducción celular	63
4.14. Reprogramación celular	64
4.15. Cultivo celular tridimensional	69
CAPITULO 2.....	74
5. Metodología general.....	74
5.2. Población de estudio.....	74
5.3. Muestra.....	74
5.4. Criterios de inclusión.....	74
5.8. Revestimiento de placas de cultivo con agarosa y cultivo tridimensional	80
CAPITULO 3.....	82
6. Aislamiento de células, estandarización de cultivo 2D y caracterización de fibroblastos gingivales primarios de defectos CL ± P NS.....	82
Introducción	82
6.1. Materiales y Métodos.....	84
6.1.1. Evaluación por microscopía óptica.....	84
6.1.2. Ensayo de unidades formadores de colonias de fibroblastos (UFC).....	85
6.1.3. Ensayo de cinética de proliferación de hGF CL ± P NS.....	86
6.1.4. Caracterización por citometría de flujo de hGF CL ± P NS	86

6.1.5. Caracterización por inmunocitoquímica de hGF CL \pm P NS	87
6.1.6. Análisis estadístico.....	89
6.2. Resultados.....	89
6.2.1. El método de explante es eficiente para aislar fibroblastos gingivales.....	89
6.2.2. Los hGF CL \pm P NS forman colonias con baja densidad de siembra.....	92
6.2.3. El tiempo de duplicación de la población de hGF CL \pm P NS es variable entre individuos.....	93
6.2.4. Los hGF CL \pm P NS son células con baja granularidad y tamaño pequeño que expresan marcadores de superficie de MSC	95
6.2.5. Los hGF CL \pm P NS expresan marcadores de células quiescentes de linaje mesenquimal en cultivo 2D.....	97
6.3. Discusión	98
CAPITULO 4.....	105
7. Cultivo y caracterización de esferoides de fibroblastos gingivales humanos.....	105
CL \pm P NS.....	105
Introducción	105
7.1. Materiales y Métodos.....	107
7.1.1. Evaluación por microscopia óptica.....	107
7.1.3. Microscopia electrónica de barrido, espectroscopia de energía dispersada y electrones dispersados	109
7.1.4. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier.....	109
7.1.5. Análisis estadístico.....	110
7.2. Resultados.....	110
7.2.1. <i>Los hGF CL \pm P NS formaron esferoides espontáneos con la técnica de superposición de líquidos.....</i>	110

7.2.3. Los esferoides hGF CL \pm P conforman una estructura altamente cohesiva con depósito de minerales en la superficie	116
7.2.4. El cultivo 3D induce la síntesis de fosfato de calcio amorfo en hGF CL	120
7.4. Discusión	125
CAPITULO 5.....	133
8. Evaluación de los cambios en la expresión génica de los fibroblastos gingivales de CL \pm P NS en cultivo 3D	133
Introducción	133
8.1. Materiales y métodos	136
8.1.1. Extracción de RNA de las células en cultivo monocapa y de esferoides	136
8.1.3. Evaluación de la cantidad y calidad del RNA	137
8.1.2. Síntesis de cDNA por transcripción inversa	137
8.1.3. Diseño de primers	138
8.1.4. PCR convencional.....	139
8.1.5. Validación de los primers por PCR en tiempo real.....	140
8.1.7. PCR en tiempo real y análisis de los niveles de expresión génica.....	143
8.1.8. Verificación de productos de qRT-PCR	145
8.1.9. Análisis estadístico.....	146
8.2. Resultados	147
8.2.1. Los genes GAPDH y RPL27 fueron amplificados de forma específica en los cultivos 2D de hGF CL \pm P NS.....	147
8.2.2. Especificidad en la amplificación de genes de respuesta de la ECM, mecanotransducción y marcadores de precursores osteogénicos por PCR convencional en los cultivos 2D y 3D de hGF CL \pm P NS	147
8.2.3. Genes relacionados con la ECM y respuestas de mecanotransducción se modulan significativamente y presentan gran variabilidad individual	149

8.2.4. <i>Los genes de marcadores de osteoprogenitores se modulan significativamente en esferoides derivados de hGF CL ± P NS</i>	152
8.3. Discusión	155
9. Conclusiones	163
10. Recomendaciones	165
Referencias	166
Anexos	196

Lista de tablas

Tabla 1. Características fenotípicas y funcionales de los hGF	54
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los cultivos 2D vs.3D	72
Tabla 3. Características de la muestra.....	75
Tabla 4. Anticuerpos conjugados para caracterización por citometría de flujo	87
Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados para caracterizar hGF CL+/-P NS	88
Tabla 6. Características de la muestra de los esferoides CL+/-P NS.....	89
Tabla 7. Número y tiempo de duplicación de la población hGF CL+/-P NS	94
Tabla 8. Iones identificados en la superficie esferoidal de hGF CL+/-P NS	119
Tabla 9. Bandas y picos relevantes del espectro FTIR de esferoides hGF CL+/-P NS	122
Tabla 10. Iones presentes en superficie de esferoide de 21 días de cultivo	124
Tabla 11. Secuencias de primers utilizados en cultivo 2D y 3D de hGF CLP+/-P NS	139
Tabla 12. Cambios en la expresión de genes diana en individuos con CL+/-P NS.....	155

Lista de figuras

Figura 1. Secuencia del desarrollo facial humano	26
Figura 2. Representación esquemática de la palatogénesis	28
Figura 3. Características del fenotipo antifibrótico de los hGF.....	53
Figura 4. Fibroblastos gingivales humanos y su potencial regenerativo.....	62
Figura 5. Mecanismo de mecanodetección y mecanotransducción celular	64
Figura 6. Cultivo en monocapa y cultivo 3D de fibroblastos gingivales CL+/-P NS	70
Figura 7. Resumen gráfico del diseño metodológico	76
Figura 8. Procedimiento de toma y transporte de la biopsia.....	77
Figura 9. Procesamiento de la muestra y aislamiento de hGF CL+/-P NS	78
Figura 10. Estandarización de cultivo primario de hGF CL+/-P NS	91
Figura 11. Morfología en cultivo 2D de los hGF CLP +/- P NS	92
Figura 12. Capacidad de formación de UFC de hGF CL+/-P NS	93
Figura 13. Curva de proliferación de hGF CL+/-P NS.....	94
Figura 14. Dispersión lateral vs. dispersión frontal: hGF CL+/-P vs. hGF adulto sano .	95
Figura 15. Expresión de marcadores de MSC en hGF CL+/-P NS.....	96
Figura 16. Conjunto de marcadores con expresión positiva en hGF CL+/-P NS	97
Figura 17. Marcadores negativos de hGF CL+/-P NS	98
Figura 18. Etapas y cambios morfológicos de los esferoides hGF CL+/-P NS.....	111
Figura 19. Tiempo de cultivo vs. morfología de esferoides hGF CL+/-P NS.....	112
Figura 20. Variables sociodemográficas vs. diámetro promedio de los esferoides.....	114
Figura 21. Diámetro promedio esferoidal entre individuos con CL+/-P NS.....	114
Figura 22. Análisis por inmunofluorescencia de esferoides de hGF CL+/-P NS.....	115

Figura 23. Morfología y tipografía de la superficie esférica de hGF CL+/-P NS	117
Figura 24. Análisis ultraestructural de la superficie esférica de hGF CL+/-P NS	118
Figura 25. Espectro FTIR de los esferoides de hGF CL+/- NS	120
Figura 26. Huella dactilar del espectro FTIR de los esferoides de hGF CL+/-P NS ...	121
Figura 27. Espectro FTIR: hidroxiapatita vs. superficie esférica hGF CL+/-P NS....	123
Figura 28. SEM, EDS y FTIR de la superficie de esferoide de 21 días de cultivo	124
Figura 29. Análisis en gel de agarosa de la calidad del RNA extraído de hGF	138
Figura 30. Rectas de calibración de la qRT-PCR	141
Figura 31. Curvas de disociación de los genes ITGβ1 y ALPL	142
Figura 32. Resultados del análisis RefFinder para GAPDH y RPL27	144
Figura 33. Gráfica de amplificación de los genes RPL27 y TNC en cultivos 2D y 3D	145
Figura 34. Análisis en gel de agarosa de los amplicones de la qRT-PCR.....	146
Figura 35. Rampa de temperatura para los genes GAPDH y RPL27	147
Figura 36. Productos de PCR de los genes COL1A1, ACTA2, BMPR2 y TNC	148
Figura 37. Productos de PCR de VCL, RHOA, CTNNB1, ITGA5 e ITGβ1	148
Figura 38. Productos de PCR de los genes ALPL, SPP1, WNT3a y RUNX2	149
Figura 39. Expresión de genes relacionados con ECM en hGF CL+/-P NS	150
Figura 40. Expresión de genes relacionados con mecanotransducción en hGF	151
Figura 41. Expresión de marcadores osteoprogenitores en hGF	153
Figura 42. Genes regulados sinérgicamente en esferoides hGF CL+/-P NS.....	154

Siglas, acrónimos y abreviaturas

2D:	Bidimensional
3D:	Tridimensional
αSMA:	Alfa actina de musculo liso
β-TCP:	Fosfato beta-tricálcico
BMP:	Proteínas morfogenéticas óseas
CD:	Clúster de diferenciación
CL:	Labio hendido
CP:	Paladar hendido
CL+P:	Labio hendido con o sin paladar hendido
CL+P NS:	Labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico
Col:	Colágeno
Cx43:	Conexina 43
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindo
DLX:	Homeobox distales
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DMEM:	Medio eagle modificado de dulbecco
DMSO:	Sulfóxido de dimetilo
EB:	Electrones retrodispersados
ECM:	Matriz extracelular
EDS:	Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EL:	Elastina
EMT:	Transición epitelio mesenquimal
FAP:	Proteína activadora de fibroblastos
FAK:	Quinasa de adhesión focal
FBS:	Suero fetal bovino
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos
FN:	Fibronectina

FN ED-A:	Variante de empalme de fibronectina que contiene extra-dominio A
FTIR:	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
GO:	Análisis de ontología génica
GWSA:	Estudios de asociación del genoma completo
HA:	Ácido hialurónico
HAp:	Hidroxiapatita
HAS:	Enzima ácido hialurónico sintasa
hDF:	Fibroblastos dérmicos humanos
hGF:	Fibroblastos gingivales humanos
HGF:	Factor de crecimiento de hepatocitos
hiPSC:	Células madre pluripotentes inducidas humanas
HKG:	Housekeppin gene
hLMF:	Fibroblastos humanos de mucosa bucal de revestimiento
HLA-DR:	Antígenos leucocitarios humanos clase II
HOX:	Homeobox
hVFF:	Fibroblastos de cuerdas vocales humanas
IL:	Interleuquina
ITG:	Integrina
iPSC:	Células madre pluripotentes inducidas
LINC:	Complejo enlazador del nucleoesqueleto y el citoesqueleto
MAPK:	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MEE:	Epitelio del borde medio
MES:	Selle epitelial medio
MET:	Transición mesenquimal - epitelial
mM:	Milimolar
MMPs:	Metaloproteinasas de la matriz
MMP:	Metalopeptidasa
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
miRNA:	Micro ácido ribonucleico
MSC:	Células madre mesenquimales
MTT:	Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio

ng:	Nanogramo
nm:	Nanomolar
NV:	Nacidos vivos
NS:	No sintromico
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patogenos
PBS:	Solucion salina tamponada con fosfato
PCR:	Reaccion en cadena de la polimerasa
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
p/e	Penicilina/estreptomicina
PDN:	Numero de duplicacion de la poblacion.
PDT:	Tiempo de doblaje de la poblacion.
psi:	Libras por pulgada cuadrada
p/v:	Peso/volumen
PRP:	Plasma rico en plaquetas
qRT-PCR:	Reaccion en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA:	Acido ribonucleico
RNAseq:	Secuenciacion de acido ribonucleico
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS-HCL:	Dodecilsulfato sodico diluido en acido clorhidrico
SEM:	Microscopia electronica de barrido
SNP:	Polimorfismo de nucleotido unico
Shh:	Proteinas sonic hedgehog
Src:	Tirosina de quinasa no receptora
SOCE:	Entrada de calcio operada por almacenamiento
TE:	Ingenieria de tejidos
THSB1:	Trombospondina 1
TNC:	Tenascina-C
TIMPs:	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TGFβ:	Factor de crecimiento transformante beta
TLR:	Receptores tipo Toll
UCMSC:	Celulas madre de cordon umbilical

UFC: Unidad formadora de colonias de fibroblastos
μL: Microlitro
μm: Micra
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
hVFF: Fibroblastos de cuerdas vocales humanas
Vim: Vimentina

Resumen

Las malformaciones craneofaciales son los defectos congénitos más comunes en humanos. Dentro de estas, las hendiduras orofaciales del labio y/o el paladar son las más frecuentes y generan morbilidad considerable en los niños afectados, quienes deben someterse desde edades muy tempranas a múltiples intervenciones para su tratamiento y rehabilitación, entre las que se encuentran los injertos óseos, que aún se consideran el gold estándar para la reparación y regeneración ósea. Sin embargo, estos presentan varias desventajas, y genera comorbilidades en los pacientes. Las terapias avanzadas buscan alternativas de tratamiento para la regeneración de los tejidos, como el enfoque que ofrecen los modelos de cultivo tridimensional basados en células, al considerarse que representan el microambiente de los tejidos. Así mismo, buscan nuevas fuentes de células diferentes a las células madre mesenquimales, por las limitaciones ampliamente descritas para su uso *in vivo*. Esta tesis se enfoca en caracterizar células autólogas provenientes de la mucosa masticatoria de individuos con labio y/o paladar hendido no sindrómico, en un ambiente de cultivo celular en monocapa, y en cultivo tridimensional libre de factores externos o inductores químicos, además de analizar los cambios en la expresión génica resultado de la reprogramación via biomecánica a la cual se someten las células con el propósito de evaluar su potencial uso en enfoques de ingeniería de tejidos y/o terapia celular para la reconstrucción de tejidos craneofaciales. Adicionalmente, se estandariza un modelo tridimensional *in vitro* para el estudio de la biología celular de los tejidos orofaciales.

Palabras clave: cultivo tridimensional, esferoides celulares, fibroblastos gingivales humanos, labio y/o paladar hendido.

Abstract

Craniofacial malformations are the most common congenital defects in humans. Among these, orofacial clefts of the lip and/or palate are the most frequent and generate considerable morbidity in affected children, who must undergo multiple interventions from very early stages to its treatment and rehabilitation, among which are bone grafts, which are still considered the gold standard for bone repair and regeneration. However, these have several disadvantages and generate comorbidities in patients. Advanced therapies seek treatment alternatives for tissue regeneration, such as the approach offered by three-dimensional cell-based culture models, as they are considered to represent the microenvironment of tissues. Likewise, they seek new sources of cells other than mesenchymal stem cells, due to the widely described limitations for their use *in vivo*. This thesis focuses on the characterization of autologous cells from the masticatory mucosa of individuals with non-syndromic cleft lip and/or palate, in a monolayer cell culture environment, and in three-dimensional culture free of external factors or chemical inducers, in addition to analyzing the changes in gene expression resulting from the reprogramming via biomechanics to which the cells are subjected in order to evaluate its potential use in tissue engineering and/or cell therapy approaches for craniofacial tissue reconstruction. Additionally, a three-dimensional *in vitro* model is standardized for the study of the cell biology of orofacial tissues.

Key words: Tridimensional cell culture, gingival spheroids, human gingival fibroblast, cleft lip and/or cleft palate.

Introducción

Las malformaciones craneofaciales son los defectos congénitos más comunes en humanos, y las hendiduras orofaciales, labio \pm paladar hendido (CL \pm P, por su sigla en inglés), labio fisurado (CL, por su sigla en inglés) y el paladar hendido (CP, por su sigla en inglés) son las más frecuentes (1,2). La prevalencia mundial promedio de nacimientos de todas las hendiduras orofaciales es de 9.92 por 10.000 nacimientos (cerca de 1 por cada 1000 nacimientos), con variaciones geográficas y étnicas importantes. En general, las poblaciones de Asia oriental y nativos americanos tienen las tasas de prevalencia más altas, seguidas por las poblaciones europeas y del sur de Asia mientras que, las poblaciones afrodescendientes tienen tasas de prevalencia más bajas (2,3).

En Colombia el Instituto Nacional de Salud (INAS) reportó una prevalencia de 8.5 por cada 10.000 nacidos vivos (NV) en 2017 para el CL \pm P, con un incremento variable de los casos durante los últimos cinco años, llegando en 2021 a una prevalencia de 8.0 por cada 10.000 NV. Estos datos se relacionan con el análisis de prevalencia e incidencia del CL \pm P realizado durante los años 2009 a 2017, en el cual se demostró, que durante este periodo el CL \pm P presentó una tendencia al alza no estacionaria (4).

Las hendiduras orofaciales generan una morbilidad considerable en los niños afectados e implican una carga personal, financiera y social de alto impacto para las familias, y una alta carga biomédica para el sistema de salud (5). Además, las personas con CL \pm P pueden experimentar problemas de alimentación, del habla, la audición, maloclusiones y de integración social que requieren la participación de un equipo multidisciplinario, y de diversas intervenciones para su tratamiento y rehabilitación desde etapas muy tempranas. El desarrollo esquelético anormal requiere de múltiples correcciones quirúrgicas y/o injertos de tejidos para sustituir los tejidos no formados: mucosa bucal, submucosa, tejido óseo y muscular según el tipo y tamaño del defecto (6,7).

Los objetivos de la reconstrucción craneofacial incluyen restaurar la forma, la función, la estética facial y respetar el crecimiento craneofacial en el caso de los pacientes pediátricos. En relación con los defectos óseos se han desarrollado estrategias

quirúrgicas, tales como la distracción osteogénica, los colgajos desplazados y/o libres vascularizados, implantes de una amplia gama de biomateriales como cerámicas, polímeros sintéticos, polímeros naturales y compuestos, entre otros y los injertos óseos autólogos (8–10).

El injerto óseo autólogo ha sido el estándar de oro del reemplazo óseo, porque proporciona células osteogénicas, así como, los factores esenciales necesarios para la curación y regeneración ósea (11). Sin embargo, presenta desventajas como la baja disponibilidad de tejido en el sitio donante, potencial morbilidad del sitio receptor y donante, y tiempos operatorios prolongados. Estas situaciones deterioran el estado de salud general del paciente (12,13), sin contar los costos para el sistema de salud, si se tiene en cuenta que el gasto en Estados Unidos de América puede sobrepasar los US \$100 millones anuales, mientras que en Colombia se carece de estudios al respecto (5).

La medicina regenerativa busca dar respuesta a este tipo de limitantes. Se han desarrollado *in vitro* e *in vivo* varias plataformas y técnicas de cultivo celular, complementarios de los procedimientos quirúrgicos convencionales, y como una alternativa al injerto autólogo con resultados clínicos prometedores (14,15). Aún más, se han utilizado células autólogas aisladas del paladar de pacientes con hendiduras congénitas, demostrando que estas células, aunque provienen del defecto tienen la capacidad de regenerar una mucosa palatina similar al tejido normal, a pesar de las variaciones fenotípicas y genéticas que presentan (16,17).

La terapia celular y la ingeniería de tejidos basada en células, tienen que ver en gran medida con la supervivencia y el rendimiento de las células implantadas. El éxito de su aplicación depende del tipo celular, las condiciones locales de los sitios receptor y donante, así como de la manipulación *in vitro* (5,18). Tanto células madre de diversos linajes como células diferenciadas, se han utilizado en la regeneración de tejidos blandos y óseo craneofaciales, aunque el uso de estas últimas es limitado debido a su incapacidad de auto renovación y escaso potencial de diferenciación (19,20). Actualmente, gracias a los avances y nuevos conocimientos de la biología celular, y de los componentes del microambiente celular, la medicina regenerativa busca la reparación endógena de los tejidos mediante la manipulación tanto de células madre y/o su nicho, así como explotar la plasticidad de las células diferenciadas en los tejidos adultos (21,22). Desde esta

perspectiva, los fibroblastos las principales células que constituyen el estroma de los tejidos y órganos, se consideran un componente central y versátil de la biología tisular, entre otros aspectos por su similitud con las células madre mesenquimales (MSC, por su sigla en inglés) según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por su sigla en inglés), que incluyen inmunofenotipo, potencial de diferenciación y la capacidad proliferativa, inclusive, en algunos casos se consideran un recurso más efectivo para la terapia celular que las mismas MSC (23,24).

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar fibroblastos aislados de la mucosa palatina de individuos con defectos de labio y/o paladar hendido no sindrómico (CL_±P NS; por su sigla en inglés) en cultivo adherente (2D), y en cultivo tridimensional (3D), con el propósito de establecer su potencial de biológico como fuente de células autólogas en terapias avanzadas, dirigidas a la regeneración de los tejidos craneofaciales involucrados en los defectos de CL_±P. En un futuro, se espera que esta aproximación haga parte de un abordaje terapéutico conservador con una mínima morbilidad quirúrgica, con el fin de optimizar la rehabilitación funcional, y estética de los pacientes afectados por hendiduras craneofaciales, de esta forma se espera disminuir los costos de las intervenciones reconstructivas, y mejorar sustancialmente la calidad de vida de las personas afectadas por esta condición en nuestro país. Adicionalmente, la metodología de investigación que se desarrolla en este trabajo, propone un modelo *in vitro* para el estudio de la biología celular de los tejidos orofaciales.

El trabajo presenta en la primera sección una síntesis acerca de la embriología y etiología del CL_±P, así como un resumen de los estudios preclínicos y clínicos de terapias avanzadas para su tratamiento, seguido por la una revisión de tema centrada en el fenotipo de los fibroblastos gingivales, y su potencial implementación en terapias avanzadasⁱ, así como el concepto de reprogramación celular, y el proceso de mecanotransducción como uno de los mecanismos que puede inducir la reprogramación celular en cultivo 3D, para finalizar con el uso del cultivo celular 3D como herramienta de investigación en biología celular y molecular. Posteriormente, se presentan los resultados de la caracterización morfológica, y fenotípica de los fibroblastos gingivales aislados de CL_±P NS cultivados en condiciones 2D, y 3D con especial énfasis en el análisis ultraestructural de los esferoides celulares, y los cambios en la expresión génica de genes

diana relacionados con la matriz extracelular (ECM, por su sigla en inglés), vías de mecanotransducción y marcadores de precursores osteogénicos.

En esta investigación, los fibroblastos gingivales en cultivo 3D lograron crear un ambiente mineralizante en el nicho, el cual fue evidente por el depósitos de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo en la superficie esférica, que eventualmente pueden servir como una matriz osteoinductora y/u osteoconductora en enfoques de ingeniería de tejidos, o en terapia celular dirigida a la regeneración de los tejidos óseos craneofaciales. Adicionalmente, se sumó evidencia de la capacidad que tienen los fibroblastos residentes en la mucosa palatina para modificar su fenotipo, y la expresión génica via mecanotransducción en cultivo 3D y, por lo tanto, de la plasticidad que exhiben para servir como fuente de células de fácil acceso y escasa morbilidad en enfoques de medicina regenerativa para pacientes con CL₊P NS.

Para terminar, la alta variabilidad individual que presentaron los perfiles genéticos de los individuos que conformaron la muestra, respalda la necesidad de implementar enfoques de medicina personalizada en el diagnóstico, tratamiento y prevención de las hendiduras craneofaciales.

ⁱ Revisión de tema publicada en el European Journal of Cell Biology, volumen (99), numero (7), <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151123>

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterizar fibroblastos aislados de la mucosa palatina de individuos con defectos de labio y/o paladar hendido no sindrómico en cultivo 2D, y en cultivo 3D, con el propósito de establecer su potencial de biológico como fuente de células autólogas en terapias avanzadas.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar el fenotipo de los fibroblastos gingivales aislados de defectos CL_±P NS en cultivo 2D o monocapa.
- Describir la formación de esferoides de fibroblastos gingivales aislados de defectos CL_±P NS con la técnica de interposición de líquidos con agarosa.
- Describir la morfología y ultraestructura de fibroblastos gingivales CL_±P NS en cultivo 3D.
- Evaluar cambios en la expresión génica de los fibroblastos gingivales de CL_±P NS en cultivo 2D vs. 3D.

2. Problema de Investigación

Las malformaciones craneofaciales son los defectos congénitos más comunes en humanos, y de estas el CL+P. La prevalencia mundial promedio de nacimientos de todas las hendiduras orofaciales es de 9.92 por 10.000 nacimientos (cerca de 1 por cada 1000 nacimientos), con variaciones geográficas y étnicas importantes. Adicionalmente, la incidencia de CL+P NS constituye aproximadamente el 70 % de los casos, de los cuales el 20% son familiares y el 80% corresponde a casos esporádicos. Las hendiduras orofaciales generan una morbilidad considerable en los niños afectados e implican una carga personal, financiera y social de alto impacto para las familias, y una alta carga biomédica para el sistema de salud (25).

El injerto óseo alveolar se realiza comúnmente para reconstruir la cresta alveolar en pacientes con defectos óseos asociados con CL+P. La reconstrucción del proceso alveolar favorece la erupción de los dientes permanentes, el movimiento de los dientes a través del proceso alveolar mediante fuerzas de ortodoncia y el restablecimiento de la función masticatoria y estética. Los injertos óseos estabilizan los arcos dentales, mejoran el soporte periodontal de los dientes adyacentes a la fisura, y cierran las fistulas buco-nasales, reduciendo las dificultades del habla. Sin embargo, los injertos óseos presentan limitaciones que la medicina regenerativa busca solucionar (13). Al respecto, células autólogas aisladas del paladar de pacientes con hendiduras congénitas, ya se han empleado en enfoques de medicina regenerativa, demostrando que tienen la capacidad de regenerar una mucosa palatina similar al tejido normal, a pesar de las posibles variaciones fenotípicas y genéticas (16,17). Así mismo, las mucosas orales se consideran una fuente celular apropiada, ya que son fácilmente accesibles mediante procedimientos mínimamente invasivos sin generar problemas estéticos (26, 27).

Actualmente existe un número limitado de estudios sobre terapia celular para la regeneración de los tejidos periodontales y óseos craneofaciales; sin embargo, ya hay evidencia que demuestra que los fibroblastos gingivales tienen el potencial de mejorar los resultados de los tratamientos regenerativos del hueso alveolar y los tejidos

periodontales (28-30). También, se han realizado ensayos clínicos utilizando MSC derivadas de diversos tejidos, pero la complejidad y los costos asociados con el aislamiento y la manipulación de estas células justifican la búsqueda de métodos simples, rápidos, efectivos, y económicos para la recolección y procesamiento de células. Al respecto, se conoce ampliamente que el cultivo de células somáticas y de MSC en esferoides puede mejorar sus propiedades regenerativas (31 - 33). Sin embargo, se debe tener en cuenta, que las MSC presentan inconvenientes para su aplicación clínica. Primero, las MSC son células escasas en tejidos adultos; por lo tanto, se requiere generar dosis terapéuticamente relevantes (1-2 millones/kg), en consecuencia, las MSC experimentan muchas divisiones celulares in vitro, lo que aumenta la posibilidad de mutagénesis y pérdida de actividad. En segundo lugar, las MSC implantadas migran a sitios distantes del tejido receptor, lo que sugiere que el mecanismo por el cual las MSC favorecen la regeneración tisular consiste en reclutar y/o modular células locales. Finalmente, la inestabilidad en el potencial regenerativo de las poblaciones de MSC se ha relacionado con el “nicho de células madre” en el destino celular, donde la variabilidad genética y/o las alteraciones epigenéticas están involucradas (34, 35).

Por las razones descritas, la presente investigación plantea la necesidad de caracterizar fibroblastos gingivales aislados de individuos con hendiduras orofaciales, en un ambiente de cultivo tridimensional libre de factores externos e inductores químicos, como una fuente de células y una alternativa más segura y clínicamente relevante, con fines terapéuticos para los enfoques de medicina regenerativa de los tejidos afectados por hendiduras craneofaciales. Finalmente, desarrollar modelos celulares accesibles y económicos para el estudio y comprensión de la biología y la fisiología celular, permite avanzar en la búsqueda de soluciones para la medicina traslacional.

3. Hipótesis

3.1. H₀

Los fibroblastos gingivales aislados de defectos CL_±P NS no tienen la capacidad de modificar su fenotipo y expresión génica en cultivo tridimensional, sin la influencia de otros factores externos.

3.2. H₁

Los fibroblastos gingivales aislados de defectos CL_±P NS poseen la plasticidad celular para modificar su fenotipo y expresión génica en cultivo tridimensional, sin la influencia de otros factores externos.

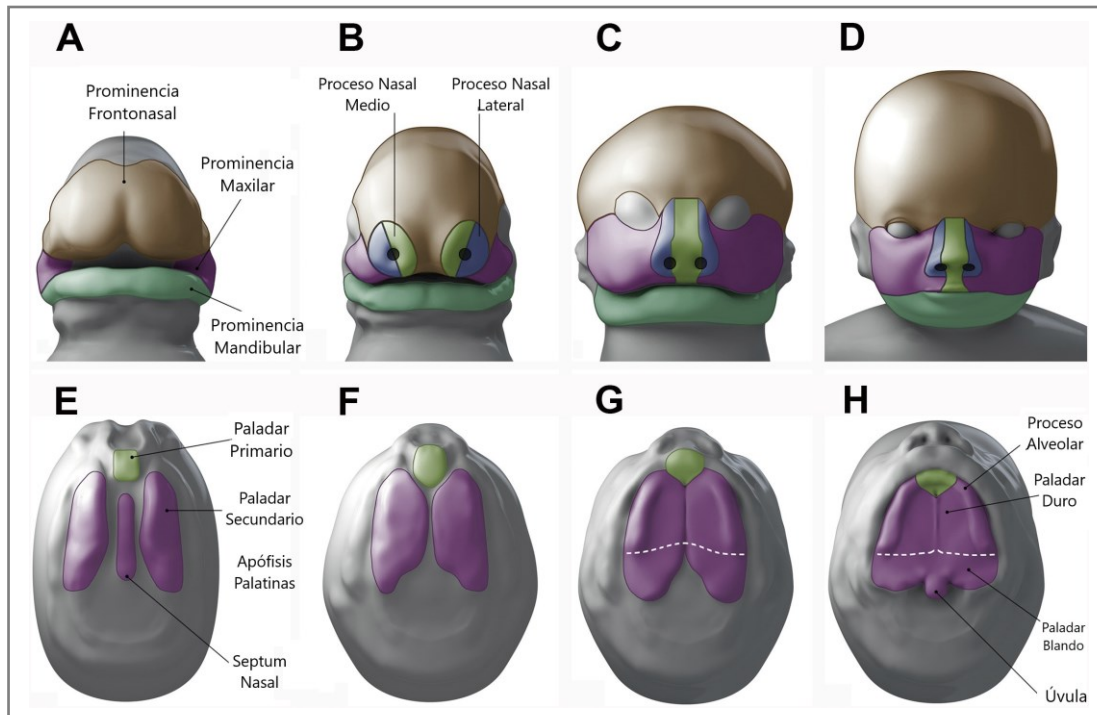
CAPITULO 1

4. Marco teórico

4.1. Embriología facial

La embriogénesis, específicamente durante el desarrollo facial implica una serie de eventos complejos y finamente coordinados. El desarrollo de la cara inicia alrededor de la cuarta semana de gestación y está estrechamente relacionado con las células de la cresta neural craneal (36,37). Estas células migran y se combinan con células del mesodermo y ectodermo para formar cinco prominencias faciales así: una prominencia frontonasal, dos procesos mandibulares y dos procesos maxilares alrededor del estomodeo (Figura 1A). Una vez se forman la prominencia frontonasal y las placodas nasales, estas últimas se invaginan para formar los procesos nasales mediales y laterales (38).

La fusión de los procesos faciales se lleva a cabo en diferentes momentos del desarrollo embrionario, dando origen a las diferentes estructuras de la cara en el siguiente orden cronológico; el maxilar, el labio superior y el paladar primario a la 7ª semana de vida intrauterina (VI), el paladar secundario a la 12ª semana de VI y la mandíbula entre la 4ª y 5ª semana de VI (39) (Figura 1A, Figura 1B). El proceso de fusión de las prominencias faciales depende de una secuencia de eventos que involucran migración, crecimiento, adhesión, diferenciación y apoptosis celulares (Figura 1E, Figura 1F, Figura 1G, Figura 1H). Por lo tanto, el crecimiento, la estructura y el patrón de las prominencias faciales están controlados por interacciones complejas que involucran un amplio número de moléculas, tales como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteínas sonic hedgehog (Shh), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), los genes homeobox (*HOX*) *BARX1*, *MSX1*, genes homeobox distales (*DLX*) y gradientes locales de ácido retinoico (40, 41).

Figura 1. Secuencia del desarrollo facial humano

Nota. (A). Formación de los procesos faciales; (B-D). Formación del labio superior; (E-H). Formación del paladar primario (proceso alveolar) y paladar secundario (42).

4.2. Anatomía y formación del paladar

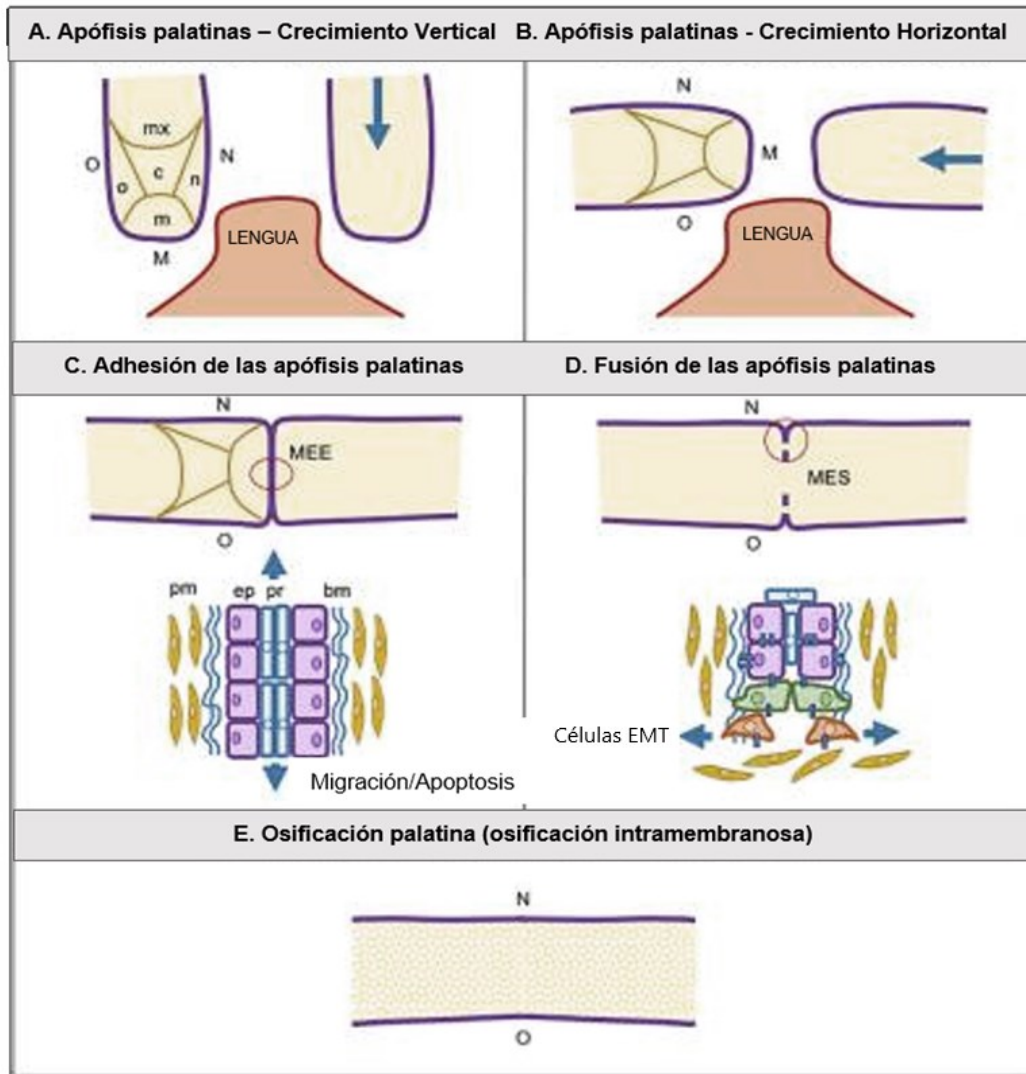
El paladar se divide en dos regiones anatómica y embriológicamente diferentes: 1) El paladar primario: corresponde al segmento intermaxilar y resulta del crecimiento medial de las prominencias maxilares y las prominencias nasales mediales alrededor de la 6ª semana de VI. A su vez, el paladar primario está constituido por un componente labial, que forma el surco subnasal del labio superior (Figura 1D), y un componente del maxilar superior que da soporte a los cuatro dientes incisivos y un componente palatino que forma el paladar primario como tal y se sitúa anterior al foramen palatino (Figura 1H). El segmento intermaxilar es continuo con la porción rostral del tabique nasal, y es formado por la prominencia frontal (42).

2) El paladar secundario inicia su desarrollo en la 6ª semana de VI, cuando las crestas palatinas emergen del proceso maxilar (Figura 1E). Estas crecen verticalmente a lo largo de los bordes laterales de la lengua en desarrollo y alrededor de la 8ª semana de VI se elevan adoptando una posición horizontal a medida que la cabeza se expande,

y la lengua se mueve hacia abajo (Figura 2A, Figura 2B). El crecimiento continuo conduce a las crestas palatinas a confrontarse en la línea media y lograr posteriormente su fusión a lo largo del selle epitelial medio (MES, por su sigla en inglés) (Figura 2C). La fusión exitosa del paladar secundario resulta en una separación completa de la cavidad nasal y oral en la 12^a semana de VI (Figura 2D). Finalmente, el agujero incisivo sirve de límite entre el paladar primario y secundario (43).

Los epitelios de las crestas palatinas cuando se encuentran en posición vertical están en contacto con los epitelios mandibular y lingual, por lo tanto, debe evitarse la fusión patológica entre el paladar y la mandíbula, y/o la lengua. Esta función está mediada por el peridermo, una capa de células individuales, transitoria durante la embriogénesis, el cual exhibe una expresión altamente polarizada de los complejos de adhesión, y se desprende de la superficie exterior a medida que la epidermis adquiere su función de barrera. Los genes *IRF6*, *IKKA*, *SFN*, *RIPK4*, *CRHL3*, están bajo el control transcripcional del factor de transcripción p63 que influye en el proceso de fusión y diferenciación de la epidermis y juegan un papel clave en la formación del peridermo (Figura 2C) (44).

Posteriormente, la adhesión del epitelio de las crestas palatinas forma una línea única, llamada epitelio del borde medial (MEE, por su sigla en inglés), el cual finalmente desaparece para permitir la confluencia y fusión del tejido palatino. Procesos como la muerte celular programada, la transición epitelio-mesenquimal (EMT, por su sigla en inglés) y la migración celular del epitelio oral al nasal o una combinación de estos eventos, se han sugerido como posibles mecanismos para la desintegración del MEE (Figura 2D) (45). Una vez se produce la fusión palatina los dos tercios anteriores se mineralizan por osificación intramembranosa formando el paladar duro bajo la señalización de numerosos factores, particularmente la BMP, FGF, hedgehog (HH), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la señalización Wnt/ β -catenina que conduce al mesénquima palatino a experimentar diferenciación osteoblástica y mineralización del tejido (Figura 2E). El tercio posterior dará lugar a un tejido fibromuscular o paladar blando (46).

Figura 2. Representación esquemática de la palatogénesis

Nota. (A). Las crestas palatinas crecen verticalmente rodeando la lengua. Se observan cinco regiones en el mesénquima palatino: nasal, medial, oral, central y maxilar y tres regiones en el epitelio palatino: nasal, medial, y oral. (B). Las crestas palatinas ascienden, cambian su orientación de vertical a horizontal y se ubican por encima de la lengua. (C). El epitelio palatino medial de las crestas se adhiere formando el MEE. En esta zona se observan dos tipos de células epiteliales conformando dos capas, el peridermo y un epitelio cuboidal no estratificado. Las células del peridermo comienzan a migrar hacia los sitios del epitelio nasal y el epitelio oral. (D). Inicia la fragmentación MEE debido a la EMT, estas células posteriormente migran dentro del mesénquima palatino. (MI) El MES desaparece por completo y las células mesenquimales del paladar comienzan a diferenciarse en osteoblastos por osificación intramembranosa. Abreviaturas bm: membrana basal; c: región central; EMT: transición epitelio mesenquimal; ep: células epiteliales; M: sitio medial; m: región medial; MEE: epitelio del borde medial; MES: selle epitelial medio; mx: región maxilar; n: región nasal; N: sitio nasal; o: región oral; O: sitio oral; pm: mesénquima palatino; pr: células del peridermo (46).

4.3. Hendiduras del labio ± el paladar

Las interrupciones en la fusión de los procesos faciales durante la embriogénesis afectan el desarrollo facial y puede dar lugar a hendiduras completas o parciales de la cara, el labio y/o el paladar (37). Las hendiduras craneofaciales se dividen en dos grandes grupos: 1) hendiduras sindrómicas, cuando estas se encuentran asociadas con anomalías cognitivas o físicas adicionales fuera de la región de la hendidura, o con un síndrome de etiología genética conocida causado por mutación de un solo locus, anomalía cromosómica o teratógenos, siendo condiciones raras o poco frecuentes, y 2) hendiduras no sindrómicas (NS) o aisladas, condiciones que no están asociadas a otra anomalía reconocible; donde varios factores de riesgo ambientales, y múltiples genes han sido implicados en su etiología, lo que significa que es una enfermedad compleja y heterogénea, además de presentar una fuerte agregación familiar (47, 48).

La incidencia de las hendiduras en casos sindrómicos difiere entre los estudios y a su vez varía entre las poblaciones, al respecto Beriaghi et al. (49) informaron que este tipo de hendiduras corresponde aproximadamente al 30% de los casos. Por su parte, Mossey y Modell (25) determinaron que la incidencia de CL±P NS constituye aproximadamente el 70 % de los casos, de los cuales el 20% son familiares y el 80% corresponde a casos esporádicos. A diferencia del paladar hendido aislado, para el cual Dixon et al. (6) informaron que el 50% de los casos correspondían a casos sindrómicos, y NS respectivamente.

Desde el punto de vista anatómico, las hendiduras orofaciales son un grupo heterogéneo de trastornos que afectan la estructura de la cara y la cavidad bucal, de forma general se divide en tres categorías: A) las hendiduras que afectan únicamente el labio. B) Las hendiduras que afectan el labio y el paladar, y las hendiduras que afectan solo el paladar. Aunque el paladar primario y el paladar secundario tienen orígenes de desarrollo distintos, el CL y el CL±P comparten el defecto del paladar primario, por lo tanto, se incluye al CL y el CL±P en un grupo común: labio hendido con o sin paladar hendido (50).

El labio hendido se puede clasificar como microforma, CL incompleto o CL completo. Una microforma de CL corresponde a una muesca o ranura en el labio o los tejidos blandos, en este caso todos los tejidos del labio están presentes, pero hay una muesca que involucra la unión cutánea y el bermellón. Por el contrario, el CL incompleto implica dehiscencia del musculo orbicular de la boca y puede ser variable en su compromiso de la piel. La presencia de una banda de Simonart, se refiere a una banda delgada de tejido blando que abarca el aspecto superior de un CL incompleto en el alféizar nasal. El CL completo se extiende a lo largo del labio y dentro del alféizar nasal, lo que lleva a una inserción anormal del musculo orbicular de la boca en el ala nasal y la columela. Además, en el CL bilateral hay desplazamiento anterior del segmento intermaxilar con ausencia del musculo orbicular de la boca (42).

El paladar hendido también se clasifica según el grado de severidad o compromiso de las estructuras anatómicas. El paladar hendido submucoso se caracteriza por una dehiscencia subyacente a la musculatura palatina, mientras que la mucosa suprayacente está intacta, por lo tanto, es difícil de detectar. Los sub fenotipos del CP submucoso incluyen muescas en la línea media del paladar duro, úvula bífida o parcialmente dividida, una zona translúcida o línea azul grisácea en la línea media del paladar, que representa la falta de musculatura y transparencia en la zona. La hendidura del paladar secundario implica un defecto, que se extiende desde el agujero incisivo a través del paladar blando hasta la úvula. En contraste, una hendidura del paladar primario involucra la zona del paladar que se ubica anterior al agujero incisivo, y que se extiende hasta el proceso alveolar. El paladar hendido completo involucra tanto el paladar primario como el secundario (48).

4.3.1. Epidemiología

Para todas las hendiduras orofaciales, en términos generales, existe mayor riesgo para la población asiática y nativos americanos (0.82 - 4.04 por 1000 NV), mientras que las tasas más bajas se observan en población afrodescendiente (0.18 – 1.67 por 1000 NV), y tasas intermedias en la población caucásica (0.9 – 2.96 por 1000 NV) (51). En el estudio liderado por la OMS, en 2011, se reportó una prevalencia general para el CL_±P

de 9.92 por 10,000 NV. Para el CL fue de 3.28 por 10.000 NV y la del CL_±P fue 6.64 por 10.000 NV. La evaluación por áreas geográficas, evidencio que, en Japón, México-América del Sur, Europa Occidental y Canadá se presentó una prevalencia estadísticamente más alta que la estimación general (9.92 por 10.000 nacimientos); mientras que los registros en Europa del Este, Europa del Sur del Mediterráneo y Sudáfrica presentaron una prevalencia estadísticamente más baja (3).

La prevalencia del CL_±P también varía según el sexo y el patrón de la hendidura. El predominio masculino se ha identificado consistentemente en el CL_±P, con una proporción de hombres/mujeres de 1.81. Mientras que el CP tiene un comportamiento contrario, con una proporción hombres/mujeres de 0,93 (51). Los hombres con CL_±P tienen hendiduras más graves que las mujeres, y el CL_±P familiar suele ser menos grave que los casos esporádicos. Sin embargo, la prevalencia en los hombres es menor para las formas sindrómicas, mientras que la incidencia de CL_±P sindrómico en las mujeres es mayor cuando el padre tiene más de 40 años (52). Las causas de esta diferencia son desconocidas, pero las interacciones entre los efectos genéticos y sexuales probablemente contribuyen con el dimorfismo por sexo del CL_±P. Al respecto Carlson et al. (53) por medio de análisis de todo el genoma, y de las interacciones gen/sexo de una población multiétnica de hendiduras orofaciales identificaron alelos de riesgo sexo-específicos para el CL_±P NS.

4.3.2. Lateralidad de las hendiduras

Como ya se mencionó, las hendiduras orofaciales pueden ser unilaterales o bilaterales. Según la base de datos internacional perinatal de hendiduras orales típicas (IPDTC), la proporción de casos bilaterales es del 10,3% para el CL y del 30,2 % para el CL_±P. Entre los casos unilaterales, el 36.9 % de CL y el 41.1 % de CL_±P ocurren en el lado derecho, lo que sugiere que los casos unilaterales de CL_±P ocurren con mayor frecuencia en el lado izquierdo, incluso esta diferencia puede llegar al doble (3).

La dismorfología según la severidad de las hendiduras está asociada con la severidad del fenotipo en términos de otras malformaciones, Gallagher et al. (54). identificaron que el CL±P bilateral, así como las hendiduras que involucran el paladar presentan el doble de probabilidades de tener un síndrome cuando se compara con CL aislado. Adicionalmente, el CL±P bilateral y el CL±P derecho tienen más probabilidades de presentar un síndrome, así como, el CL±P NS del lado derecho tiene mayor riesgo de presentar otras malformaciones. Estas diferencias en los resultados asociados con la lateralidad de las hendiduras sugieren que las hendiduras del lado derecho pueden tener una etiología distinta (3).

4.3.3. Etiología del labio ± paladar hendido

La etiología del CL±P aún no se comprende por completo. Desde hace varios años se ha sugerido la interacción de algunos factores ambientales, y la exposición a ciertas condiciones locales, tales como deficiencias nutricionales durante el embarazo y alteraciones uterinas físicas en las madres gestantes. Los factores ambientales que pueden alterar gravemente el desarrollo del feto, y que se han asociado con la aparición de las hendiduras orofaciales incluyen: la edad de los padres (55), el uso de medicamentos como corticosteroides o anticonvulsivantes, el tabaquismo, y el consumo de alcohol durante el embarazo (56).

En algunos casos, se sugirió que la enfermedad materna especialmente el asma aumentaba las posibilidades de CL±P (57), mientras que las complicaciones metabólicas o nutricionales como la obesidad, la falta de ácido fólico en la dieta (58) y la desnutrición o la diabetes también pueden estar relacionadas (59). El mecanismo mediante el cual los genes están expuestos a ciertas condiciones del medio, y cómo estas pueden contribuir al desarrollo del CL±P aún no está completamente claro, lo que constituye un tópico de particular interés para investigar.

4.3.4. Etiología del labio ± paladar hendido sindrómico

El CL_±P sindrómico posee patrones de herencia mendeliana, los genes implicados producen tanto la anomalía orofacial, como otras alteraciones. Se han reportado alrededor de 300 síndromes asociados a CL_±P (50).

Las causas de los síndromes que generan malformación generalmente se dividen en tres categorías: 1) anomalías cromosómicas y reordenamientos genómicos, 2) trastornos mendelianos o de un solo gen, y 3) interacciones complejas de factores genéticos, ambientales y estocásticos, antes referidos como multifactoriales. Debido a que los teratógenos interrumpen la morfogénesis embrionaria y fetal normal, y pueden interactuar con factores genéticos predisponentes, los factores ambientales siempre se deben considerar dentro de las causas de los síndromes con CL_±P. Los factores genéticos conocidos suelen ser raros, y causales. La variabilidad de la expresión y la penetrancia incompleta también son características de estos fenotipos (61).

En los últimos años, se ha avanzado en la caracterización de las alteraciones genéticas relacionadas con síndromes asociados con hendiduras orofaciales. Estos incluyen la identificación de mutaciones en el gen del factor regulador del interferón 6 (*IRF6*) como la causa del síndrome de Van der Woude, y el gen del receptor 1 relacionado con el polio virus (*PVRL-1*) como el causal de la displasia ectodérmica autosómica recesiva, entre otros (62).

4.3.5. Etiología del labio ± paladar hendido no sindrómico

La causa principal del CL_±P NS muestra una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales. Múltiples genes se han relacionado con el riesgo de presentar CL_±P NS, pero difieren entre poblaciones étnicas, y familias; es decir, tiene patrones de herencia poligénica. Los genes que se han estudiado son genes candidatos, es decir genes que han sido detectados en fisuras sindrómicas y que podrían contribuir con la etiología del CL_±P NS (63).

Los estudios de asociación de genoma completo (GWSA, por su sigla en inglés) y el exoma, así como los estudios de secuenciación de genes candidatos han investigado los efectos de varios genes, variantes genéticas raras, y modificadores de genes en la aparición de CL₊P NS (54, 64, 65). Además, hay evidencia de que los factores ambientales tienen un papel importante en su etiología. Se han identificado interacciones específicas de genes-ambiente (2, 66). Sin embargo, la asociación entre la exposición a factores medio ambientales tales como el consumo de alcohol y el tabaco con factores genéticos, y la presentación de hendiduras orofaciales NS que se consideraba era alta, actualmente se cuestiona debido a las revisiones sistemáticas y metaanálisis de la evidencia acumulada, limitando el alcance de estas asociaciones a poblaciones específicas (67, 68). Los GWSA han reportado cerca de 37 loci de riesgo genético para CL₊P NS que solo pueden describir una pequeña fracción de heredabilidad (69, 70). Una parte considerable de loci informados explica sus efectos en diferentes grupos de poblaciones, pero la fuerza de asociación para una variante única entre poblaciones difiere como resultado de la heterogeneidad del locus (71).

Adicionalmente, las frecuencias de alelos de riesgo también muestran tasas de prevalencia variables para CL₊P NS en diferentes poblaciones que colectivamente representan solo el 20% a 25% de la heredabilidad de CL₊P NS (72). También, se deben tener en cuenta las variantes raras de baja frecuencia, y otros factores de respuesta o modificadores genéticos, así mismo se necesita más investigación para comprender el concepto de umbral multifactorial (interacción gen-ambiente) de etiología compleja y penetrancia variable asociada a las hendiduras orofaciales, y los mecanismos biológicos por los cuales las variantes comunes relacionadas afectan el desarrollo craneofacial normal (62).

Estudios anteriores a los análisis GWAS informaron varios genes candidatos asociados con las hendiduras orofaciales NS, incluidos *FGFR1*, *FGFR2*, *CRISPLD2*, *SUMO1* y *TFGβ* entre otros. Los GWSA han llevado al descubrimiento de al menos 43 genes/loci asociados con CL₊P NS, con variantes genéticas en loci del gen *IRF6* que muestran la asociación más fuerte con el CL₊P NS entre diferentes poblaciones (63), así como el polimorfismo de nucleótido único (SNP, por su sigla en inglés) en el gen *FOXE1* (73). Actualmente los estudios se enfocan en identificar subtipos de hendiduras

orofaciales NS utilizando factores genéticos y sus ontologías funcionales, de esta forma se podrá orientar el diagnóstico y tratamiento en el futuro (64).

4.4. Limitaciones del tratamiento quirúrgico del CL ± P

El tratamiento del CL_±P es complejo, y demanda la intervención de un equipo multidisciplinario. Es necesario realizar múltiples reconstrucciones quirúrgicas, con el propósito de restaurar la forma, la función, y la estética facial (7). Una consideración importante del tratamiento quirúrgico es la de respetar el crecimiento craneofacial en los pacientes pediátricos, debido a que el tratamiento y la misma malformación se han relacionado con la inhibición del crecimiento maxilofacial. Posterior a las cirugías reconstructivas del labio y el paladar, los efectos no deseados más comunes incluyen la hipoplasia y/o retrusión maxilar y las deformidades del arco dental, de acuerdo con la gravedad de las deformidad original (75). En el caso de la reconstrucción quirúrgica del paladar, en el 10% a 30% de los casos no se logra el cierre completo entre la cavidad nasal y oral, y se requiere de una nueva intervención (76). Actualmente, ningún protocolo quirúrgico disponible puede evitar por completo estas complicaciones postoperatorias (77).

En el CL_±P, los músculos del paladar blando y el labio se reducen en masa, lo que dificulta la recuperación funcional después de la cirugía. Además, la reconstrucción quirúrgica induce fibrosis, la cual limita la regeneración muscular y su función en el habla, la deglución y la estética facial. La fibrosis representa un exceso patológico del proceso normal de reparación de tejidos, de igual forma las condiciones específicas de los músculos hendidos pueden comprometer la regeneración muscular después de la reparación quirúrgica (78).

De otra parte, con el propósito de mejorar el soporte de los labios y la estética facial, además de facilitar la erupción dental, así como el tratamiento de ortodoncia y/o la rehabilitación protésica se indican los injertos óseos alveolares (79). El injerto óseo autólogo de cresta iliaca, se considera el estándar de oro del reemplazo óseo para las hendiduras orofaciales, porque proporciona células osteogénicas, así como los factores esenciales necesarios para la curación y regeneración ósea (11). Sin embargo, este

tratamiento presenta inconvenientes como la disponibilidad limitada en los sitios donantes, además, de comorbilidades del sitio donante, tales como dolor postoperatorio (93%), trastornos en la marcha (92.5%) (80), parestesia, infección y cicatriz antiestética (81), y en el sitio receptor el injerto puede fallar por falta de unión que puede ser hasta del 69% (82), y reabsorción ósea que puede ser hasta del 50% del volumen inicial (83).

En resumen, la función y la estética mejoran de manera importante con la reconstrucción quirúrgica, pero los problemas funcionales pueden persistir debido a la regeneración muscular incompleta, la fibrosis y fallas en la integración del tejido óseo injertado. Por lo tanto, alternativas que mejoren el resultado de la cirugía reconstructiva, tales como las estrategias de las terapias avanzadas son deseables.

4.5. Terapias avanzadas y medicina regenerativa

Las terapias avanzadas incluyen estrategias biotecnológicas tales como la terapia génica, la terapia celular y la ingeniería de tejidos (TE, por su sigla en inglés) que utilizan la medicina regenerativa, un campo interdisciplinario emergente de investigación, y las aplicaciones clínicas orientadas en la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos y órganos para restaurar la función deteriorada resultante de cualquier causa, incluidos defectos congénitos, enfermedades, traumas y envejecimiento (84).

La terapia celular y la TE emplean células diferenciadas o células madre de diversos linajes, las cuales exhiben diferente capacidad terapéutica dependiendo de la fuente de la que fueron aisladas. Las células son entidades complejas, capaces de integrar señales del entorno, y de traducir respuestas precisas de acuerdo con los estímulos recibidos. Cuando se usan como agentes terapéuticos, las células pueden ejercer modos de acción avanzados, tales como migración, acumulación en áreas específicas, producción a demanda de factores paracrinos o sistémicos, proliferación o apoptosis en respuesta a la carga de la enfermedad y la regeneración de tejidos, a diferencia de los tratamientos convencionales (85,86).

Las células madre se utilizan ampliamente en medicina regenerativa debido a su capacidad de proliferación (autorrenovación) *in vivo* y *ex vivo*, su potencial de diferenciación, así como a los protocolos de expansión y aislamiento establecidos que

promueven un alto grado de pureza y funcionalidad cuando se aplican *in vivo*. Las células madre adultas, entre ellas las MSC se obtienen de una variedad de tejidos donantes, se han caracterizado, y expandido, y actualmente se aplican en procedimientos de trasplante (87). Sin embargo, aún existen limitaciones respecto a la cantidad de tejido que se logra extraer del donante, y la capacidad de expansión restringida de las células aisladas. A su vez, la variabilidad en el potencial regenerativo de las poblaciones de MSC puede estar relacionada con el impacto del “nicho de células madre” en el destino celular, donde intervienen la variabilidad genética y/o alteraciones epigenéticas (88).

Otro recurso de la medicina regenerativa son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por su sigla en inglés). Hasta ahora su uso no se ha difundido debido a que presentan inestabilidad genética y mutaciones a causa de la reprogramación; por lo tanto, aun no se consideran un producto completamente confiable para uso clínico. Sin embargo, ya se reportó el primer trasplante alogénico para tratar la degeneración macular (89).

Las mucosas bucales han demostrado ser una fuente apropiada de células para la medicina regenerativa, a la cual se accede fácilmente por medio de procedimientos mínimamente invasivos, y sin generar problemas estéticos como ocurre en otros sitios anatómicos (26). Específicamente, los fibroblastos de las mucosas bucales son células con características fenotípicas deseables, capaces de adoptar una variedad de destinos alternativos en respuesta a diversos factores extrínsecos, condiciones que hacen de estas células un recurso interesante para las terapias avanzadas, y la regeneración de los tejidos blandos y mineralizados craneofaciales (90).

4.6. Terapias avanzadas en el tratamiento de CL ± P no sindrómico

Desde la década de los 90 se reporta la aplicación clínica de la TE para reparar los tejidos craneofaciales con resultados muy buenos; por ejemplo, los sustitutos híbridos de mucosa bucal en casos de cirugía peri-implantar, preprotésica, vestibuloplastias, microsomía hemifacial y anquiloglosia, así como en defectos extensos de la mucosa bucal (91 - 96). Posteriormente, Sumi et al. (97) realizaron un ensayo clínico, en el cual emplearon aloinjertos epiteliales para reparar tejido mucoperióstico posterior a la

palatoplastia convencional en pacientes con CL_±P como un apósito biológico temporal para acelerar la epitelización y la cicatrización de la herida con buenos resultados clínicos.

Por su parte, Liu et al. (16), en 2008 reportaron un estudio de casos y controles, en el que compararon los resultados histológicos de sustitutos de mucosa bucal derivados de células del paladar de individuos sanos, y con CL_±P. Los resultados indicaron que, los tejidos de TE fueron similares a los tejidos sanos a nivel molecular, con algunas diferencias histológicas para los tejidos de CL_±P. Estos resultados permitieron evidenciar la capacidad de las células de los defectos de CL_±P para regenerar una mucosa palatina similar a la normal a pesar de las posibles variaciones genéticas y fenotípicas. Con el mismo enfoque, Franco et al. (17) reportaron la aplicación de un equivalente mucoepitelial a partir de células autólogas de un defecto de CL_±P, con el cual se logró disminuir el defecto osteo-mucoso, además de un adecuado proceso de cicatrización, confirmando el potencial regenerativo de las células aisladas de la mucosa palatina de defectos de CL_±P.

Así mismo, a partir de la década del 2000, se implementa el enfoque de la TE con el propósito de mejorar los resultados del injerto óseo autólogo en la reconstrucción de defectos CL_±P con el uso de plasma rico en plaquetas (PRP), plasma rico en factores de crecimiento, y plataformas dérmicas acelulares (98 - 100). Los avances más recientes de la aplicación de la TE para las hendiduras craneofaciales se resumen en la revisión sistemática y metaanálisis realizado por Kamal et al. (101) donde se demuestra, que los sustitutos óseos diseñados por TE son tan efectivos como el hueso autólogo para reducir el volumen de la hendidura, por lo tanto, esta estrategia se convierte en una opción viable para eliminar la necesidad de un segundo procedimiento quirúrgico y la morbilidad postoperatoria asociada.

Actualmente, las investigaciones clínicas están orientadas en la implementación de la terapia celular para el tratamiento de CL_±P. Por ejemplo, Mazzetti et al. (15), realizaron un estudio de casos y controles, en el cual emplearon la inyección de células madre autólogas de cordón umbilical (UCMSC, por su sigla en inglés), y sangre de placenta para favorecer la cicatrización de las heridas quirúrgicas. Como resultados importantes informaron la disminución del proceso inflamatorio, formación de cicatrices menos hipertróficas en el labio, y menos fibrosis entre el paladar duro y blando sin

formación de fístulas o dehiscencias, sin embargo, en la zona alveolar no se logró la formación de hueso.

Un estudio similar fue realizado por García et al. (102), quienes también emplearon UCMSC autólogas para el manejo quirúrgico tanto de los defectos óseos como de los tejidos blandos en una paciente con CL+P primario unilateral. La evaluación radiográfica posquirúrgica a los 18 meses, y a los 5 años con tomografía computarizada evidenció la erupción de los dientes adyacentes a la hendidura, y una altura alveolar adecuada; sin embargo, es necesario validar los resultados de formación ósea secundaria al implante de las UCMSC debido a que únicamente con la gingivoperiostoplastia se ha estimado una tasa de formación ósea del 53% al 61% en hendiduras bilaterales y unilateral respectivamente (103). De otro lado, la inyección directa de células madre en el sitio de la herida no siempre es efectiva ya que aun, se presentan desafíos relacionados con la viabilidad celular, la cual puede disminuir dependiendo de la manipulación. Además, las células pueden migrar a sitios diferentes al de implantación, o no se adaptan al nuevo nicho al generarse un microambiente proinflamatorio y oxidativo, sumado a un flujo sanguíneo limitado de la herida (104, 105).

Ahora bien, los ensayos preclínicos más recientes proponen diferentes estrategias en el diseño de dispositivos con biomateriales en sistemas de cultivos celulares 3D, para mimetizar los tejidos y órganos normales. Adicionalmente, los avances en la impresión 3D de plataformas bioreabsorbibles impulsan el desarrollo de la medicina personalizada para el tratamiento del CL+P.

4.7. Los fibroblastos: células con potencial regenerativo

Los fibroblastos, principales células del estroma en los tejidos y órganos, actualmente se consideran un componente central y versátil en la biología de los tejidos. La función principal de los fibroblastos es la síntesis de la ECM, además de mantener la homeostasis a través de la interacción ECM-célula, célula-célula y la secreción de quimiocinas/citocinas (106). Los fibroblastos también están íntimamente relacionados con el sistema inmune innato, perciben señales ambientales, y se comunican entre sí para promover respuestas adecuadas para eliminar agresiones y

restablecer el equilibrio. Además, participan en la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (107, 108); a esto se suma, el papel que juegan en la inflamación y la angiogénesis, así como en la progresión del cáncer, la metástasis y la fibrosis de órganos (19, 110).

En los tejidos normales los fibroblastos tienen mínima actividad proliferativa, pero metabólicamente son activos y apoyan la producción de ECM, por lo que se les considera células quiescentes o en estado de reposo. Los fibroblastos residentes comparten características similares con las MSC, como su capacidad para adherirse al plástico en condiciones de cultivo estándar, la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos o condroblastos *in vitro* (111,112), y la expresión de los marcadores CD73, CD90 y CD105, así como la falta de expresión de CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD19 o CD79 α y HLA-DR (113). Además, comparten propiedades inmunomoduladoras, tales como la supresión de la proliferación de células T y la modulación del inmunofenotipo de macrófagos (114).

La característica principal de los fibroblastos consiste en su capacidad de responder a las citocinas y a las señales físicas de la ECM, adoptando un fenotipo secretor y migratorio, por lo tanto, crean un nicho adecuado para sí mismos y para las células vecinas. Una vez activados los fibroblastos modifican la arquitectura del tejido, amplifican su activación, proliferación y reclutamiento de células (115, 116).

Los fibroblastos se originan en diferentes tejidos y sitios anatómicos y se comportan como subpoblaciones fenotípica y funcionalmente heterogéneas. Estas diferencias están relacionadas con su microambiente biológico y físico que establece una "identidad" o "memoria posicional" determinada por la expresión de genes HOX, la cual retienen las células incluso en cultivo (117). Al respecto, Foote et al. (118) mediante el uso de la tecnología de secuenciación de RNA (RNAseq, por su sigla en inglés) demostraron en siete grupos de fibroblastos humanos aislados de diferentes sitios anatómicos, tales como las cuerdas vocales, la tráquea, el pulmón, el abdomen, el cuero cabelludo, el tejido gingival y el paladar blando en condiciones de normalidad la expresión de diferentes programas genéticos. Estos hallazgos respaldan una heterogeneidad global del desarrollo, y explica la heterogeneidad del fenotipo de los fibroblastos.

Por su parte, el grupo de Loh et al. (119) mapeo el linaje mesodérmico de los fibroblastos humanos durante el desarrollo, utilizando RNAseq de una sola célula y de esta manera confirmo, que el principal progenitor de los fibroblastos primarios son las células mesenquimales que derivan de la EMT. Este proceso está dirigido por factores de señalización pleiotrópicos que inducen la expresión de factores de transcripción específicos de la EMT, entre ellos Snail, Zeb y Twist, micro RNAs y reguladores epigenéticos y postraduccionales. En la vida postnatal, estos factores de transcripción también intervienen en procesos como la curación de heridas, la fibrosis y la metástasis del cáncer (120, 121). Además, el estrés tisular o la inflamación pueden estimular la transición endotelio mesenquimal y originar fibroblastos y miofibroblastos que participan en la curación de heridas o en el desarrollo de enfermedades fibróticas (122,123).

Igualmente, la activación de los fibroblastos se relaciona con los fibrocitos. Estas células se definen como células hematopoyéticas productoras de colágeno (Col) que se originan a partir de precursores de monocitos circulantes en condiciones apropiadas. Los fibrocitos tienen características inmunológicas como los macrófagos, así como la capacidad de reparar la ECM de forma similar a los fibroblastos. El análisis fenotípico de los fibrocitos mediante citometría de flujo y estudios de expresión génica, revelaron la presencia de características estromales y mieloides, con capacidad para la ejercer funciones de homeostasis durante la curación de heridas, y de remodelar la ECM en condiciones inflamatorias; esto es diferente a la función de síntesis de ECM de los fibroblastos primarios (124).

En relación con el origen de los fibroblastos de la region craneofacial, Kerosuo et al. (125) confirmaron que los fibroblastos craneales derivan de las células multipotentes de la cresta neural. Este grupo de células, tiene la capacidad de diferenciarse en linajes ectodérmicos y mesodérmicos, además de su heterogeneidad desde las primeras etapas de desarrollo, lo anterior puede explicar el alto grado de plasticidad para los fibroblastos derivados de la cresta neural (126).

Por su parte, Goodnough et al. (127) y Yoshida et al. (128) demostraron el doble origen embrionario de la dermis craneofacial: la dermis facial deriva de las células de la cresta neural, mientras que, la dermis craneal se origina del mesodermo cefálico y paraxial. Asi mismo, Isaac et al. (129), por medio de dos modelos diferentes de Cre-

recombinasa comprobaron que los fibroblastos gingivales humanos (hGF, por su sigla en inglés) derivan específicamente de células de la cresta neural, y que los fibroblastos de la mucosa de revestimiento (hLMF, por su sigla en inglés) corresponden a una población mixta, de tal forma, que el 40% de las células proviene del mesodermo y el 60% de las células de la cresta neural. Además, identificaron que la contribución de las células de la cresta neural es relativamente estable durante el desarrollo embrionario, y hasta la edad adulta, así mismo, lograron establecer la participación del mesodermo paraxial en el suministro vascular de las membranas de la mucosa bucal. Estos resultados confirman estudios previos en humanos (130, 131).

En conclusión, según el origen, y el sitio anatómico, las subpoblaciones de fibroblastos retienen perfiles específicos de expresión génica durante el desarrollo y en los tejidos adultos. Este hecho, se traduce en diferencias en el tamaño celular, la tasa de proliferación, la función inmunomoduladora, la producción de componentes de la ECM, la expresión de moléculas de adhesión, metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs, por su sigla en inglés), y de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs, por su sigla en inglés), además de la expresión de factores de crecimiento. De esta forma, los fibroblastos exhiben diferentes programas de transcripción controlados por modificaciones epigenéticas y señales locales incluso dentro de un mismo tejido (132,134).

4.8. Fibroblastos de la mucosa masticatoria

Las subpoblaciones de fibroblastos de la mucosa masticatoria humana aún no se han caracterizado ampliamente, como ya se realizó por ejemplo con los fibroblastos de la piel, por lo tanto, identificar las subpoblaciones de fibroblastos en las mucosas bucales, y comprender sus características funcionales es esencial debido al papel que desempeñan en la biología del sistema estomatognático, así como su potencial uso en terapias avanzadas. Adicionalmente, la literatura denomina de manera general a las células derivadas de la mucosa masticatoria, es decir: encía marginal, encía adherida, encía libre y mucosa palatina “fibroblastos gingivales”, término que se adopta en el resto del documento para hacer referencia a los fibroblastos aislados de la mucosa palatina.

Hasta el momento se han adelantado pocos estudios que comparen los hGF con hLMF y/o con fibroblastos dérmicos humanos (hDF, por su sigla en inglés). Por ejemplo, el estudio de Miyoshi et al. (135) reportó el primer perfil comparativo de las firmas genéticas de los fibroblastos hLMF por medio de microarreglos, análisis de agrupamiento de anotaciones funcionales y el análisis de vías. Los hLMF se caracterizaron principalmente por una alta expresión de marcadores de cresta neural craneal, y una baja expresión de genes HOX distintivos de los hDF. Los resultados del análisis de vías indicaron que tanto las vías de reconstrucción de tejidos, las vías proliferativas, así como las vías de señalización están activas en los hLMF, mientras que los genes relacionados con la senescencia en la vía de p53 están inactivos. Aunque el nivel de expresión de p53 en sí mismo fue similar en hLMF y hDF, los genes involucrados en la senescencia inducida por p53 o por estrés tuvieron una baja expresión en hLMF. Adicionalmente, la expresión de algunos genes reguladores anti senescencia fue mayor en hLMF que en hDF. Estos hallazgos sugieren que los hLMF exhiben no solo una mayor plasticidad, sino también una mayor longevidad en comparación con los hDF.

Las características distintivas de los hLMF en relación con los hDF incluyen: una alta expresión de genes de glucoproteínas, genes implicados en la señalización, la ECM, y proteínas receptoras de membrana. La combinación de estos grupos altamente enriquecidos en hLMF puede mejorar el potencial de respuesta a eventos invasivos, o la inflamación. Además, el estudio reveló que el factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF $\beta 2$) y las proteínas SMAD2 y SMAD3 estaban altamente expresadas, pero no el factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF $\beta 3$) hecho que puede estar relacionado con un mejor potencial en la curación de heridas por parte de los hLMF (126).

Un estudio similar fue realizado por Ebisawa et al. (137), en este caso investigaron la expresión diferencial de genes en hDF de la piel facial, y hGF de la zona posterior del vestíbulo por medio de microarreglos de DNA. De 5284 genes evaluados, el 5% (278 genes) mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión. Por su parte, el análisis de ontología génica (GO, por su sigla en inglés) mostró diferencias significativas en genes relacionados con la ECM, la actividad oxidoreductasa, la actividad de citoquinas y genes relacionados con factores de crecimiento. Los genes que se expresaron preferentemente en hGF incluyen el factor de crecimiento similar a la insulina-

2 (*IGF2*), la superóxido dismutasa 3 extracelular (*SOD3*) y glypican-3 (*GPC3*) entre otros. A diferencia de la expresión de la metalopeptidasa 12 de matriz (*MMP-12*), la cual fue más evidente en hDF que en hGF.

Los factores de crecimiento similares a la insulina ejercen efectos autocrinos y paracrinos sobre la proliferación, la migración y la supervivencia de los fibroblastos (138). Debido a que este factor es altamente expresado en hGF puede explicar en parte las características de la mucosa masticatoria relacionadas con la curación de heridas que se explican más adelante. Por su parte, la metalopeptidasa 12 de matriz degrada la elastina (EL) la cual se expresa preferentemente en hDF, principalmente durante la remodelación de la ECM en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejidos. La baja expresión de esta proteína en hGF puede explicar la cantidad mínima de EL presente en la ECM de la mucosa masticatoria (139).

Respecto a la superóxido dismutasa, esta pertenece a una clase de enzimas que catalizan la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, en consecuencia, se consideran parte del sistema de defensa contra el estrés oxidativo en la mayoría de las células. Las mucosas bucales están normalmente expuestas a diversos estímulos nocivos del medio ambiente como alimentos y microorganismos, por lo tanto, la mayor expresión de esta enzima en hGF protege a las células y los tejidos del estrés oxidativo (140).

Como ya se mencionó, Foote et al. (118) compararon hGF y fibroblastos de cuerdas vocales humanas (hVFF, por su sigla en inglés). Con el uso de la tecnología de RNAseq lograron identificar que los hVFF frente a los hGF expresaron 874 genes diferencialmente; de estos 508 genes estaban regulados positivamente, y 366 de forma negativa en hVFF. En términos de componentes celulares, el análisis de GO identificó una alta expresión en componentes integrales de la membrana plasmática interna y externa, así como del complejo de receptores del factor de crecimiento transformante β (*TGF β*): *LPAR1*, *PCDH18*, *TM4SF1*, *TGFBR2*, *FGFR1* en hVFF. Otro hallazgo importante corresponde a la expresión génica aumentada de la enzima ácido hialurónico sintasa 3 (*HAS3*) en los hGF en comparación con hVFF. Esta enzima está asociada con la proliferación celular durante la curación de heridas, y una formación mínima de cicatriz, características bien conocidas para la mucosa masticatoria (141).

La mayor expresión de genes que se relacionan con mejores propiedades en la curación de heridas de los hGF, tiene que ver con proteínas estructurales adhesivas de la ECM, así como genes que codifican para el desensamblaje de la ECM, tales como el Col1A1, osteonectina y la trombospondina 1 (*THBS1*). Específicamente, durante la etapa adulta la función de la osteonectina se relaciona en gran medida con la remodelación de los tejidos durante la homeostasis, y la curación de las heridas, mediante la inhibición del ciclo celular y la modulación de las propiedades adhesivas que modifican la morfología celular (142).

4.9. Fibroblastos gingivales humanos, ECM y mecanotransducción

La ECM es un modulador crítico del fenotipo y el comportamiento de las células a través de la activación o supresión de las vías de señalización intracelular. Los componentes de la ECM se unen e interactúan entre sí y con los receptores de adhesión celular crean una red tridimensional dinámica y compleja. Las mucosas bucales enfrentan una carga alta de estrés físico durante la masticación de los alimentos, para prevenir el daño epitelial secundario estas regiones de la boca se han especializado en protegerse. Por consiguiente, la mucosa masticatoria posee un sistema organizado de fibras de Col y otras moléculas de ECM para producir un tejido firme y rígido que pueda soportar la presión de las fuerzas físicas (143,144).

Al respecto, Glim et al. (145) evaluaron la presencia y ubicación de varios componentes de la ECM en la mucosa masticatoria humana comparándola con la piel abdominal en condiciones de homeostasis, por medio de inmunohistoquímica. Las proteínas colágeno tipo 1 (Col1), colágeno tipo 3 (Col3), ácido hialurónico (HA) y tenascina-C (TNC) se expresaron igualmente en la piel abdominal y la mucosa masticatoria. La fibronectina (FN), la variante de empalme de la fibronectina que contiene el extra- dominio A (ED-A FN) y el sulfato de condroitina, se expresaron más en la mucosa bucal que en la piel. En contraste, la EL se encontró significativamente elevada en la piel, mientras que en la mucosa masticatoria se observaron niveles más bajos. Estos hallazgos se relacionan con los resultados del estudio de Ebisawa et al. (137) el cual

demonstró la baja expresión de *MMP-12* una metaloelastasa involucrada en la remodelación de los tejidos, como ya se mencionó.

Así mismo, el estudio histológico de Ciano y Beatty (146) confirma la escasa presencia de EL en las regiones anterior y laterales de la mucosa palatina, lo cual respalda el mantenimiento de la rigidez tisular en estas zonas en comparación con otros sitios de las mucosas bucales. La presencia o ausencia de EL determina la expresión de queratinas de manera específica en los tejidos. Las queratinas 1 y 10 están presentes exclusivamente en el epitelio queratinizado, mientras que las queratinas 4 y 13 solo están presentes en el epitelio no queratinizado (147). Por otra parte, las fibras elásticas de oxitalan y elaunina son más prominentes en la mucosa bucal en comparación con la piel, tanto el oxitalan como la elaunina consisten en microfibrillas de fibrilina, pero solamente las fibrillas de elaunina incorporan EL en pequeñas cantidades. Las fibras de oxitalan también se expresan en tejidos sometidos a estrés mecánico como la mucosa masticatoria y tienen un papel similar al de la EL (145). Respecto a las proteínas de adhesión como la FN y la ED-A FN, estas se encuentran en mayor cantidad durante en la curación de heridas, que en la piel sana favoreciendo la quimiotaxis, y la migración celular a los sitios de la lesión facilitando así la reparación de las heridas (148).

Por su parte, el adhesoma incluye estructuras tales como las adherencias focales, complejos focales, adherencias fibrilares, podosomas y adherencias reticulares, componentes clave en las interacciones célula-ECM. Estas estructuras son heterogéneas y varían en su morfología, tamaño, distribución, dinámica y en sus componentes moleculares (149). Al respecto, Guo et al. (150) compararon las proteínas del adhesoma presentes en cultivos primarios de hGF y una línea celular de hDF. Los hGF frente a los hDF mostraron una expresión génica reducida de integrinas (ITG) $\alpha 2$, $\alpha 4$, y de la quinasa de adhesión focal (FAK). De acuerdo con estas observaciones los hGF tienen menor capacidad de adhesión, y propagación tanto en la FN como en el Col1. Además, los hGF exhiben menos adherencias focales concomitante con niveles más bajos de fosforilación de FAK, lo cual refleja una capacidad reducida de señalización adhesiva, que se traduce en una menor capacidad para formar adherencias focales rápidamente, así como el citoesqueleto de actina cuando se comparan con los hDF (151).

Las observaciones anteriores son consistentes con el estudio realizado por Walraven et al. (152) el cual demostró una expresión génica significativamente menor de varias subunidades de ITG que sirven de unión al Col y la FN en fibroblastos de la piel fetal, tales como las ITG $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 5$ en comparación con los fibroblastos de piel de adulto. Este hecho puede explicar el fenotipo migratorio intrínseco de los fibroblastos fetales humanos, y de los hGF, que se caracteriza por una baja expresión de moléculas pro-adhesivas y una adhesión reducida a la ECM.

En general, se ha descrito que los fibroblastos humanos de las mucosas bucales en cultivos primarios responden menos a la tensión mecánica, y a la citocina fibrogénica TGF β en comparación con líneas celulares de hDF (153). El TGF $\beta 1$ induce la diferenciación de hDF a miofibroblastos, lo cual se refleja en la expresión de la proteína alfa actina del músculo liso (α SMA), sin embargo, no sucede lo mismo en los fibroblastos bucales. El TGF $\beta 1$ señala a través de la vía de las tirosina quinasa no receptoras (Src) o de las FAK para promover la producción de Col, y la diferenciación de miofibroblastos (154). La sensibilidad reducida al TGF $\beta 1$ que se observa en cultivos primarios de hGF, en comparación con las líneas celulares de hDF se puede explicar por la producción reducida de endotelina1 (ET1) como consecuencia de la expresión disminuida de FAK, así como a la menor actividad de Src /FAK en los hGF (155, 156).

Frente al fenotipo profibrótico de los fibroblastos de la piel, el fenotipo antifibrótico del hGF se caracteriza entonces por un adhesoma que expresa menor cantidad de proteínas adhesivas al Col, la FN, y la ED-A FN aumentando su capacidad migratoria. Además, la menor expresión y la actividad reducida de la FAK en los hGF induce una menor respuesta a la citocina profibrótica TGF $\beta 1$, así como al estrés mecánico, lo que a su vez genera resistencia a la transformación miofibroblástica del hGF, y de esta manera promueve la curación de heridas sin cicatriz (157, 158).

De igual forma, varios estudios *in vitro* han demostrado como la carga mecánica altera la expresión génica en fibroblastos residentes de diferentes tejidos, tal como sucede durante la cicatrización de heridas y la fibrosis, dentro de estos se encuentran varios genes de la ECM. De forma general, los genes de respuesta mecánica en fibroblastos se pueden clasificar en dos tipos: 1) genes relacionados con la ECM, y 2) genes relacionados con la inflamación. El primer grupo incluye genes como el COL (por

ejemplo, *COL* I, III y XII), *MMPs* (por ejemplo, -1, -3 y -13), *TIMPs* (por ejemplo, TIMP-2), *TNC*, *FN*, connectina, cistatina, calmodulina y *TGFβ1*; y el segundo grupo incluye *COX-2* y *mPGES-1*. Otra forma indirecta en la que el estrés mecánico puede regular los genes de la ECM es a través de la secreción y activación de *TGFβ*, un importante factor de crecimiento necesario para la diferenciación de miofibroblastos y la producción de ECM, como ya se mencionó. El estrés mecánico puede conducir a la liberación paracrina de *TGFβ* de los fibroblastos, o la activación de *TGFβ* preexistente en la ECM de los miofibroblastos. El *TGFβ* liberado y activado inducirá genes diana como el procolágeno $\alpha 1$ a través de vías de señalización clásicas (159).

Usualmente los fibroblastos reaccionan al estrés mecánico mediante respuestas adaptativas lentas que implican principalmente cambios en la dinámica del citoesqueleto y la expresión génica. Una de las proteínas del citoesqueleto que participa activamente en la mecanotransducción de fibroblastos es α SMA, esta proteína también aumenta a causa de la tensión mecánica que se genera de forma endógena. En particular, los fibroblastos responden a los estímulos mecánicos aplicados al sufrir reordenamientos de actina que a menudo se asocian con una mayor generación de fuerza contráctil (160).

Las principales vías de señalización que regulan el ensamblaje de la actina, la formación de fibras de estrés, la expresión de α SMA inducida por la fuerza, y que además median la señalización desencadenada por estímulos mecánicos de manera dependiente de integrinas en los fibroblastos son las proteínas quinasas activadas por mitógenos, el calcio (Ca^{2+}), el factor nuclear kappa B y la quinasa dependiente de RhoA. Estas vías también son activadas por factores de crecimiento y citoquinas, por lo tanto, el estrés mecánico puede actuar sinérgicamente con estos factores, lo cual resulta en cambios en la expresión génica de los fibroblastos (161,162).

4.10. Fibroblastos gingivales humanos en la curación de heridas

En general, la respuesta de las mucosas bucales es más rápida, menos prolongada en el tiempo e intensa cuando se compara con la piel, lo cual favorece la formación mínima de cicatrices, o la no formación de cicatriz durante la curación de las heridas (163). La menor presencia de células inmunes, tales como neutrófilos,

macrófagos M1 y M2, células T y mastocitos, además de la ausencia de varias citocinas inflamatorias como IL23, IL24 e interferones inductores de la respuesta inflamatoria, y una baja expresión de citocinas proinflamatorias como la IL6 e IL8 contribuye a la disminución de la respuesta inflamatoria general, y una menor formación de tejido cicatricial (164).

El estudio adelantado por Wang y Tatakis (165) describe el perfil de expresión génica de varios genes relacionados con la remodelación de la ECM durante la curación de heridas en la mucosa masticatoria y en la piel por medio de RNAseq, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR, por su sigla en inglés), inmunohistoquímica y GO. Los resultados evidenciaron que los genes *MMP-1*, *MMP-2* y *MMP-10* tienen una expresión significativamente alta en la mucosa masticatoria, sin embargo, un número mayor de genes de la familia *MMPs* presenta alta expresión en la piel, tales como *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-10*, *MMP-12* y *TIMP-4*. De otra parte, *MMP-2* no se expresa en la piel, y *MMP-1* es el gen con la expresión más alta en los dos tejidos. El gen *SERPINE1* es el único miembro de los inhibidores de serina proteinasa con alta expresión en la mucosa masticatoria, diferente de la piel, donde seis miembros de esta familia de proteínas exhiben una alta expresión (166). Lo anterior indica que la remodelación de la ECM de la mucosa masticatoria durante la curación de heridas, es menos regulada que en la piel.

Adicionalmente, Tarzeman et al. (167) identificaron en cultivos de hGF y hDF que los hemicanales de la conexina 43 (Cx43) regulan la expresión de genes asociados a la cicatrización de heridas. Estos hemicanales se expresan menos en hGF, que en hDF (168). La Cx43 es altamente regulada en queratinocitos y hGF durante las primeras etapas de la inflamación y formación del tejido de granulación, pero su expresión aumenta gradualmente durante las etapas de deposición y remodelación de la ECM. La Cx43 regula la expresión de *MMP-1-3* y *10*, la TNC y el VEGF-A, el cual promueve la angiogénesis, además de regular negativamente la expresión del Col1, α SMA y la meromiosina pesada no muscular IIB, moléculas asociadas con la fibrosis. Estas respuestas celulares involucran las vías de señalización MAPK, GSK3 α/β , TGF β , así como los factores de transcripción proteína activadora 1 (AP1) y Sp1. Por lo tanto, se

considera que estas vías promueven la curación rápida de las heridas de la mucosa masticatoria sin formar cicatrices. (169, 170).

Las heridas en la mucosa de revestimiento producen cicatrices a diferencia de las heridas en la lengua o en la mucosa masticatoria. En este caso, las discrepancias se relacionan con la capacidad de diferenciación de los fibroblastos que residen en las mucosas bucales al fenotipo miofibroblasto. Los miofibroblastos degradan y reorganizan la ECM para posteriormente sufrir apoptosis o desdiferenciación. Este último proceso aparentemente está relacionado con la rigidez de la ECM, para que las células regresen a un fenotipo inactivo (171,172).

En este sentido, Vescarelli et al. (173) compararon la curación de heridas en cultivos primarios de fibroblastos de mucosa de revestimiento, y en la mucosa masticatoria. Investigaron el papel de los miofibroblastos los cuales expresan α SMA, así como el mecanismo de la autofagia, por medio de inmunofluorescencia, western blot y qRT-PCR. Los fibroblastos aislados de la mucosa de revestimiento mostraron niveles basales bajos de expresión de α SMA, lo cual corresponde a una baja cantidad de miofibroblastos, previo a la herida. Sin embargo, 24 horas después de infringir la herida fue evidente un aumento significativo en la expresión de α SMA. En contraste, los cultivos de hGF mostraron niveles basales más altos en la expresión de α SMA. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que señalan, que los hGF tienen una expresión constitutivamente elevada de α SMA en comparación con los hDF (174). Adicionalmente, los hGF después de la herida mostraron una disminución en la expresión de α SMA que no se había reportado previamente y, además, no mostraron modulación de las vías de autofagia.

En el mismo estudio, durante el proceso de reparación de la herida fue evidente en la mucosa de revestimiento un aumento en la producción proteínas fibróticas, tales como α SMA y Col1A1, así como la activación de las vías de autofagia. Por el contrario, en la mucosa masticatoria el proceso de autofagia no estuvo involucrado, lo que se traduce en la no diferenciación de miofibroblastos, ni la deposición de colágeno. Estos hallazgos explican el resultado de la curación de heridas sin formación de cicatriz de la mucosa masticatoria, sin embargo, aún falta aclarar más el papel del hGF o su fenotipo activado, el miofibroblasto durante la reparación de las heridas y la homeostasis de la

mucosa masticatoria. Para comprender su papel, es necesario caracterizar a fondo las poblaciones de fibroblastos de las mucosas bucales.

Es bien conocido que, el equilibrio entre el fenotipo de fibroblastos profibrótico y anti fibróticos es crítico para mantener la homeostasis extracelular. Se ha descrito, que los hLMF producen mayores cantidades de factor de crecimiento mitógeno de queratinocitos, y del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en comparación con los hDF, hecho que también puede explicar, porqué las heridas bucales se reparan de manera acelerada (175). El HGF tiene un efecto anti apoptótico debido a sus propiedades mitogénicas, motogénicas y morfogénicas. Además, *in vitro* el HGF participa en la curación de heridas e inhibe la EMT promoviendo la apoptosis de miofibroblastos. De esta forma, la respuesta mejorada en la cicatrización de heridas bucales está relacionada con la capacidad intrínseca de los hGF y queratinocitos para proliferar y migrar de una manera más eficiente en comparación con los hDF (176).

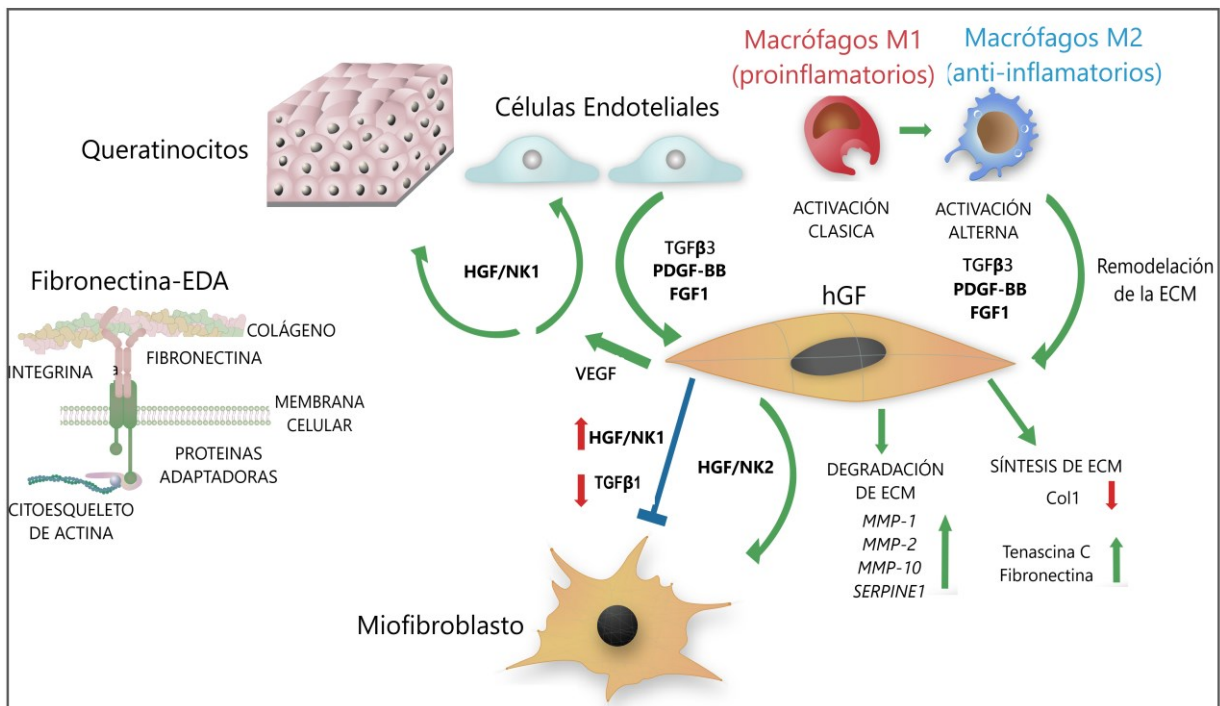
Al respecto, Dally et al. (177) identificaron una alta transcripción de HGF y de la isoforma NK1 (HGF-NK1), así como una mayor expresión de proteínas que promueven la proliferación y migración de los fibroblastos de las mucosas bucales en comparación con fibroblastos de la piel. El HGF-NK1 interactúa con el TGF β 1 para regular una respuesta antifibrótica, generando resistencia a la transformación miofibroblástica de los hGF. Por el contrario, la isoforma HGF-NK2 está implicada en la capacidad de transdiferenciación hacia el fenotipo miofibroblástico con potencial fibrótico, el cual tiene mayor expresión génica en fibroblastos de la piel.

En cultivo los hGF y los hDF presentan una respuesta proliferativa diferente a la inducción con el TGF β 1, que su vez se relaciona con diferencias en la producción de HA. El TGF β 1 regula la proliferación mediante la señalización de Smad3 en las dos poblaciones de fibroblastos, sin embargo, los hDF sintetizan mayores niveles de HA en comparación con los fibroblastos bucales (178). Adicionalmente, la producción de HA se relaciona con las enzimas HAS. La familia de genes *HAS* consta de tres homólogos genéticos (*HAS1*, *HAS2*, y *HAS3*), la caracterización de estas enzimas permitió identificar que los tipos *HAS1* y *HAS2* producen HA de alto peso molecular, importante para la adhesión celular y la inhibición de la proliferación celular. Por su parte, la enzima *HAS3* produce HA de bajo peso molecular, crítico para iniciar cascadas de señalización,

estimular la proliferación celular, la angiogénesis y la inflamación (141). Al respecto, Foote et al. (118) también identificaron una alta expresión de RNA de HAS3 en cultivos primarios de hGF. Esta enzima se expresa en diferentes tipos de células bien conocidas por su rápida proliferación celular al momento de la lesión, y la formación mínima de cicatrices, características de los hGF (179).

De forma similar, la investigación adelantada por Mah et al. (180) proporciona pruebas relacionadas con el fenotipo antifibrótico de los hGF durante la curación de heridas. En este estudio, compararon líneas celulares de hGF con líneas celulares de hDF provenientes de piel de mama y de piel abdominal en cultivos 3D. En estas condiciones, los hGF lograron contraer una red de Col más rápido que los hDF. Además, los hGF expresaron consistentemente niveles elevados de mRNA de MMPs involucradas en la regulación de la inflamación, y la remodelación de la ECM durante la curación de la herida. Por el contrario, los hDF mostraron una mayor expresión de mRNA de moléculas relacionadas con la síntesis de ECM, la señalización del TGF β , y de genes asociados con la contractilidad celular como α SMA debido a la transdiferenciación hacia el fenotipo miofibroblástico. Adicionalmente, los hGF expresaron niveles más bajos de la glucoproteína profibrótica de transmembrana CD26/*DPP4* que los hDF (181). En la Figura 3. se resumen la expresión de factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas de los hGF, que se relacionan con la capacidad plausible de reparar las heridas sin cicatriz en la mucosa masticatoria.

En conclusión, los hGF exhiben características altamente especializadas relacionadas con un fenotipo celular antifibrótico durante la curación de las heridas, además tienen la capacidad de interactuar con una ECM más rígida en comparación con los fibroblastos de la piel de diferentes sitios anatómicos, incluyendo la mucosa de revestimiento. Adicionalmente, los hGF expresan mecanismos de señalización auto y paracrinos, así como funciones inmunomoduladoras que promueven la sinergia de sus características anti fibróticas.

Figura 3. Características del fenotipo antifibrótico de los hGF

Nota. La expresión alta de HGF y su isoforma NK1 genera resistencia de la transdiferenciación de hGF al fenotipo miofibroblasto mediado por TGFβ. El HGF secretado por los hGF es mitogénico, morfogénico, anti-apoptótico y proangiogénico para las células epiteliales y endoteliales de la mucosa masticatoria. TGFβ3 es un factor antifibrótico y proangiogénico. Una menor expresión de MMPs regula la expresión de moléculas anti-fibróticas de la ECM durante la cicatrización de heridas. Los hGF expresan constitutivamente αSMA.

A lo anterior, se suman las recientes investigaciones que sugieren la presencia de poblaciones heterogéneas de fibroblastos en las mucosas bucales, hecho que cobra importancia con el fin de comprender su biología, y su potencial en la medicina regenerativa. En la Tabla 1. se presenta una sinopsis de las principales características fenotípicas, y funcionales descritas para los hGF.

Tabla 1. Características fenotípicas y funcionales de los hGF

Característica	Fenotipo hGF
Origen	Neuroectodermo - Células de la cresta neural (CCN).
Matriz Extracelular	Alta expresión de fibronectina, fibronectina ED-A y sulfato de condroitina, y menor expresión de elastina en relación con la dermis. Alta expresión de la enzima HAS3.
Marcadores de membrana	Negativos para CD 26/DPP4, positivo en fibroblastos pro-fibróticos.
Contractilidad y capacidad migratoria.	Expresión constitutiva de α SMA. Gran capacidad migratoria.
Adhesoma	Expresión reducida de ITG α 2 y α 4 pro-adhesivas. Reducción de la expresión de FAK, proteína total FAK y de adherencias focales. Plasticidad para adaptarse a la rigidez del sustrato.
Mecanotransducción	Baja respuesta al estrés mecánico.
Expresión factores de crecimiento y citocinas.	Expresión reducida de endotelina-1 (ET1). Aumento de la expresión de la isoforma HGF-NK1.
Respuesta a TGβ-1	Resistencia a la diferenciación miofibroblástica inducida por TG β 1.

4.11. Capacidad inmunológica e inmunomoduladora de los hGF

Actualmente se sabe que no solo las células inmunes, sino también las células no inmunes, como los fibroblastos y los queratinocitos, contribuyen a la inmunidad innata a través de la activación y expresión de los receptores tipo Toll (TLR, por su sigla en inglés). Estos receptores inducen una respuesta inflamatoria robusta caracterizada por la secreción de citoquinas y quimiocinas inflamatorias junto con el reclutamiento, y activación de células inflamatorias para controlar la infección, y restaurar la homeostasis; eventos que permiten la reparación y regeneración de tejidos (182).

Los TLR pertenecen a una familia de receptores intracelulares unidos a la membrana celular, que interactúan con el receptor CD14 e inducen la señalización intracelular como la primera línea de defensa contra agentes infecciosos. Llama la

atención que TLR1 a TLR9, MD2, MyD88, NOD1 y NOD2 se expresan constitutivamente en hGF. Además, los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y MD2 se expresan en la superficie celular, mientras que, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MyD88, NOD1 y NOD2 se expresan en las membranas de los compartimentos intracelulares (183).

De otro lado, el estudio adelantado por Linard et al. (184), asoció el potencial regenerativo de los hGF, con su la capacidad para remodelar la ECM, producir factores de crecimiento, e inducir la polarización de los macrófagos M1 al fenotipo M2. Como ya se sabe, los macrófagos M2 una vez reclutados en la herida promueven la angiogénesis, expresan VEGF y TGF β 3 estimulando la regeneración de los tejidos.

Igualmente, se ha descrito que las funciones inmunosupresoras de los hGF relacionadas con la curación y la capacidad de regeneración de la mucosa masticatoria son similares a las de las MSC. Séguie et al. (185) identificaron que los hGF tienen la capacidad de interferir con la diferenciación de las células dendríticas *in vitro*. Estas células son importantes para establecer la respuesta inmune a través de la IL6 y el VEGF, lo que puede conducir a un estado de tolerancia asociado con un aumento de las células T reguladoras con actividad supresora. Por lo anteriormente expuesto, las propiedades inmunomoduladoras de los hGF también posiciona a estas células como un recurso alternativo, e innovador para ser implementado en los enfoques de medicina regenerativa como se describe a continuación.

4.12. Potencial regenerativo de los fibroblastos gingivales humanos

Los fibroblastos gingivales humanos se han introducido en el desarrollo de terapias avanzadas, principalmente en el campo de la regeneración del tejido periodontal debido a su capacidad proliferativa, migratoria y antifibrótica.

Milinkovic et al. (186) llevaron a cabo un ensayo clínico para tratar las recesiones gingivales únicas y múltiples, por medio de un dispositivo diseñado a partir de TE. Los investigadores cultivaron hGF autólogos sobre una plataforma de Col, que posteriormente fue injertada en áreas afectadas por la pérdida de inserción, obteniendo excelentes resultados. El uso de los hGF autólogos se asoció con propiedades

regenerativas ideales, tiempo quirúrgico reducido, y una menor morbilidad del paciente con efectos estéticos óptimos.

Siguiendo esta línea, Boink et al. (187) también emplearon el enfoque de la TE, e informaron el desarrollo de un sustituto gingival *in vitro*. Los investigadores lograron reconstruir la mucosa gingival humana a partir de una biopsia. Las células epiteliales fueron aisladas, y posteriormente expandidas sobre una plataforma poblada por hGF autólogos los cuales constituyeron su propia "lámina propia", por lo tanto, el sustituto gingival era histológicamente similar al tejido nativo. Al caracterizar el constructo identificaron mayores cantidades de IL6 y CXCL8 citocinas relacionadas con mitogénesis, motogénesis y quimiotaxis, y del HGF un factor de crecimiento anti fibrótico que en un sustituto dérmico desarrollado en las mismas condiciones, así como una capacidad superior del primero en la curación de heridas. Es importante mencionar, que el sustituto gingival se fabricó teniendo en cuenta las pautas actuales de la regulación de la Unión Europea para los Medicamentos de Terapias Avanzadas (ATMP), hecho que puede facilitar su implementación terapéutica.

Por su parte, Woloszyk et al. (188) demostraron que tanto los hGF como las células madre de la pulpa dental humana tienen la misma capacidad de atraer vasos sanguíneos cuando se utilizan en estrategias de TE. Igualmente, Um et al. (189) propusieron el cocultivo de hGF y de células endoteliales vasculares como una estrategia innovadora para la prevascularización en TE gingival. Esto es posible debido a los efectos proangiogénicos inducidos por la secreción de TGF β 1, VEGF y FGF2, así como a la capacidad de sintetizar ECM específicamente Col1 y Col3 por parte de los hGF. Por lo tanto, este es un enfoque prometedor para el diseño de injertos microvasculares autólogos.

En relación con la terapia celular y los hGF, Linard et al. (184) lograron promover la reparación rápida de la piel en quemaduras inducidas por radiación utilizando hGF. En este caso, se comparó la capacidad regenerativa de los hGF y las MSCs de médula ósea humana, en un modelo murino mediante el trasplante por inyección intradérmica. Los hGF indujeron el desarrollo de la epidermis, los apéndices de la piel y los folículos capilares de manera más rápida en comparación con las células madre de médula ósea.

La rápida regeneración de los tejidos y la acelerada curación asociada a los hGF implica la reorganización del Col sintetizado, la modificación del equilibrio Col/MMPs/TIMPs y la modulación de la expresión y localización de TNC. A esto se añade la producción de los factores de crecimiento inmunomoduladores: VEGF, EGF y FGF7. Adicionalmente, los hGF sobreexpresaron la proteína activadora de fibroblastos (FAP) y la proteína S100A4, que participan en la activación de fibroblastos, junto con TGF β 2 que es esencial para la morfogénesis, y la regeneración del folículo piloso. Particularmente, los hGF en las condiciones descritas sobreexpresaron Noggin aproximadamente 26 veces más, favoreciendo así la regeneración del pelo, y posiblemente la proliferación celular y la permanencia de los fibroblastos en la herida en comparación con las células madre de medula ósea. Estos resultados sugieren, que los hGF son un recurso adecuado para la medicina regenerativa, sumado a su fácil proceso de recolección y cultivo.

Igualmente, el uso de sustancias bioactivas, se considera un área de gran interés clínico. Estas pueden influir en el comportamiento de los hGF actuando como adyuvantes en los procesos de curación y/o regeneración de las heridas de los tejidos blandos. En este sentido, Kobayashi et al. (190) compararon el efecto del PRP en los hGF, osteoblastos y células del ligamento periodontal *in vitro*. Los resultados preliminares mostraron que el PRP promovió la migración, la proliferación y la expresión de mRNA de moléculas relacionadas con la curación de heridas como el TGF β , el PDGFB y Col1A2 en los hGF, además, favoreció la regeneración de los tejidos blandos. Sin embargo, encontraron muy poco efecto sobre la diferenciación de osteoblastos y células del ligamento periodontal, así como en la formación de tejido óseo.

En la investigación adelantada por Asparuhova et al. (191) se logró demostrar en cultivos 3D, que el tratamiento de los hGF con HA desencadenó vías de señalización, a través de la activación de Akt, Erk1/2 o la quinasa p38, así como la expresión de genes *COL3A1* y *TGF β 3*, que caracterizan la curación de heridas sin cicatrices. Además, reportaron la sobreexpresión de genes que codifican los factores de crecimiento PDGFB, FGF2 y EGF esenciales para el proceso de curación de heridas, y la inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias. El HA también es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria celular y la expresión génica directa de MMPs como MMP-1 y MMP-8, o la expresión génica indirecta de MMP-2 y MMP-3 mediante la inducción de

citocinas proinflamatorias. Esto genera la remodelación de la ECM y facilita la regeneración de los tejidos periodontales, sin embargo, se requiere más investigación y seguimiento a largo plazo para evaluar la eficacia clínica del HA y otras sustancias bioactivas que pueden apoyar o mejorar la actividad biológica intrínseca de los hGF.

También, es importante mencionar que las iPSC se han generado a partir de la reprogramación de hGF mediante la expresión ectópica de los factores de transcripción Yamanaka: *Oct4*, *Sox2*, *Klf-4* y *c-Myc* (192,193). Igualmente, las iPSC se ha generado combinando otros factores de transcripción, tales como el factor de transcripción, proteína dedo de zinc tipo Krüppel relacionada con GLI (*Glis1*), la proteína dedo de zinc 296 (*Zfp296*) y la proteína dedo de zinc del cerebelo 3 (*Zic3*), entre otros factores que también pueden mejorar la eficiencia de reprogramación (194-196). Siguiendo esta línea de investigación, Ji et al. (197) reprogramaron hGF en iPSC humanas (hiPSC) con los factores de transcripción Yamanaka, posteriormente implementaron una plataforma de quitosan/gelatina/ nano hidroxiapatita con el fin de inducir la diferenciación osteogénica en ratones inmunosuprimidos. Las hiPSC derivadas de los hGF demostraron tener una mejor capacidad de diferenciación osteogénica frente a los hGF. Lo anterior sugiere, que la reprogramación de hGF a hiPSC puede ser un tipo de enfoque para aumentar la capacidad de diferenciación osteogénica, sin embargo, aún se requiere más investigación.

Otra aplicación de los hGF es la servir como células alimentadoras en cultivos de iPSC a largo plazo, preservando su cariotipo, y pluripotencia normales. Al respecto, Yu et al. (198) compararon hGF, hDF y la línea celular SNL derivada de ratón, como células alimentadoras para células iPSC reprogramadas a partir de hGF. Los resultados dejaron en evidencia, que los hGF tienen la capacidad de sintetizar mayor cantidad de laminina 332, y la cadena de laminina $\alpha 5$, la cual forma parte del nicho de las células madre pluripotentes del embrión humano, además generaron factor de crecimiento similar a la insulina -2. Estas biomoléculas han demostrado mantener la renovación a largo plazo de las células madre, y simultáneamente contribuyen a mejorar a las células alimentadoras. Los resultados del estudio, también sugieren, que los hGF poseen una excelente capacidad de alimentación en cultivo y, por lo tanto, pueden emplearse como alternativas a las células alimentadoras convencionales SNL, siendo mejores candidatos para la

expansión *ex vivo* de hiPSC, sin la presencia de componentes animales, condición importante para futuras aplicaciones terapéuticas.

Adicionalmente, Matsuda et al. (26) informaron acerca del uso de hGF como células alimentadoras para las células madre pluripotentes inducidas a cardiomiocitos y su capacidad para promover la diferenciación hacia el fenotipo cardiomiocito de forma exitosa.

4.12.1. Fibroblastos gingivales humanos en la regeneración del tejido óseo

Algunos estudios como el de Choi et al. (199) y Ghuman et al. (200) cuestionaron la capacidad de diferenciación osteogénica de los hGF. Sin embargo, varias investigaciones han logrado demostrar que estas células en condiciones experimentales apropiadas se pueden diferenciar, y adquieren un fenotipo osteogénico *in vitro* (201–203). Por ejemplo, Bermúdez et al. (204) informaron la diferenciación de hGF hacia el linaje osteogénico, a través de la transfección de *CEMP1* un gen clave en la regulación del proceso de biomineralización, que promueve la diferenciación celular, y regula la tasa de deposición, composición y morfología de los cristales de hidroxapatita. Sin embargo, los estudios funcionales mostraron que *CEMP1* puede actuar como un oncogén, por lo tanto, esta estrategia requiere más estudio.

Por su parte, Cho et al. (205) y Cho y Ryoo (206) demostraron la transdiferenciación *in vitro* de los hGF a un tipo celular osteogénico, a través de mecanismos epigenéticos. Primero, indujeron la hipometilación del DNA por medio de la 5 aza 2 'desoxicitidina (5-aza-dC), y posteriormente realizaron tratamiento con BMP2 con el fin de estimular la expresión de los genes *RUNX2* y *ALP*. Con este enfoque lograron la formación de hueso nuevo en un modelo murino, además, plantearon el mecanismo epigenético como un enfoque terapéutico novedoso, y a los hGF como un recurso prometedor para la regeneración del tejido óseo.

Otro estudio, que utilizó hGF para inducir la regeneración de tejido óseo, fue el adelantado por Wu et al. (207) en un ensayo clínico en animales. En él informan a cerca de la regeneración completa de los tejidos periodontales (cemento, hueso alveolar, y ligamento periodontal) utilizando como recurso fibroblastos gingivales autólogos, e

induciendo su transdiferenciación a un fenotipo mineralizante en presencia de un tampón de inducción de mineralización. Emplearon la técnica de sándwich: ubicaron una membrana periodontal, entre dos membranas mineralizadas fabricadas completamente con fibroblastos gingivales, el dispositivo de TE posteriormente fue ubicado en los defectos óseos. De esta manera, lograron una reconstrucción periodontal que describieron como ideal y rápida.

Un enfoque diferente se abordó en el estudio de Voisin et al. (208). En este caso, los investigadores proponen un posible mecanismo paracrino de los hGF para regular la osteoclastogénesis *in vitro*, al inducir una menor expresión de los genes *CTR*, *CATK*, *TRAP* y *OSCAR* relacionados con los osteoclastos. Estos genes estimulan simultáneamente la inmunidad innata, mediante la inducción de la expresión de marcadores de células presentadoras de antígeno CD14 y proteínas estimulantes CD40, CD80 y CD86, y la posterior diferenciación a un fenotipo de macrófagos. Los efectos reguladores de la osteoclastogénesis, al parecer están mediados por la osteoprotegerina secretada por los hGF. De esta forma, los investigadores plantearon la posibilidad de preservar el hueso alveolar de la reabsorción. A pesar que, utilizaron un modelo xenogénico de hGF en cocultivo con células murinas de medula ósea las moléculas que intervienen en la formación de osteoclastos se conservan evolutivamente, por lo tanto, pueden ser comparables dentro de la especie. Sin embargo, el efecto paracrino de los hGF asociado a la reducción de la osteoclastogénesis, también requiere de mayor investigación.

Por su parte, Almela et al. (209) desarrollaron un modelo biomimético de osteomucosa. Realizaron el cocultivo de hGF, queratinocitos y osteoblastos alveolares primarios en una plataforma de hidroxiapatita/fosfato tricálcico en un biorreactor. Con esta aproximación lograron replicar las características anatómicas de los tejidos de origen, así como la relación a nivel histológico entre la mucosa y el hueso subyacente. Los hGF formaron una lámina propia densamente poblada con fibroblastos residentes, y el Col1 mostró el nivel de expresión de mRNA más alto, entre los genes evaluados. Estos hallazgos fueron relacionados con un aumento significativo en la concentración de proteína, y se atribuyeron a los hGF por su papel en la formación de ECM, además, de la inducción paracrina de las células epiteliales para proliferar, migrar, y expresar

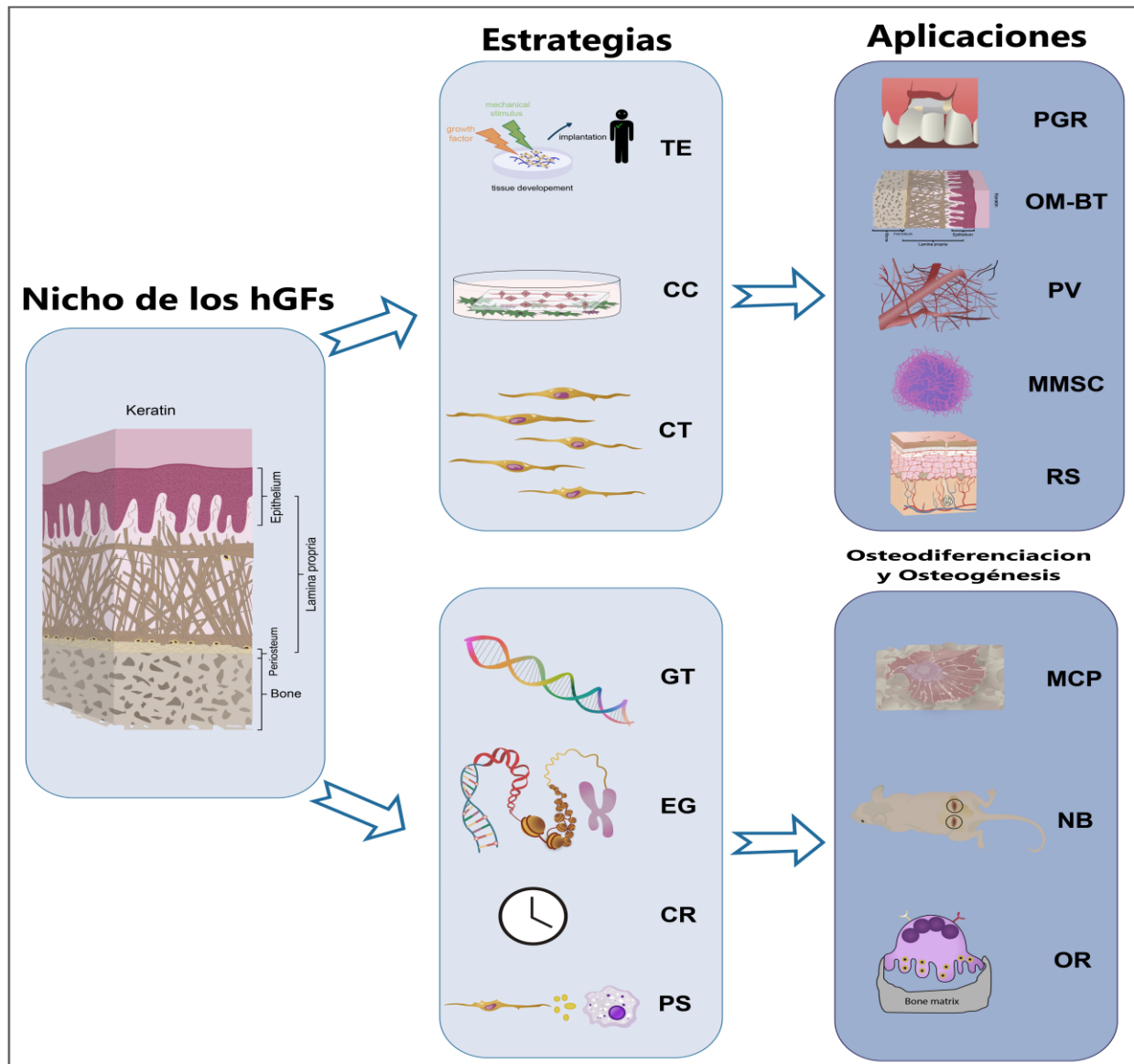
queratina. Este estudio demostró que los hGF son un recurso celular clave en cocultivo, y que tienen un gran potencial en el desarrollo de dispositivos para la TE, y la terapia celular. En la Figura 4. se presentan las estrategias de terapias avanzadas, así como las aplicaciones con base en hGF que se han desarrollado hasta el momento.

Finalmente, un ensayo clínico aleatorizado reciente mostró que el injerto de hGF autólogos cultivados sobre una plataforma de fosfato beta-tricálcico (β -TCP, por su sigla en inglés), que posteriormente fue cubierta con una membrana de colágeno, redujo significativamente el defecto óseo vertical, y la pérdida de inserción gingival, con una ganancia ósea radiográfica que fue estadísticamente mayor cuando se comparó con el grupo control (29). En otro ensayo clínico similar, se cultivaron hGF autólogos sobre una matriz de colágeno, este constructo de ET se injertó debajo de un colgajo avanzado coronalmente, para tratar recesiones gingivales únicas y múltiples. Con este enfoque, el grupo experimental mostró un mayor aumento en el ancho del tejido queratinizado, que el grupo control (30).

En general, las mucosas bucales representan un recurso de gran interés para los enfoques regenerativos. Específicamente, los hGF presentan varias ventajas, frente a otro tipo de células, debido a las características biológicas expuestas, a esto se suma, que se pueden obtener de los pacientes a través de procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos, sin causar problemas estéticos y/o funcionales. Adicionalmente, los hGF se pueden aislar de forma eficiente por el método de explante. Este método además de evitar el estrés proteolítico, es de bajo costo, y presenta menor riesgo de contaminación biológica (210).

Para la medicina traslacional es importante avanzar en la comprensión de la heterogeneidad funcional de los fibroblastos, con el fin de implementar enfoques terapéuticos efectivos y personalizados, utilizando la mejor fuente de células disponible para cada caso. La investigación en esta área es prometedora, ya que puede ofrecer resultados clínicos ideales en la regeneración de tejidos en casos de defectos craneofaciales de tamaño crítico a causa de malformaciones congénitas, recesión de tumores extensos o traumatismos, así como en casos de atrofia alveolar y osteonecrosis entre otras patologías.

Figura 4. Fibroblastos gingivales humanos y su potencial regenerativo



Nota. Microanatomía del nicho celular. Estrategias de terapias avanzadas que se han implementado en medicina regenerativa. Futuras aplicaciones. La TE, CC y CT se usan comúnmente en aplicaciones de medicina regenerativa. Las estrategias GT, EG, CR y PS se han centrado en la osteodiferenciación y osteogénesis, como MCP, NB y OR. Abreviaturas: TE, Ingeniería de tejidos; CC, cultivos asociados; CT, terapia celular; PGR, regeneración periodontal y gingival; OM-BT, tejido biomimético de osteomucosa; PV, prevascularización en ET gingival; MMSC, mantiene la multipotencia de MSC en el cocultivo; RS, Regeneración de la piel en modelo murino; GT, terapia génica; EG, reprogramación epigenética; CR, reprogramación celular; PS, señalización paracrina; MCP, inducción del fenotipo celular mineralizante de hGF; NB, nueva formación ósea en modelo murino; O, regulación de osteoclastogénesis.

4.13. Mecanotransducción celular

En conjunto, las señales mecánicas conforman sistemas de información indispensables para la supervivencia, la adaptación y la homeostasis celular. La mecanotransducción es el proceso por el cual las células convierten estímulos mecánicos del microambiente extracelular en señales bioquímicas intracelulares para inducir una amplia variedad de respuestas durante el desarrollo, la regeneración y la enfermedad (211).

Aunque está bien establecido que las señales biofísicas pueden regular una variedad de procesos celulares, como la morfología (212), la proliferación (213), la migración (214) y la diferenciación (215, 216), se desconoce el mecanismo exacto por el cual estas señales mecánicas se transducen al núcleo y regulan la expresión génica.

Las células perciben los cambios inducidos por las fuerzas mecánicas, por medio de varias estructuras que funcionan como mecanosensores, tales como: las adherencias focales, los complejos de unión célula-célula, los canales iónicos incluyendo el canal del calcio y la señalización mediada por lípidos a nivel de la membrana plasmática y su corteza de actina subyacente (217).

Por su parte, el citoesqueleto y los filamentos de actina, funcionan como un importante mecanotransmisor, al transferir las señales mecánicas al núcleo, a través del complejo LINC (enlazador del nucleoesqueleto y el citoesqueleto, por su sigla en inglés), el cual conecta la lámina nuclear con el citoesqueleto, y es fundamental en la regulación del comportamiento celular. El complejo LINC es el conducto principal para las entradas mecánicas del ECM al núcleo. Por lo tanto, la membrana nuclear, la cromatina y la lámina están estrechamente conectadas, y forman un material compuesto adaptable y topológicamente complejo que detecta y responde a las señales mecánicas como una unidad (218, 219).

La mecanotransducción nuclear activa circuitos enzimáticos o transcripcionales que median cambios de comportamiento, adaptación mecánica y decisiones sobre el destino celular (220). A través, de la propagación rápida de ondas, los filamentos de actina conforman las denominadas fibras de estrés, que se comportan como el principal

transmisor de una respuesta rápida a las señales mecánicas, lo que permite que las células se adapten rápidamente a los cambios dinámicos en su entorno. De tal forma, que las mecanorespuestas se consideran la sumatoria de la intensidad, frecuencia, magnitud y duración de las fuerzas percibidas por la célula, que pueden inducir desde la regulación de genes, o bien a un reajuste en la forma o en la trayectoria celular (221).

Al respecto, investigaciones recientes demuestran cómo el cultivo de hGF en diferentes sustratos con micro/nanotopografía variables, así como la exposición a varios tipos de fuerzas mecánicas, afecta comportamientos celulares tales como, la adhesión, la proliferación y regulación de la expresión génica (222 – 224).

Adicionalmente, la evidencia también muestra como la mecánica del sustrato en cultivos 3D induce una diversidad de respuestas, tales como la supresión de la proliferación de MSC con conservación de la multipotencia (225), e incluso, la reprogramación de MSC y de células somáticas como los fibroblastos (226 - 228), lo cual ha generado nuevos conceptos y paradigmas del cultivo celular 3D con un posible impacto en la regeneración de los tejidos, así como en la comprensión de la fisiopatología de múltiples enfermedades (229).

En la Figura 5 se presenta un resumen de las estructuras celulares que participan en la mecanosensición y mecanotransducción celular, así como ejemplos de los tipos de respuestas biológicas a las señales mecánicas de la ECM.

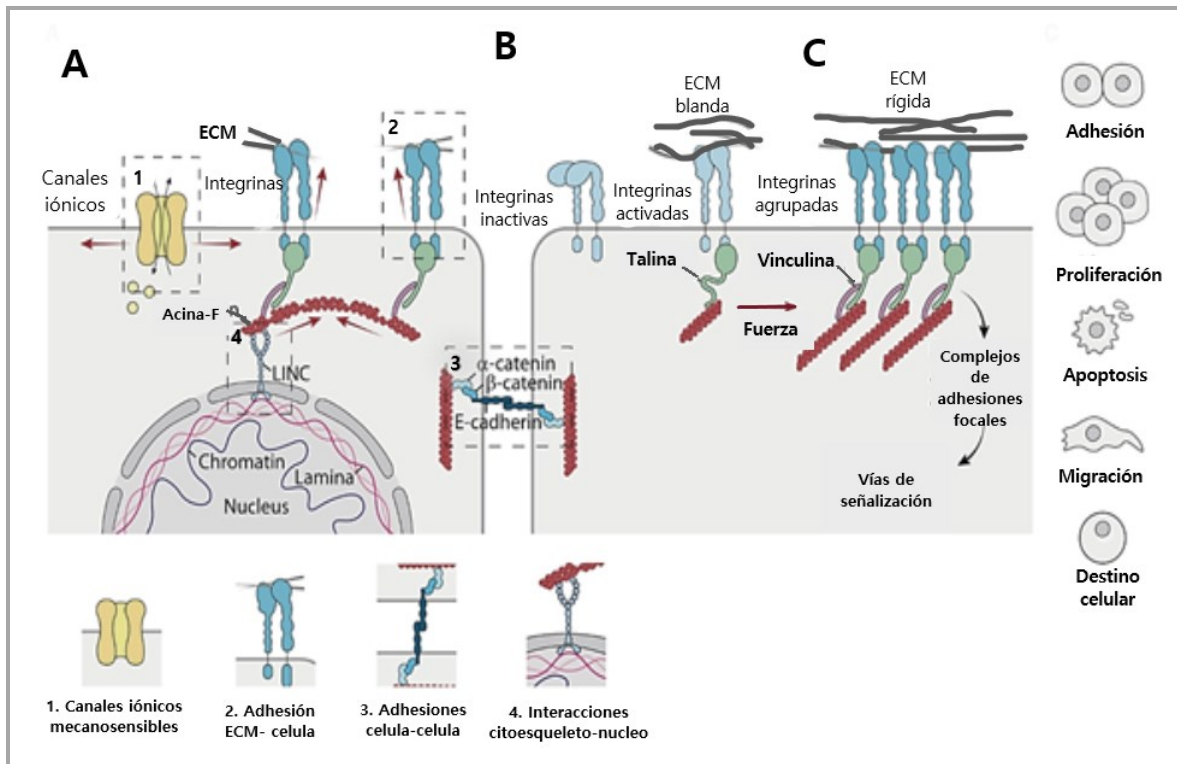
4.14. Reprogramación celular

La reprogramación celular convencional se define como el proceso de revertir el estado maduro o diferenciado de una células somática a un estado inmaduro y más pluripotente, por medio de varios enfoques que incluyen: la transferencia nuclear de células somáticas, la fusión celular, la expresión ectópica de factores de transcripción, la expresión de micro-RNAs y el uso de pequeñas moléculas de señalización (230 - 232).

Desde que se demostró que las iPSC se pueden generar a partir de fibroblastos utilizando los factores Yamanaka (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf-4*), se demostró, que las células somáticas experimentan una expresión génica dinámica, y alteraciones epigenéticas durante la reprogramación. Este hecho abrió la posibilidad de generar

cualquier tipo de célula a partir de una célula somática, primero reprogramándola a una etapa pluripotente inducida, y luego diferenciándolas hacia el tipo de célula diana, un proceso conocido como “diferenciación dirigida” (230, 233).

Figura 5. Mecanismo de mecanodetección y mecanotransducción celular



Nota. (A). Mecanosensores: canales iónicos mecanosensibles, integrinas asociadas a las adherencias focales, cadherinas en uniones adherentes y proteínas de membrana nuclear en interacción con el citoesqueleto. (B). Las células traducen estas señales mecánicas en señales bioquímicas que provocan una respuesta biológica a través del proceso de mecanotransducción. La ECM induce respuestas a través de las adherencias focales, la activación inicial y la unión de las integrinas a la ECM pueden ocurrir en presencia de fuerzas de baja resistencia (ECM blanda), lo que lleva a la formación de un complejo focal transitorio, donde el dominio intracelular de la integrina se une débilmente a la actina-F. En presencia de fuerzas de alta resistencia (ECM rígida), el reclutamiento de proteínas adaptadoras promueve la agrupación de integrinas, la remodelación de actina y la contracción mediada por miosina para aumentar la tensión celular interna. Múltiples mecanismos contribuyen a regular las vías de señalización que median las respuestas biológicas a las señales mecánicas de la ECM. (C). Las señales de la ECM influyen en las adherencias célula-célula, regulan la proliferación y la apoptosis, dirigen la migración celular y alteran el destino celular. Adaptado de Hayward MK, et al. (217).

Adicionalmente, “la reprogramación directa” surge como un método para manipular la plasticidad celular a estados intermedios, el cual consiste en la conversión directa de una célula madura en un tipo de célula completamente diferente sin pasar por la etapa pluripotente intermedia. Este enfoque emplea la sobreexpresión forzada de una combinación de factores de transcripción específicos de linaje y/o condiciones de cultivo definidas para cada tipo de célula diana, este proceso se denominó inicialmente “transdiferenciación celular”. La reprogramación directa suele ser un procesos más corto y sencillo en comparación con la reprogramación a iPSC seguida de la rediferenciación, y elude la potencial formación de teratoma típicamente asociado con la etapa pluripotente intermedia de las iPSC, por lo tanto, se puede considera un enfoque más seguro para aplicaciones en medicina regenerativa (234).

Asi mismo, la generación de iPSC enfrenta otra serie de problemas relacionados con el grado de reprogramación, la memoria epigenética y la inmunogenicidad (235). En particular, se ha demostrado la presencia de variaciones genéticas en las iPSC, incluida la inestabilidad del genoma, las variaciones de un solo nucleótido, la variación del número de copias y la pérdida de heterocigosidad. Estas mutaciones pueden ser heredadas de las células parentales, o adquiridas durante el proceso de reprogramación, incluso pueden ser inducidas durante el cultivo prolongado *in vitro* (236). La reprogramación celular busca superar estos problemas, por medio de estrategias que aumenten la eficiencia de reprogramación y obvien la necesidad de la transducción viral, por esta razón, en la actualidad se investigan la manipulación de factores físicos y el diseño de materiales de cultivo celular, es decir, por medio de la mecanomodulación del estado epigenético de las células inducir la reprogramación parcial o completa (237).

Como ya se mencionó, las propiedades del microambiente celular desempeñan un papel importante en la regulación de la identidad celular, a través de cascadas de mecanotransducción que, en última instancia, afectan la forma y la estructura nuclear y, por ende, el estado epigenético. Factores biomecánicos en el microambiente, tales como, la nanotopografía, la rigidez del sustrato, la viscoelasticidad, la presentación de ligandos, así como la geometría celular y tisular, juegan un papel crucial en la inducción del destino celular (238). Por ejemplo, Polo et al. (239) demostraron que los genes responsables de la organización del citoesqueleto se activan durante los primeros tres días de

reprogramación dirigida, y simultáneamente, la cromatina se somete a una reorganización importante, que conduce a cambios proteómicos complejos y coordinados que facilitan el proceso. De esta forma, tanto las alteraciones del citoesqueleto y las modificaciones epigenéticas son eventos críticos que marcan el inicio de la reprogramación (240).

También, se ha documentado cómo las señales de la topografía del sustrato promueven la transición mesenquimal-epitelial (MET, por su sigla en inglés), proceso fundamental para la reprogramación nuclear, además, de la reprogramación hacia iPSC al inducir cambios en la morfología celular, y un aumento en la acetilación de histonas y la metilación de H3K4, respaldando, el vínculo entre las señales biofísicas con la actividad de enzimas específicas que modifican las histonas (241, 242).

Por lo tanto, ahora se reconoce claramente, que las señales topográficas inducen vías de señalización, que modifican la dinámica de la cromatina, a través del del citoesqueleto, la forma y la estructura nuclear sin la necesidad modificadores epigenéticos exógenos (238, 243), y se considera que incorporar biomateriales durante las estrategias de reprogramación nuclear convencionales es un enfoque plausible para optimizar y mejorar la eficiencia de la reprogramación (244, 245).

Recientemente, varias investigaciones han demostrado que el cultivo 3D actúa como una herramienta de reprogramación capaz de revertir las células diferenciadas a un estado más indiferenciado, en ausencia de factores de reprogramación exógenos. Adicionalmente, sugieren que los mecanismos de mecanotransducción, la MET, la hipoxia, y los cambios epigenéticos como respuesta a la reorganización celular en condiciones de cultivo 3D están involucrados en el proceso de reprogramación celular (34, 35, 228, 246).

Una de las primeras investigaciones en demostrar la reprogramación celular via biomecánica, es la de Roy B, et al. (247), en este caso demostraron que el cultivo de fibroblastos NIH3T3 en un sustratos de FN con micropatrones resulto en el confinamiento lateral de las células y la formación esferoides. El cultivo 3D indujo cambios en el estado epigenético, que resultaron en la reprogramación de los fibroblastos en células similares a iPSC con una eficiencia alta, y sin el uso de factores exógenos. Los genes mesenquimales se reprimieron de manera importante a partir del día 6 de cultivo,

mientras que los genes relacionados con células madre embrionarias (ESC, por su sigla en inglés) e iPSC se expresaron el día 10, adicionalmente, las células demostraron potencial de diferenciación multilíneaje. El análisis por RNA-seq mostró que los fibroblastos reprogramados presentaban características similares a las de las células madre, pero mantenían su estado de diferenciación hasta cierto punto, revelando un cambio en el transcriptoma, de un estado fibroblástico a un estado de reprogramación intermedia, por lo tanto, se consideraron células parcialmente reprogramadas.

Posteriormente, el proceso de rediferenciación de los fibroblastos en una matriz de colágeno evidencio, que las células parcialmente reprogramadas eran más contráctiles y eficientes en la síntesis de componentes de la ECM al compararlas con los fibroblastos iniciales (248). Finalmente, los investigadores demostraron que el microambiente mecánico local del cultivo 3D puede activar transiciones del estado celular a través de vías de señalización dependientes de Lef1, por lo tanto, se consideró un factor de transcripción somático crítico para la regulación mecánica de las vías de desdiferenciación de fibroblastos en ausencia de factores exógenos (249).

Así mismo, Li et al. (246) cultivaron células derivadas de la mucosa bucal y palatina de ratones, en placas de ultrabaja adherencia sin factores exógenos. Las células formaron esferoides espontáneamente a las 24 horas, los cuales expresaron genes asociados a la pluripotencia: *Sox2*, *SSEA1*, *Oct4*, *Nanog* y *Nestin*, adicionalmente en condiciones adecuadas presentaron diferenciación neurogénica, demostrando así, la capacidad que tiene el cultivo 3D de inducir reprogramación celular.

Finalmente, Lo et al. (228) investigaron la capacidad de los fibroblastos dérmicos humanos del antebrazo, y de la punta de la cola de ratón, para expresar genes asociados a células madre en cultivo 3D. Para tal fin, cultivaron fibroblastos en 2D, y en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo en U recubiertas de hidrogel durante 7 días, y compararon por medio qRT-PCR, RNA-seq y bioinformática el perfil de expresión génica de las células en las dos condiciones de cultivo. Concluyeron, que el transcriptoma de las células en condiciones de cultivo 3D se asemejaba a las células somáticas que se reprograman en células madre, incluyendo la expresión de genes asociados con pluripotencia (*Oct4*, *Sox2*, y *Nanog*), así como una mayor expresión de genes asociados con la MET y disminución de la expresión de genes asociados a la EMT.

El campo de la reprogramación de células somáticas via biomecánica, es un área de investigación emergente, sin embargo, la evidencia acumulada demuestra, que el cultivo 3D induce reprogramación celular parcial o total como respuesta al microambiente del cultivo, procesos a los cuales se refiere la presente investigación. Adicionalmente, el hecho que el cultivo 3D no requiera la aplicación de genes, RNA o proteínas exógenas, para inducir la reprogramación celular, lo convierte en una estrategia más segura para los enfoques de medicina regenerativa, por lo tanto, caracterizar esferoides formados a partir de células somáticas humanas permite valorar su potencial para aplicaciones de medicina regenerativa.

4.15. Cultivo celular tridimensional

El cultivo celular es un componente fundamental de la TE, y la terapia celular para el crecimiento y mantenimiento de células *ex vivo*. Los cultivos celulares bidimensionales o en 2D han sido el método utilizado para cultivar células desde hace mucho tiempo, sin embargo, no proporcionan un entorno similar al *in vivo* donde se generan señales físicas, comunicación célula-célula y célula-ECM, así como la interacción de diferentes tipos celulares (Figura 6A). En contraste, los sistemas de cultivo celular 3D se utilizan cada vez más principalmente porque imitan el entorno fisiológico de los tejidos (250).

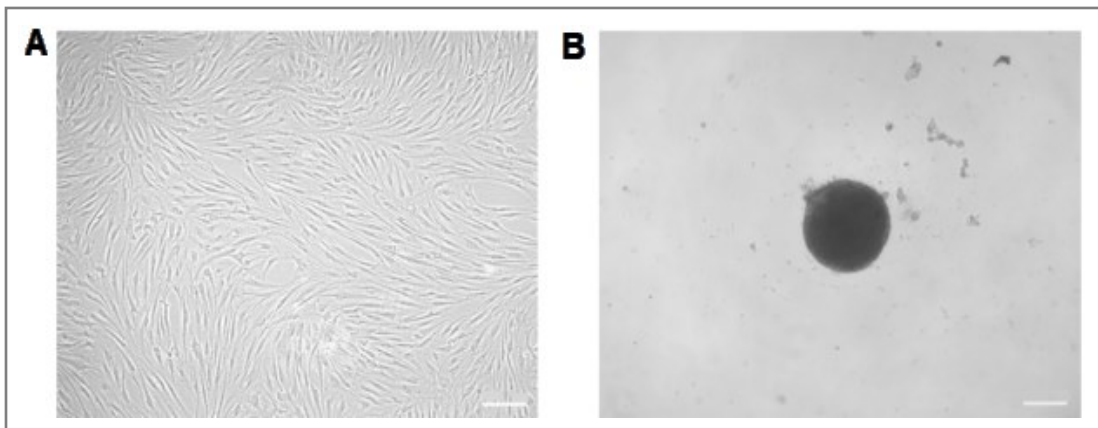
En condiciones de cultivo 3D las células se organizan en agregados densos denominados esferoides celulares, que se forman cuando las células exhiben una cohesión preferencial con otras células sobre la adhesión a la matriz subyacente. Las células dentro de los esferoides están expuestas a interacciones físicas, que reflejan más fielmente el comportamiento en tejido nativo tridimensional (Figura 6B) (251). Entre las diferencias más significativas del cultivo celular 2D y 3D se pueden mencionar las siguientes:

- Preserva la forma natural de la célula debido a que crecen en agregados tridimensionales, o esferoides que contienen múltiples capas de células.
- Las células están sujetas a transporte de masa por difusión, lo que conduce a un patrón de distribución espacial heterogéneo de oxígeno, nutrientes, metabolitos y

moléculas de señalización dependientes del metabolismo intrínseco de cada tipo celular.

- Las uniones celulares son estrechas, y facilitan la comunicación célula a célula, a través de intercambio de iones, moléculas pequeñas y campos electromagnéticos.
- El medio ambiente induce señales biomecánicas que alteran la expresión génica, y promueven la síntesis, secreción y ensamblaje de proteínas de la ECM en respuesta a la organización tridimensional en el cultivo (252).

Figura 6. Cultivo en monocapa y cultivo 3D de fibroblastos gingivales CL+/-P NS



Nota. (A). Cultivo en monocapa de hGF sobre superficie de poliestireno. (B). Cultivo 3D de hGF con la técnica de superposición de líquidos sobre una plataforma de agarosa. Escala 200 μ m. Aumento 5X

Como resultado de la organización tridimensional, los esferoides exhiben mejores propiedades biológicas y regenerativas en comparación con los sistemas de cultivo 2D, estas propiedades incluyen mayor viabilidad celular, morfología estable y polarización (210, 250), mayor actividad proliferativa y de la función metabólica fisiológica, mejor regulación de señales adaptativas a la hipoxia, secreción de moléculas anti-apoptóticas, angiogénicas y antiinflamatorias, y de preservación de componentes de la ECM, así como la capacidad de diferenciación multilíneaje dependiendo de las condiciones de cultivo. En general, los esferoides poseen cualidades deseables para aplicaciones en TE (253 - 255).

En la actualidad, los esferoides celulares se aplican en diferentes campos de la investigación, tales como la fabricación de tejidos artificiales tridimensionales *in vitro*, en estudios de desarrollo de órganos, en el estudio de enfermedades congénitas como

modelos para dilucidar los mecanismos relacionados con diferentes tipos de patologías. También se les considera herramientas valiosas en la investigación del cancer, la infectología, la toxicología, y la biología de células madre, así como para el estudio de enfermedades hereditarias (256).

Las principales ventajas de los cultivos 2D frente a los cultivos 3D, así como de las posibles desventajas, y consideraciones que se deben tener en cuenta al momento de seleccionar el tipo de cultivo se sintetizan en el Tabla 2.

4.16. Sistemas de cultivo tridimensionales

Las técnicas de cultivo 3D incluyen sistemas de cultivo sin plataformas o independientes del anclaje tales como: microplacas colgantes, fuerzas mecánicas externas (campos eléctricos, magnéticos, ultrasonido, levitación magnética), biorreactores rotatorios, sistemas microfluídicos, cultivo de pellets y microplacas con recubrimiento de fijación ultra baja (257, 258).

A su vez, los cultivos 3D emplean plataformas fabricadas a partir de una amplia gama de materiales tanto naturales, como sintéticos. Los biomateriales naturales a menudo se basan en componentes de la ECM, como el Col, la fibrina y el HA, también pueden incluir otros materiales de origen natural como gelatina, seda, alginato, y agarosa. Estos materiales son biocompatibles y contienen sitios de adhesión celular, además, son biodegradables, pero con propiedades mecánicas limitadas. Con el uso de materiales sintéticos se logra un control adecuado de las propiedades mecánicas, y de la arquitectura de los constructos. Los materiales comúnmente utilizados son metales, biocerámicas, vidrio, vitrocerámicas, polímeros sintéticos, y mezclas de compuestos. Además del soporte mecánico, los materiales sintéticos promueven el crecimiento simultáneo de tejidos, y pueden entregar diferentes moléculas, como factores de crecimiento, citocinas, iones bioactivos, genes, medicamentos y antibióticos con efecto terapéutico o que facilitan la regeneración (251, 259).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los cultivos 2D vs.3D

Características	Cultivo 2D	Cultivo 3D
Morfología celular	<ul style="list-style-type: none"> • Plana y alargada debido a que las células solo pueden crecer y expandirse en dos dimensiones. • Las células crecen en monocapa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se preserva la forma celular natural y el crecimiento celular. • Las células crecen en agregados o esferoides 3D. • Los esferoides contienen múltiples capas.
Exposición de células al medio	<ul style="list-style-type: none"> • Todas las células del cultivo reciben la misma cantidad de nutrientes y factores de crecimiento del medio en la placa. • Lo anterior hace que más células se encuentren en la misma etapa del ciclo celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los nutrientes no tienen que dividirse por igual entre todas las células, pero pueden dividirse si es necesario. • Las células centrales a menudo permanecen inactivas ya que reciben menos oxígeno y factores de crecimiento del medio. • Presentan mayor función metabólica, similar a la fisiológica.
Unión celular	<ul style="list-style-type: none"> • Las uniones celulares son menos comunes y representan con menos precisión las uniones <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las uniones celulares son comunes y permiten la comunicación célula - célula. • Las células se comunican a través de intercambio de iones, moléculas pequeñas y corrientes eléctricas.
Niveles de expresión	<ul style="list-style-type: none"> • La expresión de genes y proteínas a menudo es muy diferente al compararlos con los modelos <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los niveles de expresión de genes y proteínas se asemejan a los niveles encontrados en las células <i>in vivo</i>. • Aumenta secreción de factores tróficos
Diferenciación celular	<ul style="list-style-type: none"> • La diferenciación celular es pobre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las células están bien diferenciadas.
Proliferación celular	<ul style="list-style-type: none"> • Las células proliferan a un ritmo anormalmente rápido. • Se encuentran en estadios similares del ciclo celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las tasas de proliferación son reales y pueden ser altas o bajas según la técnica y los tipos de células que se cultivan. • Presentan diferentes estadios del ciclo celular.
Respuesta a estímulos	<ul style="list-style-type: none"> • Representación inexacta de la respuesta a los estímulos mecánicos. • Las células no pueden experimentar la gravedad ya que no pueden expandirse a la tercera dimensión. 	<ul style="list-style-type: none"> • Representación precisa de la respuesta a los estímulos mecánicos por parte de las células. • Las células pueden experimentar la gravedad dando una representación más precisa de una célula <i>in vivo</i>.
Uso y análisis	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente replicable y fácil de interpretar. • Indicado para cultivos a largo plazo 	<ul style="list-style-type: none"> • Los experimentos pueden ser difíciles de replicar. • Los datos pueden ser difíciles de interpretar, y requiere métodos especiales de análisis.

Nota. Adaptado de Jensen y Teng (252).

La técnica de superposición de líquidos, también llamada cultivo de suspensión estática es una de las metodologías más exploradas debido a su bajo costo, y fácil manejo para forma esferoides al inhibir la adhesión de las células en placas de cultivo adherente. Tanto los cultivos primarios como líneas celulares forman esferoides con esta técnica. Debido a que las uniones celulares-ECM se inhiben, las células forman espontáneamente esferoides por encima de la superficie no adherente, al promoverse la expresión de moléculas adhesivas célula-célula (260, 261). Este hecho se explica en

parte, por las diferencias en las propiedades físicas de los materiales que se emplean para el cultivo 3D; por ejemplo, el poliestireno tiene un módulo de Young de 3.000.000 kPa, mientras que, el módulo de Young de los hidrogeles de colágeno se encuentra entre los 0,01 a 6 kPa, y el de la agarosa esta entre los 5 a 100 kPa, condición que induce una respuesta de mecanotransducción específica de las células (211).

Otras ventajas que ofrece la agarosa son: el mantenimiento del cultivo celular a largo plazo y la facilidad de cambio de medio, baja variabilidad entre lotes, control sobre la rigidez del sustrato, la esterilización es fácil utilizando autoclave o la radiación con luz ultravioleta, el bajo costo, adicionalmente es un material biológicamente inactivo. Por lo tanto, se considera una técnica muy accesible como herramienta para el estudio de la biología celular (262, 263).

CAPITULO 2

5. Metodología general

En este capítulo se describe en forma detallada la metodología, los materiales y métodos empleados, así como los procedimientos que se utilizaron de forma rutinaria en los diferentes ensayos de la fase experimental. Por lo tanto, en cada uno de los capítulos siguientes se incluyen los materiales y métodos específicos.

5.1 Enfoque metodológico

El enfoque metodológico de la investigación es cuantitativo, y se realizó un estudio de tipo experimental descriptivo *in vitro*.

5.2. Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de CL₊P NS, que requerían la primera cirugía reconstructiva, y que asistieron a la Fundación Clínica Noel en el periodo comprendido entre julio de 2018 y diciembre de 2019.

5.3. Muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia o no probabilístico. La muestra la conformaron pacientes con CL₊P NS, que asistieron a la valoración preanestésica en el periodo de tiempo descrito, y que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.

5.4. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico de CL₊P NS, y sin otro tipo de anomalía clínica asociada, que indicara la presencia de síndrome.

- Pacientes sin cirugía correctiva previa.
- Individuos de cualquier sexo.
- Individuos con o sin tratamiento ortopédico prequirúrgico.

5.5. Criterios de exclusión

- Pacientes con antecedentes de otra anomalía diferente a CL+P NS.
- Pacientes con antecedentes de enfermedades sistémicas: hipertensión, diabetes, patologías neurológicas, patologías del sistema inmune, cardiopatías y/o que utilizaran medicamentos como anticoagulantes.

Catorce (14) pacientes con diagnóstico clínico de CL+P NS conformaron la muestra. En la Tabla 3. se describen las características del grupo de estudio.

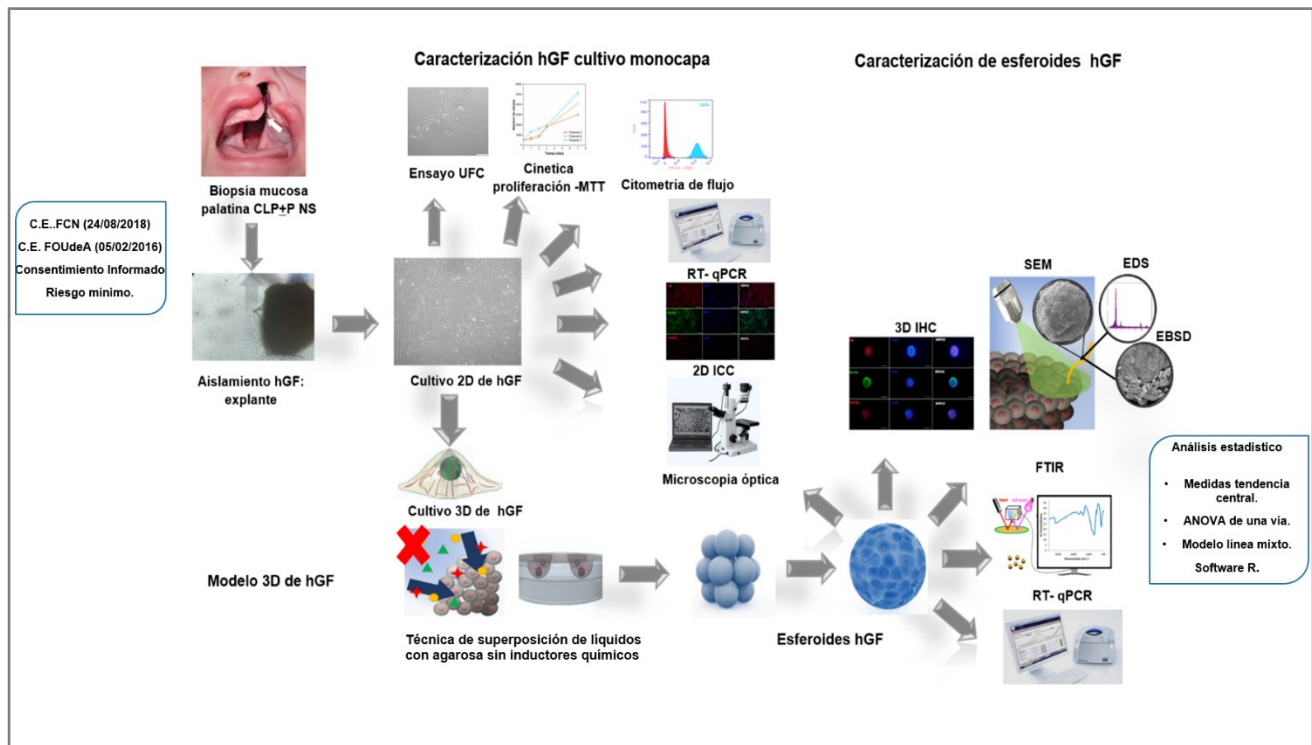
Tabla 3. Características de la muestra

Característica	Número	Porcentaje (%)
Edad (meses)		
Mediana 4.2	14	100
Sexo		
Femenino	3	21,4
Masculino	11	78,6
Fenotipo – Lateralidad		
Labio hendido (CL)		
Izquierdo	2	14,3
Labio y paladar hendido CL+P primario		
Izquierdo	2	14,3
Derecho	1	7,1
Labio y paladar hendido CL+P completo		
Izquierdo *	7	50
Derecho	1	7,1
Labio hendido bilateral y paladar hendido CL+P completo	1	7,1

Nota: *Un caso con hermano gemelo sin hendidura orofacial.

Finalmente, de los 14 pacientes se seleccionaron de forma aleatoria 7 pacientes, 5 hombres y dos mujeres para realizar los diferentes ensayos de caracterización en cultivos en monocapa y de esferoides celulares. En la Figura 7 se presenta el resumen gráfico del diseño metodológico de la investigación.

Figura 7. Resumen gráfico del diseño metodológico



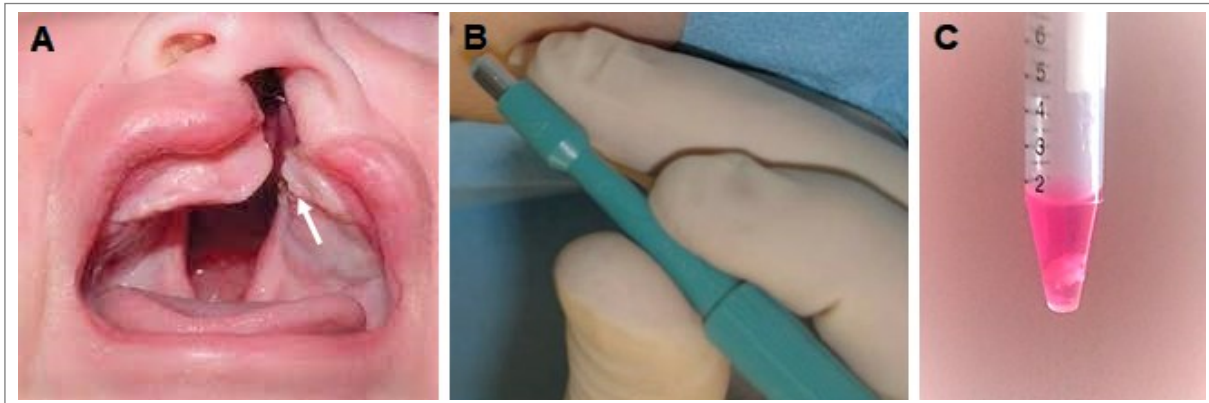
Nota. Aislamiento, cultivo y caracterización de hGF en cultivo 2D. Establecimiento del modelo de cultivo 3D y caracterización de los esferoides celulares.

5.6. Protocolo para la toma de biopsia

Previa firma del consentimiento informado (Anexo 1), de acuerdo con la ley 8430 del Ministerio de Protección Social de Colombia, y la declaración de Helsinki, se tomó una biopsia incisional de la mucosa del paladar duro, próxima a la hendidura en los casos de CL+P primario y/o secundario. En los casos de pacientes con CL, la biopsia se tomó de la mucosa palatina sana o no afectada por hendidura. Todos los procedimientos se realizaron bajo protocolo quirúrgico.

El tamaño de la biopsia fue de 2mm de longitud y de 2 a 3mm de espesor incluyendo la totalidad del tejido conectivo. La muestra se tomó de la zona de las rugas palatinas con un punch regular de 2mm aportado por la Fundación Clínica Noel, previo al procedimiento de rinoqueiloplastia, como se observa en la Figura 8A y Figura 8B. De inmediato, el espécimen se introdujo en un tubo Falcon de 15mL que contenía el medio de transporte: medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y 10% (v/v) de antibiótico (penicilina/estreptomicina) (p/e), todos los reactivos empleados eran de la marca Gibco (Figura 8C). Posteriormente, la muestra fue transportada al laboratorio teniendo en cuenta las recomendaciones de la norma técnica NTC4702-6 para el transporte terrestre de muestras de pacientes en Colombia (productos biológicos y/o infecciosos) para su procesamiento de forma rápida y eficiente, en un tiempo menor de dos horas entre el quirófano y el laboratorio.

Figura 8. Procedimiento de toma y transporte de la biopsia



Nota. (A). Se indica con punta de flecha el sitio de toma de la biopsia, que corresponde a la zona de las rugas palatinas. (B). Punch empleado para la toma de la biopsia. (C). Almacenamiento y transporte.

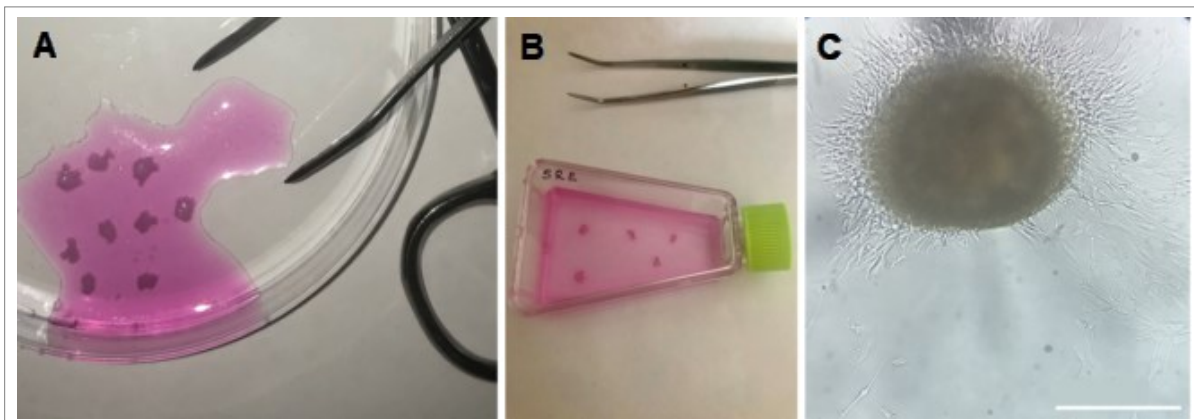
5.7. Aislamiento y cultivo primario de hGF CL \pm P NS

Método de explante: para el aislamiento de las células se implementó el método de explante como se indica a continuación. La biopsia fue seccionada en varios fragmentos con ayuda de una tijera curva de tejidos sin realizar separación epitelial, cada fragmento media aproximadamente 0.3mm de diámetro por 0.3mm de espesor, se colocaron en frascos de cultivo 25cm² a una distancias de 0.5 cm entre ellos y se les adiciono 2 mL de DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de FBS, y 10% de p/e. Se incubaron a 37° C en una atmosfera húmeda con 5 % de CO₂ y 95 % de O. Una vez, se observó la migración de células del explante se adicionaron 3 mL de medio de cultivo, el procesamiento de la biopsia y el cultivo del explante se ilustran en la Figura 9.

Los cultivos fueron monitoreados usando un microscopio de luz invertida Zeiss Axiovert 200 para evaluar el grado de confluencia, monitorear la posible contaminación, y realizar el recuento de células con un hemocitómetro de Neubauer.

El medio se cambió 3 veces a la semana en una proporción 1:1. Se realizó control y seguimiento de la migración, y proliferación de las células a partir de los fragmentos quirúrgicos durante veinte días en promedio para todas las muestras. Cuando el cultivo alcanzó un 75 a 80% de confluencia, se extrajeron los fragmentos remanentes del frasco de cultivo, y de nuevo fueron sembrados.

Figura 9. Procesamiento de la muestra y aislamiento de hGF CL \pm -P NS



Nota: (A). Seccionamiento de la muestra. (B). Siembra explantes en franco T25. (C). Migración de las células fuera del explante. Barra de escala 200 μ m. Aumento 4X.

Subcultivo o pasajes: con el fin de expandir la población de los fibroblastos, se realizaron subcultivo o pasajes de las células para realizar los diferentes ensayos. Las células se separaron con tripsina 1:250 (Gibco) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5mM en una concentración del 0,05%. La tripsina se neutralizó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con FBS al 10% y posteriormente, se centrifugo a 120 rpm durante 5 minutos para obtener un sedimento celular que se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo fresco. Posteriormente, se realizó de forma simultánea el conteo de células, y el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano al 0,4% (Sigma) como se describe a continuación:

Se colocó un cubreobjetos sobre la plataforma de conteo del hemocitómetro de Neubauer y se adicionaron 10uL de la suspensión celular previamente mezclada con 10uL de azul de tripano y se observó con un microscopio óptico. Se contó el número de células en cada cuadrícula y se calculó el promedio. Para estandarizar el procedimiento, se excluyeron las celdas que tocaban los límites inferior o izquierdo de la cuadrícula, mientras que se incluyeron los límites superior y derecho de la cuadrícula. Una vez se calculó el promedio de células, este se multiplicó por 1×10^4 , obteniendo así el número de células/mL, y el valor fue corregido con los factores de dilución correspondientes para obtener el número total de células en la suspensión. La viabilidad celular se estableció con la tinción de azul de tripano, las células que absorbieron el colorante y se tiñeron de azul se consideraron como no viables; las células que no captaron el tinte y permanecieron sin teñir se consideraron viables. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular usando la siguiente ecuación:

$$\text{células viables (\%)} = [1.00 (\text{número de células viables} \div \text{número total de células})] \times 100.$$

Después del subcultivo, las células fueron criopreservadas. El sedimento de células se resuspendió a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio de criopreservación así: 60% DMEM sin suplementar, 30% de FBS y 10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma). A continuación, la suspensión celular se colocó en viales criogénicos y se almacenaron en cajas de policarbonato con cierre azul de polietileno de alta densidad, que permiten cambios graduales de temperatura en un congelador de

temperatura ultrabaja a -80°C . Posteriormente, los crioviales se transfirieron a nitrógeno en fase líquida para almacenamiento a largo plazo a -180°C . Cuando fue necesario, las células criopreservadas se recuperaron del almacenamiento y se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C , y se diluyeron en 4 mL de DMEM al 20% de FBS. Después de centrifugar a 120 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue removido y el sedimento celular se resuspendió en DMEM con 10% de FBS y 1% de p/e y se sembró en un frasco T75. Las células fueron subcultivadas y expandidas siempre hasta alcanzar un 75% a 80% de confluencia. Todos los procedimientos de cultivo de tejidos y células se realizaron dentro de una campana de flujo laminar utilizando técnica aséptica. Con el protocolo descrito se estableció el banco de células para los experimentos futuros. Se emplearon células de los pases 3 a 6 para todos los experimentos.

5.8. Revestimiento de placas de cultivo con agarosa y cultivo tridimensional

El revestimiento de las placas de cultivo se realizó con una solución fundida al 1% (p/v) de agarosa RATM (VWR Life Science). La agarosa fue disuelta en PBS estéril, y posteriormente esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos con una presión de 20 a 23 psi, y almacenada a 4°C hasta el momento de su uso. Previo al cultivo, se vertió de 10 a 20 μL de agarosa fundida con una pipeta Pasteur en los platos de cultivo de 24 y 96 pocillos con fondo plano, y se dejó gelificar a temperatura ambiente durante una hora, mientras se expuso a la luz ultravioleta

Para realizar el cultivo de esferoides, las células se separaron de la superficie adherente con una solución de tripsina-EDTA al 0.05%, durante 4 minutos a 37°C . La tripsina se neutralizó con PBS con FBS al 10% y se centrifugó a 120 rpm durante 5 minutos para obtener el sedimento celular, y resuspender finalmente en medio de cultivo fresco. Las células se tiñeron con azul de tripano al 0.4%, y se contaron en un hemocitómetro de Neubauer. Para generar los esferoides, se sembró una gota de la suspensión celular con la densidad de células apropiada para el ensayo, es decir 5×10^3 células/pocillo en platos de 96 pozos, y 3×10^4 células/pocillo en platos de 24 pozos, y se agregó DMEM con 10% de FBS y 1% de p/e. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 , y 95% de O_2 . Se realizó cambio de medio a los

cultivos en platos de 24 pozo 3 veces por semana en proporción 1:1, y a los cultivos en platos de 96 pozos se les cambió entre 60 uL y 80 uL de medio 3 veces por semana.

Los esferoides cultivados en platos de 96 pozos se utilizaron para la caracterizar la formación y morfología de las estructuras multicelulares, y para realizar los ensayos de inmunohistoquímica, así como los análisis ultraestructurales. Por su parte, los esferoides cultivados en platos de 24 pozos se utilizaron para extraer RNA y realizar los análisis de expresión génica.

CAPITULO 3

6. Aislamiento de células, estandarización de cultivo 2D y caracterización de fibroblastos gingivales primarios de defectos CL \pm P NS

Introducción

Tradicionalmente, “la mucosa bucal” se ha considerado el término más común para referirse a las membranas de la cavidad bucal. Sin embargo, una descripción más precisa es el término “mucosas bucales”. Este énfasis se debe a que hay tres tipos de tejidos que son anatómica, histológica y funcionalmente diferentes: la mucosa especializada, la mucosa de revestimiento y la mucosa masticatoria. Esta clasificación corresponde principalmente al tipo de epitelio que soporta la lámina propia, el cual puede ser paraqueratinizado u ortoqueratinizado, no queratinizado, y especializado respectivamente. Por lo tanto, la mucosa se especializa en cada una de las regiones de la boca, cambiando sus características histológicas. Esta especialización le permite a la mucosa ejercer diferentes funciones, dentro de las que se encuentran la protección mecánica contra diferentes fuerzas, la acción de barrera contra los microorganismos, toxinas y otros antígenos, la intervención en la defensa inmunitaria, tanto celular como humoral, y la sensibilidad táctil, dolorosa y gustativa, debida a la rica innervación de este tejido (264).

En términos generales, la mucosa está compuesta por una capa externa que epitelio escamoso estratificado y una base de tejido conectivo más profunda (lámina propia), que se asemejan a la estructura de la epidermis y dermis de la piel, pero en algunas zonas se puede encontrar una tercera capa denominada submucosa, que se encuentra entre la lámina propia y el músculo o hueso subyacente. La lámina propia contiene una población heterogénea de fibroblastos que sintetizan y secretan al exterior las fibras de Col, El y FN y el gel hidratado de glucosaminoglicanos, que conforma la sustancia fundamental de este tejido conectivo y así mismo, contribuyen a la especificidad estructural y funcional de las membranas mucosas (265).

Por lo tanto, se considera que anatómicamente y funcionalmente los hGF y los fibroblastos mucoperiosticos forman nichos celulares específicos dentro de la lámina propia de la mucosa masticatoria, esto incluye paladar duro, encía marginal, y encía adherida (266).

Frecuentemente, los fibroblastos se definen por una combinación de características morfológicas, tales como la posición en el tejido, la forma de huso *in vitro*, además de la ausencia de marcadores de linaje de células epiteliales, endoteliales y de leucocitos. La dificultad para definir los fibroblastos se debe en gran medida a la falta de marcadores únicos, que no se expresen en ningún otro tipo de células (267). Varias moléculas de superficie se han utilizado comúnmente con este fin, incluidos los receptores alfa y beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF: PDGFR α y PDGFR β), CD90 (Clúster de diferenciación 90 o Thy-1), la proteína 1 específica de fibroblastos o S100A4 y vimentina (Vim). Sin embargo, ninguno de estos marcadores es lo suficientemente específico o amplio para toda la población de fibroblastos (268). A lo anterior se suma el hecho que los fibroblastos comparten características similares a las MSC, como ya se mencionó.

Ahora bien, existen pocos estudios que caractericen los tejidos y células craneofaciales afectados por hendiduras sindrómicas o NS desde el punto de vista molecular. Al respecto, Smane et al. (269) compararon por medio de inmunohistoquímica la expresión de MMP-2, y TIMP-2, así como el proceso de apoptosis en individuos con CL \pm P bilateral completo e individuos sanos. En el caso de CL \pm P, las células del tejido conectivo presentaron mayor expresión de TIMP-2 y MMP-2, lo cual puede explicar en parte la disminución de la apoptosis local, y un posible aumento en la remodelación del tejido. Estos hallazgos, fueron confirmados posteriormente cuando se compararon pacientes con CL \pm P unilateral completo, CL \pm P bilateral completo, e individuos sanos, donde se demostró una mayor expresión de MMP-2, y TIMP-2 en individuos con CL \pm P unilateral, y una expresión significativamente menor de MMP-9 y TIMP-4 en el CL \pm P bilateral completo en comparación con el CL \pm P unilateral. También, se ha identificado una menor expresión de TGF β 3 en el tejido conectivo de los pacientes afectados por hendiduras (270).

El estudio realizado por Krivka et al. (271) en individuos con CL_±P primario y CP se encontró alteración en la expresión de BMP 2/4, TGF β , y los receptores TGF β tipo III, tanto en el tejido epitelial, como en el tejido conectivo de CP, y de FGFR1 en el CL, reflejando de esta forma el compromiso de los tejidos en la malformación, así como la relación entre la señalización alterada de TGF β y la etiopatogenia de las hendiduras orofaciales. Adicionalmente, el análisis de GO reveló cambios en la expresión de genes implicados en el desarrollo esquelético, la proliferación del mesénquima y la polimerización de microtúbulos. Por último, Schoen et al. (272) informaron acerca de la desregulación de varios microRNA en cultivo de fibroblastos del paladar de pacientes con CL_±P NS y CP NS, sin embargo, este aspecto se debe investigar más a fondo para confirmar su importancia biológica.

Como se indicó, algunos estudios clínicos han demostrado la capacidad de las células de los defectos de CL_±P para regenerar una mucosa palatina similar a la mucosa normal, a pesar de la evidencia relacionada con las variaciones genéticas y fenotípicas de los tejidos afectados (16,17). Por lo tanto, identificar y caracterizar poblaciones o subpoblaciones de fibroblastos residentes en las mucosas bucales, específicamente en la mucosa masticatoria dado el potencial regenerativo que se ha descrito para este tejido, puede ayudar a explicar las propiedades biológicas de las diferentes mucosas bucales, y además contribuir en el avance de la terapia celular y la ingeniería de tejidos craneofaciales.

6.1. Materiales y Métodos

6.1.1. Evaluación por microscopía óptica

Método de aislamiento: previamente, y de acuerdo con la revisión de la literatura y la posible inmadurez que podía presentar el tejido objetivo se decidió realiza el aislamiento de los hGF por el método de explante.

Suplementación del medio de cultivo: se compararon dos concentraciones de FBS para suplementar el medio de cultivo DMEM alto en glucosa, al 5% y 10%. Las células obtenidas se sembraron en frascos de cultivo de 25cm² con 5mL de cada una de las

concentraciones con una densidad de siembra de 100.000 células por frasco, el medio se cambió tres veces por semana. Cada ensayo se realizó por triplicado y se hicieron las observaciones a diario durante 7 días con ayuda del microscopio. Lo anterior se hizo para determinar en qué condiciones las células proliferaban mejor y formaban una monocapa más rápido, sin sufrir apoptosis o entrar en senescencia.

Tamaño celular: los cultivos primarios en monocapa de hGF con una proliferación adecuada se observaron en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200, y se obtuvieron imágenes por medio de una cámara AxioCam Hrc5s acoplada al microscopio, y con el software Zen 3.3 blue edition. Se realizaron las medidas de longitud y ancho de las células de cinco cultivos primarios diferentes utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ v1.53h.

6.1.2. Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC)

Para realizar el ensayo de UFC las células fueron cultivadas bajo las condiciones estandar, ya descritas. El subcultivo se realizó con tripsina al 0.05% cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. En platos de 6 pozos (diámetro 35 mm) se sembraron por triplicado células a baja densidad así: 25, 50, 100 y 150 células por pozo, y se realizó el cambio de medio cada 2 a 3 días. A los 14 días, se realizó la evaluación de la eficiencia de formación de colonias. Los agregados con más de 50 células se consideraron UFC y se contaron bajo el microscopio invertido, mientras, que los agregados entre 10 y 50 células se contaron como racimos o grupos. Posteriormente, se lavó con PBS cada pozo, y se realizó la tinción con cristal violeta al 5% en PBS y con metanol al 10% durante 10 minutos. Finalmente, se realizó un último lavado a cada pozo con PBS, previo al registro fotografico de las colonias observadas bajo el microscopio y con vision directa.

La eficiencia de formación de colonias se consideró como el porcentaje de células capaces de formar colonias y la capacidad de propagación a baja densidad. Para ello, el número total de colonias se dividió entre el número inicial de células sembradas y el resultado se multiplicó por 100.

6.1.3. Ensayo de cinética de proliferación de hGF CL \pm P NS

Se seleccionaron tres pacientes de forma aleatoria entre los catorce pacientes, que conformaron la muestra. Las células se cultivaron bajo las condiciones ya descritas, y el subcultivo se realizó cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. Posteriormente, se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 5×10^3 células por pozo por triplicado. El día 1, 2, 3 y 7 de cultivo se retiró el medio y se adicionó bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio (MTT) (Invitrogen) disuelto en PBS a una concentración de 5 mg/mL y se incubó durante 4 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de metabolismo del MTT, se agregó dodecilsulfato sódico (Amresco) diluido al 10% p/v en ácido clorhídrico al 0,01 M (SDS-HCL). Finalmente, de 12 a 18 horas de incubación se realizó la lectura con un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific) a 570 nm.

Con los datos obtenidos se realizaron las curvas de cinética de proliferación. Para ello, se calculó el número de duplicación de la población (PDN, por su sigla en inglés) con la siguiente ecuación: $PDN = \log N/No \times 3,33$, y el tiempo de duplicación de la población (PDT, por su sigla en inglés) con la ecuación $PDT = CT/\log N/ No \times 3,33$.

6.1.4. Caracterización por citometría de flujo de hGF CL \pm P NS

De nuevo, se seleccionaron dos pacientes de forma aleatoria para realizar la caracterización por citometría de flujo. Se utilizaron 1.5×10^6 hGF CL \pm P en pase 5 para realizar los análisis de citometría de flujo. Las células cultivadas en un 70% de confluencia fueron recolectadas con Tripsina-EDTA al 0.05% y fueron resuspendidas en 2 mL de PBS, para contar con 1×10^5 células. Posteriormente, las células se incubaron con 250 uL de suero de cabra al 1% durante 5 minutos a 4°C, y se lavaron nuevamente en 2mL de PBS. Se incubaron con anticuerpos conjugados, y los correspondientes isotipos como control negativo (Invitrogen -Thermo Fisher Scientific) en una dilución de 1:20 en la oscuridad durante 20 minutos a 4°C. Los anticuerpos e isotipos empleados se presentan en la Tabla 4.

Las lecturas y el análisis de resultados se realizaron con el citómetro FACS Canto II Becton Dickinson de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia. Se adquirieron aproximadamente 10.000 eventos de la región que corresponde a una población celular con baja complejidad (Side Scatter) y tamaño (Foward Scatter). Posteriormente, se realizó el análisis seleccionado de esta población para observar la expresión de antígenos de superficie para MSC de forma independiente, por medio del programa Flow Jo v 10.7. Como control positivo se emplearon hGF de un donante adulto, aislados con el mismo protocolo por el método de explante.

Tabla 4. Anticuerpos conjugados para caracterización por citometría de flujo

Marcador	Conjugado	Isotipo
CD 73	PerCP+ Cianine 5.5	Mouse / IgG1 kappa
CD 90	FITC	Mouse / IgG1, kappa
CD105	e- Flúor 450	Rat/ IgG2a, kappa
CD 34	PE	Mouse / IgG1, kappa
CD 45	PE-CIANINA 7	Mouse / IgG1, kappa
CD 11b	APC	Mouse / IgG1, kappa
HLA-DR	APC-H7	Mouse / IgG2a kappa

6.1.5. Caracterización por inmunocitoquímica de hGF CL ± P NS

Los fibroblastos gingivales CL_±P NS se sembraron en una densidad de 3 X10⁴ células sobre coverslip de 12 mm de diámetro, y 0.27 mm de espesor en platos de 24 pozos, y fueron cultivados durante 48 horas aproximadamente hasta alcanzar una confluencia del 70 al 80%. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 a 30 minutos, se permeabilizaron con Tritón X-100 en PBS al 0.25% durante 10 minutos, y se bloquearon con albumina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS más Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos primarios específicos a 4°C durante toda la noche en las concentraciones indicadas por el fabricante (Tabla 5).

Finalmente, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: cabra anti-ratón Alexa Flúor 594 (Abcam), y cabra anti-conejo Alexa Flúor 488 (Abcam) en una dilución de 1:1000. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las células fueron montadas con Vectashield (Sigma Aldrich) durante 1 hora. Se utilizó como control positivo la línea NIH/3T3, y como control negativo la línea MCF-7. Las células teñidas se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse celular 80i) y las imágenes se adquirieron con la cámara OptixCam Summit K2, y se procesaron con el software libre Fiji/ImageJ versión número 1.53c (plus) para realizar el análisis cualitativo de expresión de los marcadores.

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados para caracterizar hGF CL+/-P NS

Anticuerpo	Tipo	Marca	Dilución
Stro-1	Monoclonal	Abcam	1:50
Vimentina (Vim)	Monoclonal	Abcam	1:100
Molécula de interacción estromal 1 (Stim1)	Monoclonal	Abcam	1:50
Colágeno 1, alfa 2 (Col1A2)	Policlonal	Proteintech	1:1000
Actina de musculo liso (α SMA)	Policlonal	Proteintech	1:50
Integrina beta 1 (Itg β 1)	Policlonal	Proteintech	1:50
Proteína activadora de fibroblastos (FAP)	Monoclonal	Promocell	1:50
Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β)	Monoclonal	Genetex	1:20

Como ya se mencionó, para realizar este análisis, se seleccionaron de forma aleatoria 7 de los 14 pacientes con CL+P NS, 5 hombres y 2 mujeres. Las características de los individuos se presentan en la Tabla 6. Las imágenes y los datos se obtuvieron de tres experimentos representativos por cada una de las muestras.

Tabla 6. Características de la muestra de los esferoides CL+/-P NS

Paciente	Sexo	Edad (meses)	Fenotipo de la hendidura	Tipo/Severidad de la hendidura
1	F	4.11	CL _± P UI	II
2	M	3.17	CL _± P UI	II
3	M	4.18	CL _± P UI	II
4	M	4.0	CL _± P UI	II
5	M	4.2	CL _± P Primario Izquierdo	I
6	F	10.15	CL _± P Primario Derecho	I
7	M	5.5	CL _± P UI	II

Nota: Fenotipos de la hendidura: CL_±P UI: labio ± paladar hendido unilateral izquierdo. Tipo o severidad de la hendidura: Tipo I: labio y paladar primario hendido únicamente. Tipo II: labio, paladar primario y secundario hendidos.

6.1.6. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media ± desviación estándar. Se realizó la prueba t de Student para evaluar la significancia de las diferencias, y se consideró el valor $p < 0.05$. El análisis se realizó por medio del Software R.

6.2. Resultados

6.2.1. El método de explante es eficiente para aislar fibroblastos gingivales

Con el protocolo de explante que se definió se logró el aislamiento y expansión de los hGF con éxito, a partir de una biopsia de la mucosa palatina de un tamaño mínimo para cada una de las muestras analizadas en este trabajo. El seguimiento de los cultivos por microscopio invertido mostró que entre el día 4 y 8 inicio la migración de células alrededor del explante, y el tiempo que transcurrió para alcanzar una confluencia adecuada y realizar el primer pase fue de 20 días aproximadamente. Las células

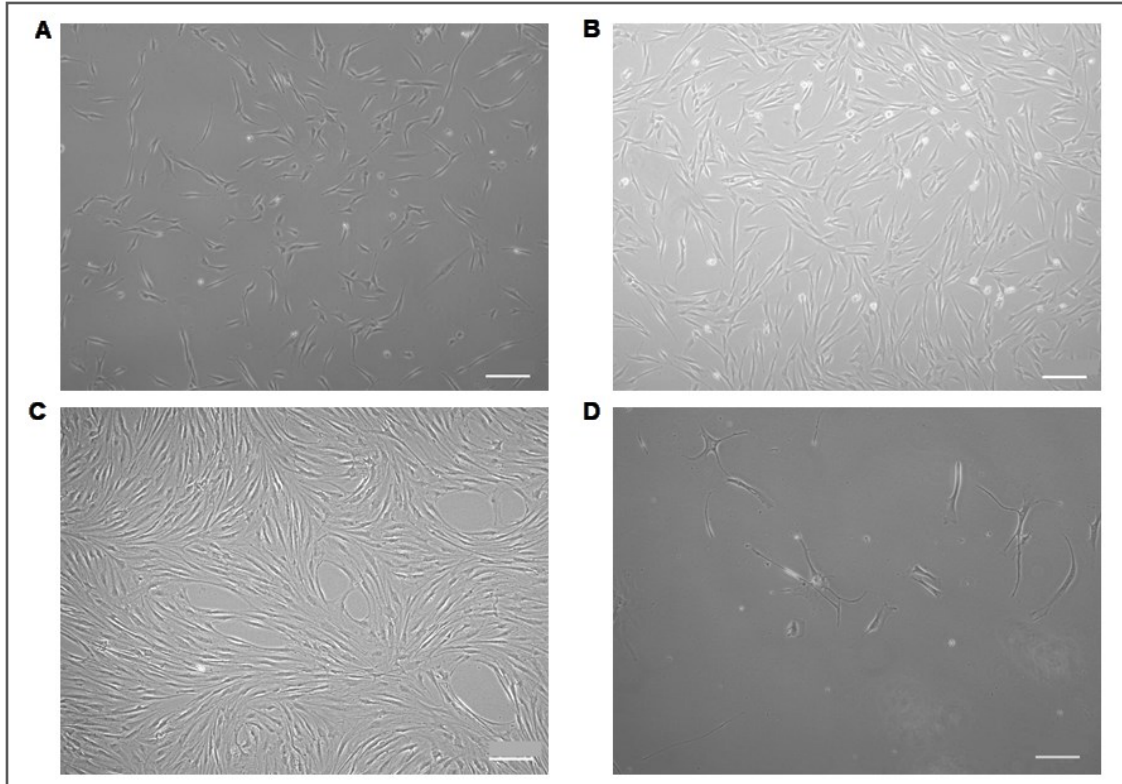
mostraron la morfología característica de los fibroblastos y no presentaron signos de estrés o apoptosis (Figura 10A). Se obtuvo una alta viabilidad celular, en promedio del 90% y un alto número de células, aproximadamente 4×10^3 células por cm^2 . Durante, el proceso de aislamiento del explante y en los subcultivos las células se adhirieron fácilmente al plato y su proliferación dependía de la densidad de siembra y la suplementación adecuada. Se requirió un mínimo de siembra de 100.000 células para obtener una confluencia del 80% a los 7 días de cultivo en frascos de 25 cm^2 (Figura 10B, Figura 10C). Adicionalmente, cuando el cultivo alcanzó el 100% de confluencia las células comenzaron a estratificarse en el frasco de cultivo, y continuaban firmemente adheridas al sustrato. Al adicionar tripsina al 0.05% solo se desprendió un número escaso de células. Esto significa, que la proliferación de los hGF CL₊P NS no se inhibió por contacto y además las células secretaron ECM.

Suplementación del medio de cultivo: el primer día de subcultivo se observó la adhesión de un número mayor de células en los cultivos en los que se utilizó suplementación del medio con FBS al 10%. Al tercer día se observó mayor proliferación, y por lo tanto mayor confluencia de células en los cultivos con 10% de FBS, mientras que las células cultivadas con 5% de FBS no lograron proliferar y además formaron pequeñas colonias aisladas unas de otras. Al séptimo día se encontró que el crecimiento fue rápido y las células alcanzaron un 80% de confluencia con FBS al 10% (Figura 10C), mientras que las células cultivadas con 5% de FBS cambiaron la morfología, extendieron el citoplasma y adoptaron una forma estrellada sin aparente proliferación, además algunas células se desprendieron del plato de cultivo (Figura 10C).

De otro lado, se rescató la capacidad de proliferación de las células cultivadas con 5% de suero con medio condicionado (DMEM de un cultivo celular del mismo individuo con 10% de FBS). Esto fue comprobado de la siguiente manera, se tomaron 5 mL del medio de cultivo de un frasco de células que fue suplementado con 10% de FBS de un mismo individuo con una confluencia mínimo del 60%, este se filtró utilizando una jeringa de 5 mL. El medio suplementado al 5% de FBS se retiró en su totalidad del frasco de cultivo celular el día 4 y se reemplazó por el medio condicionado previamente filtrado. Se realizó el seguimiento microscópico en las mismas condiciones y se observó que las células lograron proliferar una vez se cambiaron al medio condicionado. El siguiente

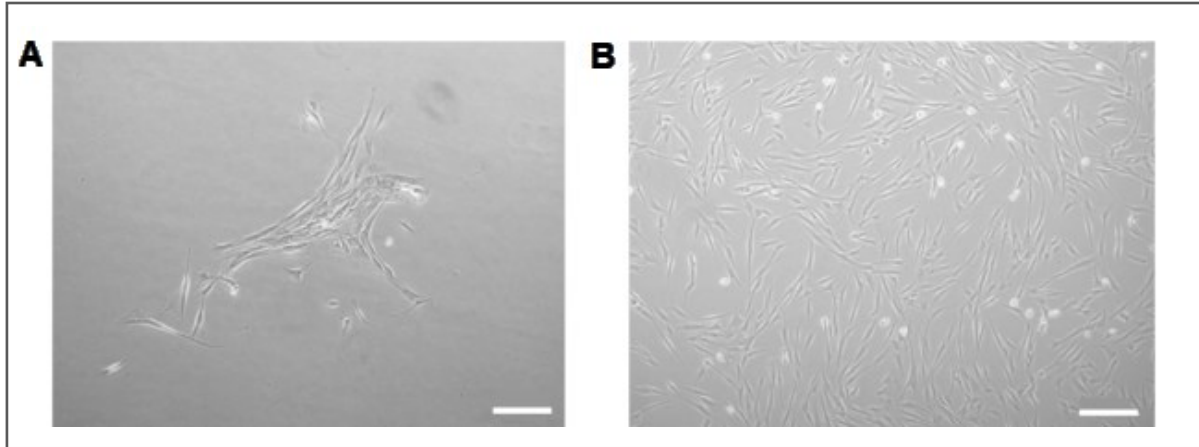
cambio de medio se realizó con FBS al 10% y finalmente las células alcanzaron confluencia aproximadamente el día 10 de cultivo.

Figura 10. Estandarización de cultivo primario de hGF CL+/-P NS



Nota. (A). Día 2 de cultivo de hGF CL_±P NS con DMEM al 10% de FBS y una densidad de siembra de 100.000 células. (B). Día 4 de cultivo. (C). El día 7 de cultivo alcanzaron un 80% de confluencia. (D). Día 3 de cultivo con DMEM al 5% de FBS, las células no proliferaron y entraron en senescencia. Barra de escala 200µm. Aumento 5X.

Morfología celular. Bajo microscopía óptica, los hGF CL_±P NS exhibieron la típica forma de huso o fusiforme en cultivo 2D, con un tamaño promedio de 7-10 µm de ancho, y 55 a 76 µm de longitud. Además, mostraron su capacidad para adherirse al plástico como se observa en la Figura 11A y en la Figura 11B. Por su parte, los fibroblastos de los tejidos adultos, en términos generales se observaron como células de gran tamaño, que midieron entre 50 a 100 micras de longitud.

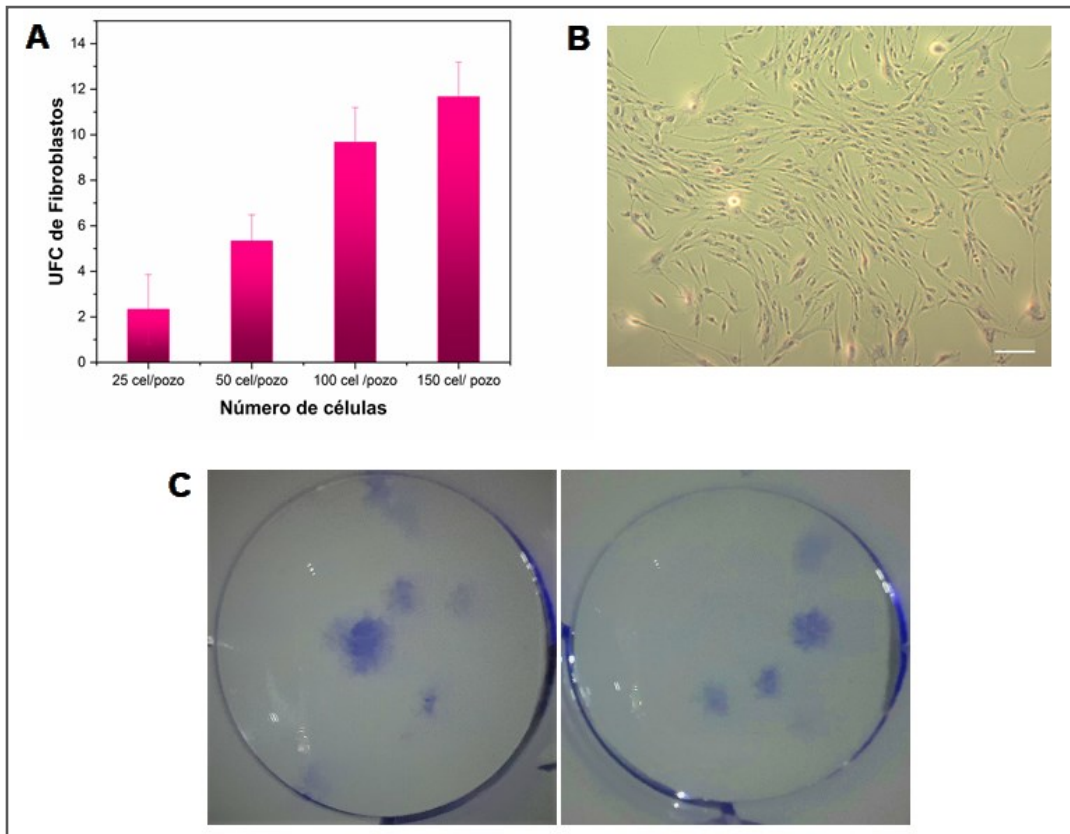
Figura 11. Morfología en cultivo 2D de los hGF CLP +/- P NS

Nota. (A). Unidad formadora de colonias de hGF CL_±P NS en día 2 de cultivo. Se observan células con morfología fusiforme. (B). Cultivo en monocapa de hGF con la típica forma de huso, día 5 de cultivo. Barra de escala 200µm. Aumento 5X.

6.2.2. Los hGF CL ± P NS forman colonias con baja densidad de siembra

En los cultivos en monocapa los hGF CL_±P NS, mostraron una relación directa entre la cantidad de células sembradas, y el número de colonias formadas. En este caso, por cada 50 células se obtuvo de 4 a 5 UFC, alcanzando una eficiencia entre el 10% y 12%, tal como se observa en Figura 12A.

Adicionalmente, los hGF CL_±P NS mostraron la capacidad de formar colonias a través de los diferentes pases de cultivo y a baja densidad de siembra. Las colonias estaban conformadas por numerosas células adherentes, con morfología típica de fibroblastos, fusiformes, alargadas, con un citoplasma claro y un núcleo ovalado central con varios nucléolos, que identifican a la CFU, tal como se observa en la Figura 12B y la Figura 12C, demostrando así su capacidad de renovación, y eficiencia de formación de colonias.

Figura 12. Capacidad de formación de UFC de hGF CL+/-P NS

Nota. (A). Cantidad de UFC según el número inicial de células sembradas. (B). Tinción de UFC con cristal violeta bajo microscopio invertido. Barra de escala 200µm. Aumento 5X. (C). Tinción de UFC con cristal violeta.

6.2.3. El tiempo de duplicación de la población de hGF CL ± P NS es variable entre individuos

El cálculo del PDN, y el PDT de los hGF CL±P NS, se realizó en los días 1, 2, 3 y 7 de cultivo. En general las células duplicaron su población con un amplio rango de diferencia en el tiempo, entre 19,8 horas, 52,56 y 68,16 horas. Por su parte, las curvas de proliferación celular con el método del MTT mostraron que en la fase de latencia (día 1 a 3 del cultivo), el número de células disminuyó para los pacientes 2 y 6. En la fase de crecimiento exponencial o de rápido crecimiento, todos los pacientes mostraron un aumento en el número de células de forma rápida especialmente los pacientes 6 y 7,

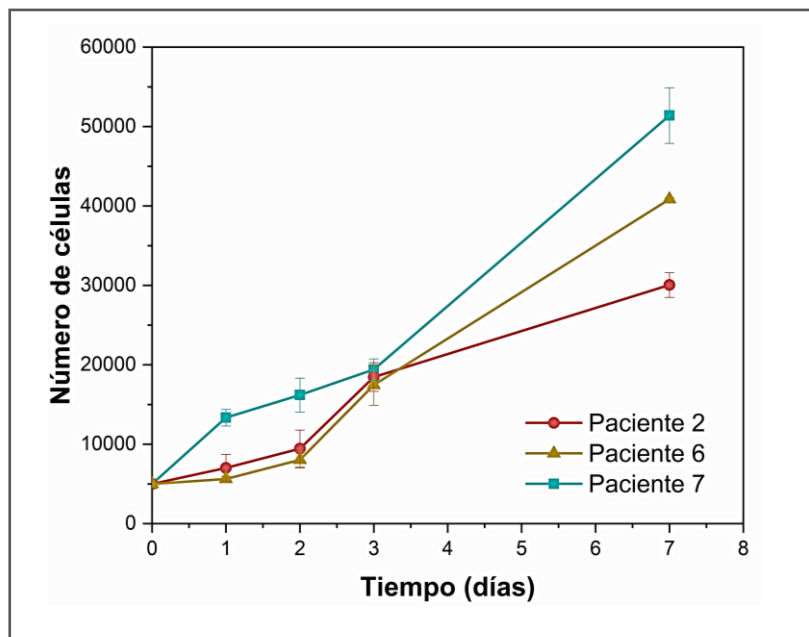
aunque el crecimiento del paciente 2 también fue progresivo, pero menos marcado que los pacientes 6 y 7. En la Tabla 7 se muestra el cálculo del número y el tiempo de doblaje de la población y en la Figura 13 se pueden observar las curvas de proliferación celular de los pacientes evaluados.

Tabla 7. Número y tiempo de duplicación de la población hGF CL+/-P NS

Paciente	PDN				PDT			
	1 día	2 días	3 días	7 días	1 día	2 días	3 días	7 días
2	0,48	0,91	1,88	2,59	2,08	2,19	1,59	2,70
6	0,17	0,68	1,81	3,04	5,93	2,84	1,66	2,30
7	1,42	1,70	1,96	3,37	0,70	1,18	1,53	2,08

Nota: PDN: numero de duplicacion de la población. PDT: tiempo de doblaje de la población.

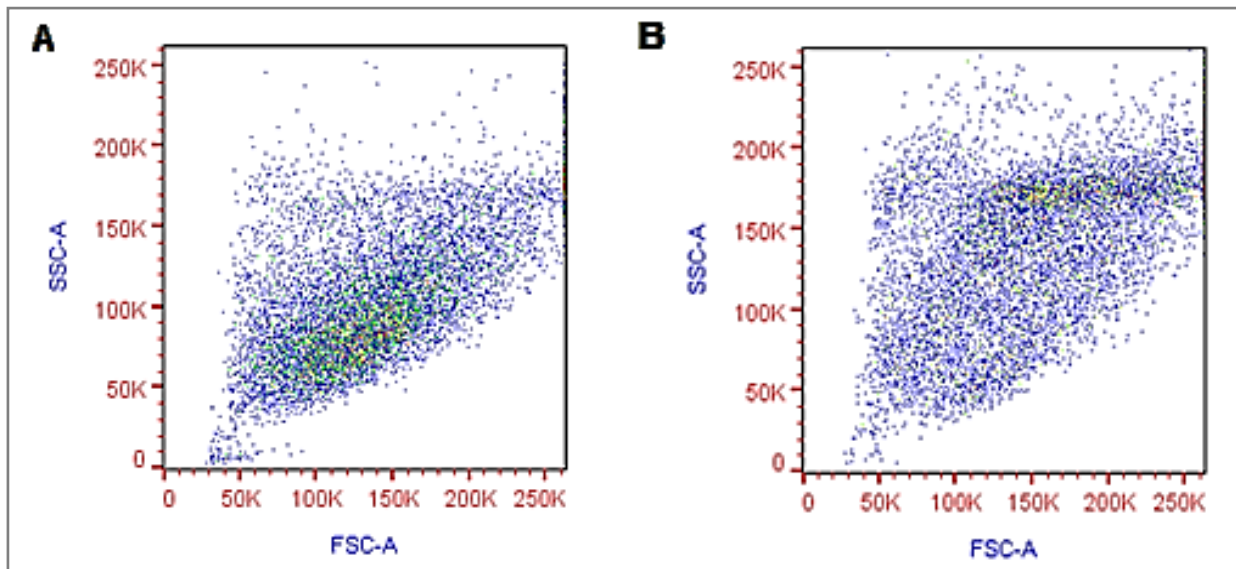
Figura 13. Curva de proliferación de hGF CL_±P NS



6.2.4. Los hGF CL ± P NS son células con baja granularidad y tamaño pequeño que expresan marcadores de superficie de MSC

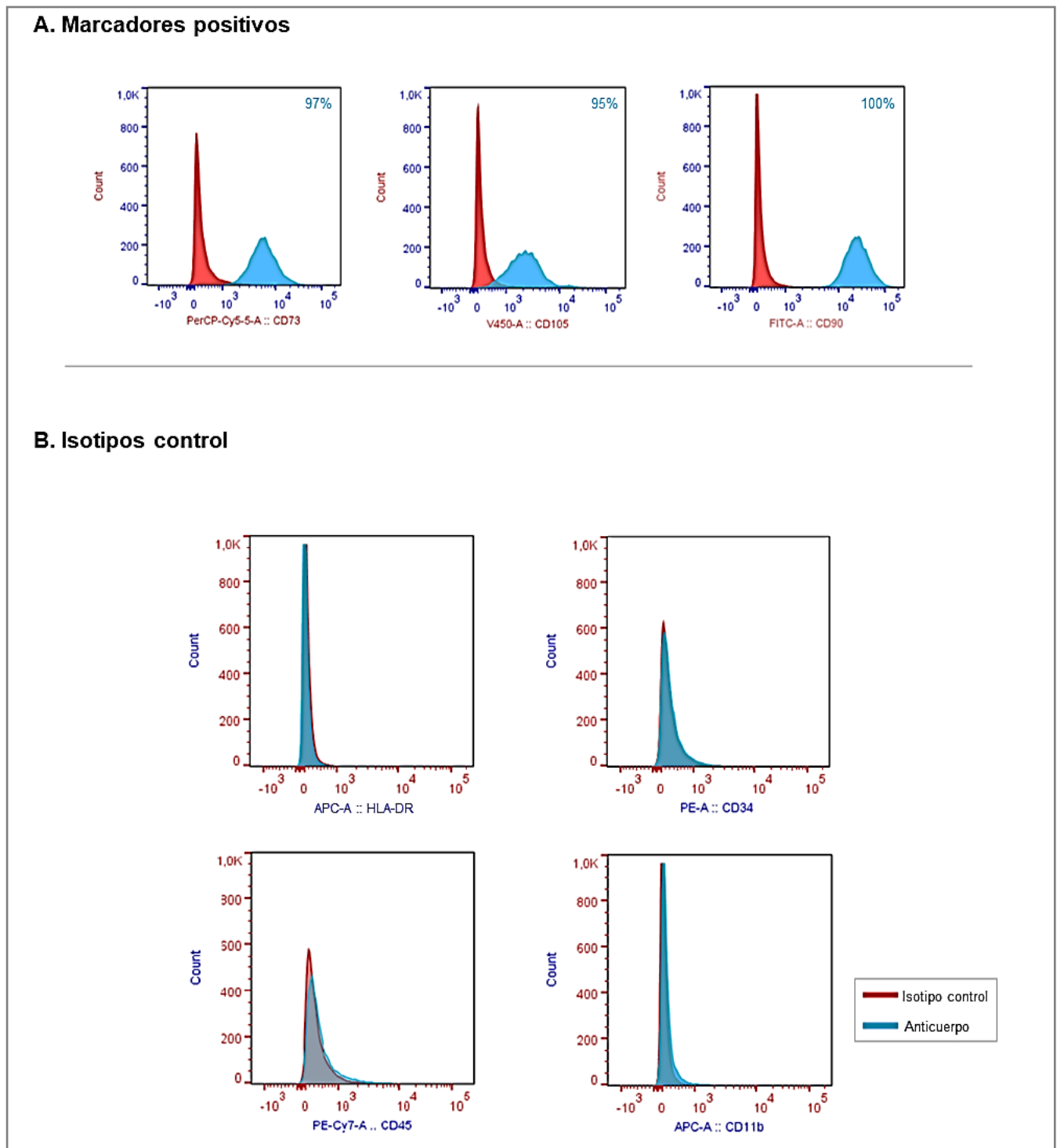
Al comparar, el tamaño (Forward Scatter) y la granularidad celular (Side Scatter), se observó en el DotPlot, que los hGF CL±P NS conformaron una población celular con menor tamaño y complejidad, es decir con menor cantidad de gránulos u organelos citoplasmáticos (Figura 14A), en relación con fibroblastos aislados de un paciente adulto sano que sirvió como control (Figura 14B). Estos resultados apoyaron los datos del análisis morfológico que se realizó por microscopia óptica.

Figura 14. Dispersión lateral vs. dispersión frontal: hGF CL+/-P vs. hGF adulto sano



Nota: (A). hGF CL±P NS. (B). hGF de adulto sin hendidura orofacial.

El análisis por citometría de flujo de los hGF reveló una fuerte expresión de los antígenos de diferenciación de timocitos-1 (CD90), CD73 (ecto-5'-nucleotidas), así como una elevada expresión del receptor de matriz CD105 (endoglina, SH2) y, además, fueron negativos para CD34, CD45, CD11b; y HLA-DR, similar a las MSC. En la Figura 15A. se muestra el porcentaje de células que expresaron cada uno de los antígenos de superficie de MSC, y los correspondientes isotipos control en la Figura 15B.

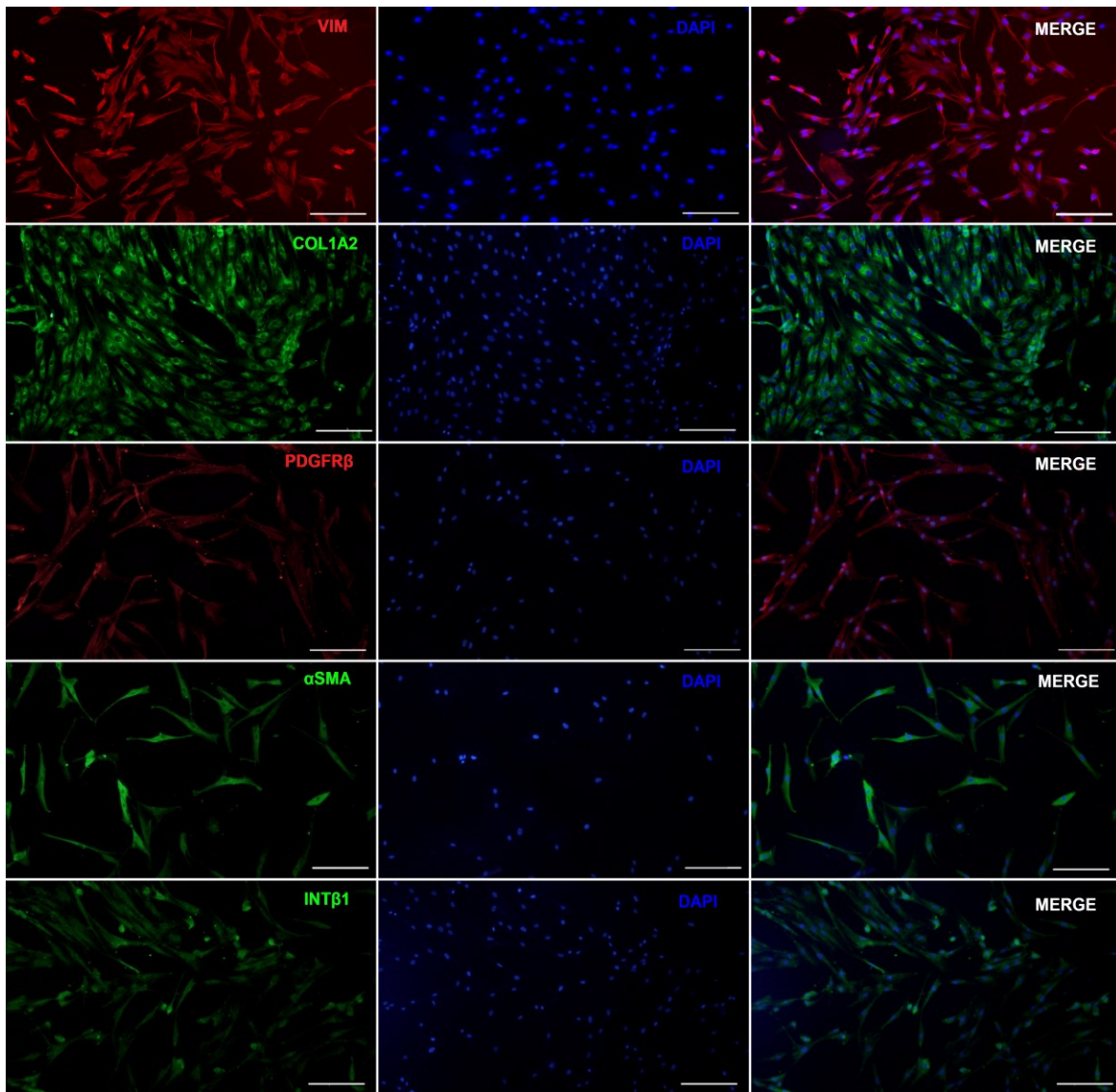
Figura 15. Expresión de marcadores de MSC en hGF CL+/-P NS

Nota. Expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo en hGF CL+/-P NS. (A). Expresión de CD73, CD105 y CD 90. (B). Expresión negativa de HLA-DR, CD34, CD45, y CD11b

6.2.5. Los hGF CL ± P NS expresan marcadores de células quiescentes de linaje mesenquimal en cultivo 2D

Los hGF CL_±P NS en cultivo 2D expresaron el siguiente panel de marcadores por inmunocitoquímica: Vim, Col1A2, ItgB1, PDGFR β y α SMA, tal como se observa en la Figura 16.

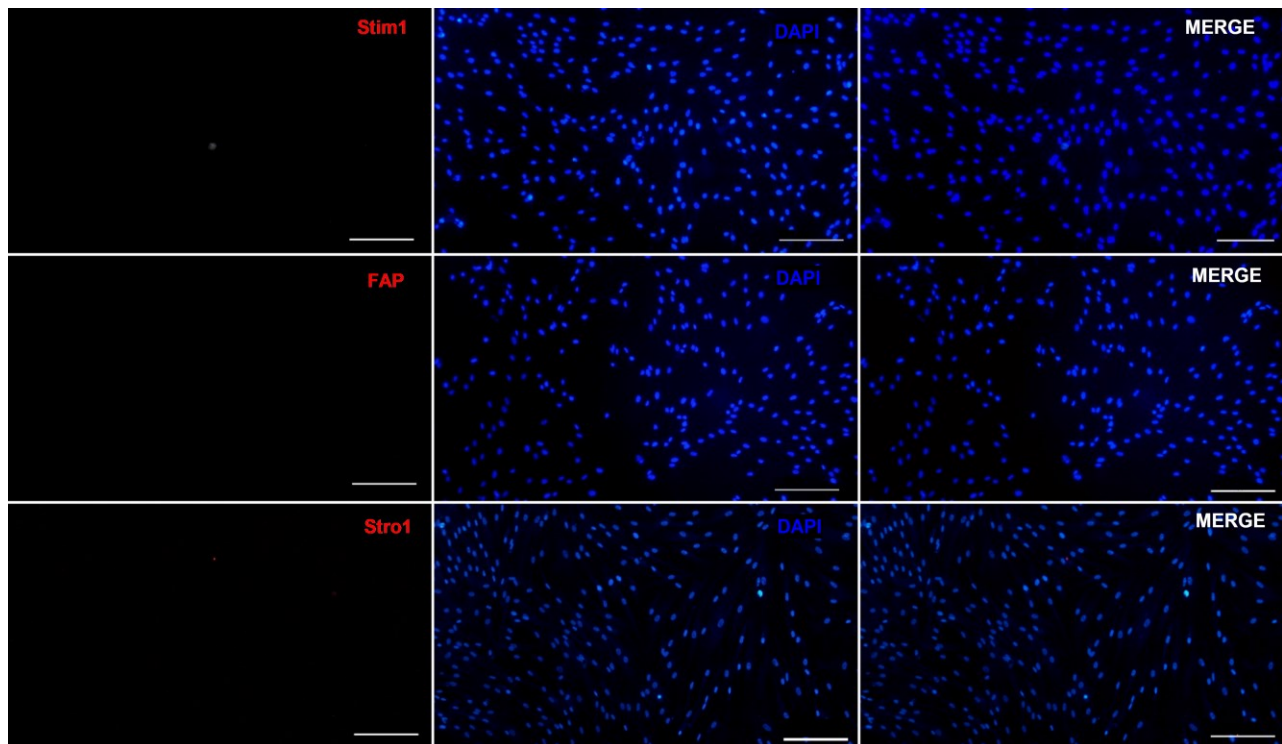
Figura 16. Conjunto de marcadores con expresión positiva en hGF CL_±-P NS



Nota: Tinción de inmunofluorescencia que indica el linaje mesenquimal de los hGF CL_±P NS. Tinción de núcleos con DAPI. Barra de escala 200 μ m. Aumento 10X. Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes.

Los marcadores seleccionados fueron uniformemente expresados, y aunque ninguno de estos es específico para identificar fibroblastos, la expresión colectiva puede caracterizar una subpoblación de hGF primarios. Adicionalmente, en la Figura 17 se muestra la expresión negativa de los marcadores FAP, STIM1 y Stro-1 para las células en cultivo en monocapa.

Figura 17. Marcadores negativos de hGF CL+/-P NS



Nota: Tinción de inmunofluorescencia que indica el estado de células quiescentes y diferenciadas de los hGF CL+P NS. Tinción de núcleos con DAPI. Barra de escala 200µm. Aumento 10X. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

6.3. Discusión

La evidencia actual ha demostrado que los fibroblastos residentes en los órganos y tejidos tienen un papel pro-regenerativo intrínseco al modular el microambiente para sí mismas y/o para las MSC (225). Por lo tanto, se planteó en la presente investigación

aislar y caracterizar hGF de individuos con CL_±P NS para posibles aplicaciones en enfoques de medicina regenerativa craneofacial.

De otro lado, aunque las MSC se consideran una fuente ideal para la terapia celular, aún presentan inconvenientes para su aplicación clínica. En primer lugar, las MSC son células escasas en los tejidos adultos, por lo tanto, se requiere generar dosis terapéuticamente relevantes (1–2 millones/kg) consecuentemente, las MSC se someten a una gran cantidad de divisiones celulares *in vitro* aumentando la posibilidad de mutagénesis y la pérdida de actividad. En segundo lugar, las MSC implantadas migran a sitios distantes del tejido receptor, lo cual sugiere que el mecanismo por el cual las MSC favorecen la regeneración tisular consiste en reclutar y/o modular células locales, es decir un efecto paracrino potente. Por último, la inestabilidad en el potencial regenerativo de las poblaciones de MSC se ha relacionado con el “nicho de células madre” en el destino celular, donde intervienen la variabilidad genética y/o alteraciones epigenéticas (104,105).

En la presente investigación se estableció un protocolo de explante que permitió el aislamiento y cultivo de hGF primario a partir de una pequeña biopsia de la zona de las rugas palatinas de individuos con CL_±P NS. Aislar células primarias por este método tiene varias ventajas cuando se compara con el aislamiento enzimático, dentro de estas se incluyen: eliminar el estrés proteolítico de las células, menor riesgo de contaminación biológica, utilizar menos derivados enzimáticos en el proceso de aislamiento, así como la inclusión de factores de crecimiento para la expansión, lo cual se refleja en el uso de un protocolo más asequible, por su menor costo. Adicionalmente, si se considera la creación de un producto para la ET o para terapia celular se debe evitar el uso de productos xenogénicos; por lo tanto, para posteriores estudios se propone analizar el uso de suero humano obtenido del mismo donante, o de lisado plaquetario para sustituir el suero animal (210).

Para su proliferación y supervivencia durante el proceso de expansión, los hGF CL_±P NS necesitaron la suplementación del medio de cultivo con 10% de FBS (Figura 10A, Figura 10B, Figura 10C). Estos resultados son similares a la investigación de Simancas et al. (274), donde se demostró en cultivo de hGF, que al emplear concentraciones menores al 10% de FBS, se afectó la proliferación y la morfología de los

fibroblastos. Por lo tanto, los hGF CL₊P NS demostraron ser dependientes de los factores de crecimiento, hormonas y otras moléculas presentes en el suero, sin embargo, esta deficiencia se logró suplir cuando se utilizó medio condicionado (DMEM suplementado al 10% del cultivo celular del mismo donante)

Como se esperaba, en condiciones estándar de cultivo 2D los hGF CL₊P NS presentaron características morfológicas y fenotípicas similares a las MSC, a pesar de exhibir menor tamaño y granularidad que los hGF de adulto (Figura 14). Los hGF CL₊P NS se adhirieron al plástico, exhibieron la típica morfología en huso y demostraron la capacidad de formar colonias a baja densidad de siembra (Figura 11, Figura 12). Asimismo, expresaron los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, pero no CD45, CD34, CD11b, ni marcadores de superficie HLA-DR (Figura 15). Estos resultados son muy similares a las investigaciones de Denu et al. (113) y Smirani et al. (275).

Adicionalmente, el tiempo de duplicación de los hGF CL₊P NS fue variable entre los individuos. El paciente 7 mostró una tasa de crecimiento rápido con un tiempo de duplicación de 18,9 horas, mientras que, los pacientes 2 y 6 mostraron tasas de crecimiento más lento con tiempos de duplicación de 52,56 y 68,16 horas respectivamente (Tabla 7). Sin embargo, durante la fase de crecimiento exponencial todos los individuos mostraron un rápido aumento en el número de células demostrando así, una expansión *in vitro* eficiente (Figura 13). Estos resultados sugieren que los hGF CL₊P NS son altamente sensibles a los efectos de la tripsina, sin embargo, tienen la capacidad de reensamblar su adhesoma y adaptarse a las condiciones de cultivo 2D para proliferar. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que la tripsina puede afectar la expresión de los marcadores de membrana y la viabilidad celular (210).

Pese a la limitación del tamaño muestral, los resultados de proliferación celular de la presente investigación son comparables con los de la investigación de Saeed (276). En este caso, el autor también encontró tiempos de proliferación de hGF CL₊P NS variables entre los individuos, pero esta no se vio influencia por el fenotipo en las hendiduras unilaterales. Sin embargo, el análisis de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular y/o el ciclo celular, tales como *MCM2*, *MK167* y *PCNA* en hGF de paciente con CL₊P NS aumentó. Mientras que, en hGF aislados de pacientes con hendiduras bilaterales, un fenotipo más severo que el CL₊P unilateral, se redujo

significativamente la expresión de *MCM2* y de *MK167*. Esto quiere decir que, el aumento o la disminución de la proliferación celular puede estar relacionada con la gravedad o severidad de la hendidura. Por lo tanto, es necesario investigar la regulación del ciclo celular y la proliferación en pacientes con CL_±P NS.

De acuerdo con los resultados de esta investigación los hGF CL_±P NS demostraron tener una capacidad clonogénica alta (Tabla 7) muy similar a los resultados obtenidos por Nguyen y Pham (277) en hGF de pacientes adultos sanos, Adicionalmente, los hGF presentan una capacidad clonogénica superior a las MSC de medula ósea de acuerdo con Tomar et al. (278). Resumiendo, los hGF CL_±P NS demostraron una adecuada capacidad de autorrenovación, supervivencia y proliferación, características necesarias para aplicaciones en medicina regenerativa.

Asi mismo, es importante considerar que aún no se han logrado estandarizar marcadores celulares para identificar fibroblastos. Al respecto, Jiang et al. (268) y LeBlue y Neilson (279) están de acuerdo en que los fibroblastos expresan una serie de marcadores mesenquimales que comparten con otros tipos de células tales como neuronas, células inmunitarias y otras células no mesenquimales. Esto quiere decir, que ninguno de los marcadores que se ha propuesto hasta el momento es totalmente específico para fibroblastos, y por lo tanto se requiere de múltiples marcadores para identificar subpoblaciones de células teniendo en cuenta la especificidad tisular. En esta investigación, se propone un panel de marcadores que puede ser útil para identificar la población de hGF de otras poblaciones de fibroblastos de las mucosas bucales.

Los hGF CL_±P NS en cultivo 2D expresaron los marcadores Vim, Col1A2, ItgB1, PDGFR β y α SMA (Figura 16). A pesar, que la expresión de α SMA se ha relacionado con una posible adaptación del citoesqueleto durante el cultivo 2D y con poblaciones de fibroblastos activados o miofibroblastos, en esta investigación los hGF CL_±P NS fueron positivos de manera consistente para α SMA. Este marcador se distribuyó de forma homogénea e intensa en el compartimento intracitoplasmático. La expresión de α SMA en poblaciones de hGF fue reportada previamente por Glim et al. (163), Vescarelli et al. (173), y Lygoe et al. (174) quienes demostraron que los hGF tienen una expresión constitutivamente mayor de α SMA en comparación con los hDF y los hLMF y adicionalmente, que la modulación que realizan los hGF de α SMA durante los procesos

de curación de heridas se relación con una mejor capacidad regenerativa de la mucosa masticatoria frente a la mucosa de revestimiento y a la de la piel (275).

Por su parte, la Vim el principal componente estructural de los filamentos intermedios del citoesqueleto de células del linaje mesenquimal, también se expresa en las células endoteliales, astrocitos y células de tejidos linfoides. Los hGF CL₊P NS expresaron de forma uniforme Vim. Este resultado, coincide con el estudio realizado por Goodpaster et al. (280) quienes informaron mediante inmunotinción cuantitativa una intensidad de tinción del 100% para Vim en hDF y fibroblastos de pulmón en comparación con monocitos/macrófagos, células de glioma y células de osteosarcoma. Vim, es responsable de funciones biológicas como la contracción, migración, proliferación y diferenciación celular, así como la resistencia al estrés mecánico. Por lo tanto, Vim participa en la mecanotransducción y la remodelación de la ECM funciones típicas de los hGF durante la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos. Adicionalmente, la Vim media procesos celulares como la EMT y facilita que las células se adapten al estrés oxidativo (281).

El aumento en la expresión de ItgB1 se relaciona con eventos celulares como la mecanotransducción y la diferenciación de hGF. Van Beurden et al. (282) informaron una mayor expresión de ItgB1 en hGF de heridas de la mucosa en comparación con los hGF de tejidos sanos, así demostraron un cambio de fenotipo para los hGF pasando de un estado inactivo a uno activado, que además se asoció con la producción de Col1 durante el proceso de curación de heridas de la mucosa palatina. Los hGF CL₊P NS expresaron de forma positiva y homogénea tanto el Col1A2, como ItgB1 (Figura 16). Sin embargo, es importante recordar que estos marcadores también se expresan en otras células mesenquimales como condrocitos, osteoblastos y miofibroblastos.

A lo anterior, se suma que los hGF CL₊P NS también fueron positivos para el PDGFR β , y de forma similar al resto de marcadores se expresó de forma homogénea en la membrana citoplasmática. El PDGFR β juega un papel importante en la producción de ECM y la migración celular, por lo tanto, es importante en procesos como la reparación de los tejidos. Consecuentemente, modular la expresión del PDGFR β en hGF puede favorecer procesos regenerativos, tal como lo demostraron Smirani et al. (275) en cocultivos de células endoteliales de vena umbilical humana y hGF primarios.

Adicionalmente, se indagó el estado de actividad o quiescencia de los hGF CL₊P NS, por medio de la expresión de FAP. En esta investigación, los hGF en cultivo 2D no expresaron la proteína FAP. Este resultado, es coherente con la investigación que de Avery et al. (115) quienes demostraron que la composición y la rigidez de la ECM, así como el TGF β especifican subconjuntos de fibroblastos activados FAP^{Hi/Low} y/o α SMA^{Low/Hi}. En esta investigación, se evidenció que el cultivo de hGF en un sustrato rígido como el poliestireno indujo el fenotipo FAP negativo y α SMA positivo, teniendo en cuenta que los hGF tienen una mayor expresión basal para este último marcador.

Así mismo, se evaluó la expresión de STIM1, el cual es un sensor de varios tipos de estrés celular y además actúa como el principal sensor de las reservas de calcio (Ca²⁺) en el retículo endoplasmático. STIM1, también forma parte de la vía de entrada de Ca²⁺ operada por almacenamiento (SOCE, por sus siglas en inglés), la cual es ubicua en las células y fundamental para funciones esenciales como la diferenciación celular (283). En condiciones de cultivo 2D estándar los hGF CL₊P NS fueron negativos para STIM1, lo cual indican un estado de homeostasis o inactividad celular.

También, se indagó la expresión de Stro-1 con el propósito de establecer la presencia de una subpoblación de MSC con mayor capacidad de proliferación y diferenciación osteogénica en los cultivos de hGF CL₊P NS. De acuerdo con la investigación de Ranga y Subbarayan (284), Stro-1 se expresa en una población de células mesenquimales indiferenciadas de la encía. Sin embargo, en la presente investigación la inmunotinción de los hGF CL₊P NS mostró que las células eran negativas para Stro-1, lo cual sugirió que las células aisladas correspondían a un nicho de células diferenciadas. Estos resultados son coherentes con la investigación de Yang et al. (285) donde se informó un nivel de expresión de Stro-1 inferior al 10% en MSC cultivadas con DMEM o α MEM en cualquier fase. Adicionalmente, Stro-1 tiende a desaparecer rápidamente durante la expansión *in vitro*.

Igualmente, es importante considerar que se han identificado al menos 350 genes candidatos potencialmente relacionados con la etiología de las hendiduras craneofaciales, así como la desregulación de la expresión de varios miRNA (238,239). Varios de estos genes y miRNA codifican y regulan la expresión de factores de transcripción, factores de crecimiento y algunos están involucrados en la señalización

celular y el metabolismo de nutrientes y xenobióticos (286, 287). Hasta el momento, ninguno de los marcadores que se utilizó en esta investigación para identificar hGF se ha relacionado con la etiopatogenia del CL \pm P NS. Por lo tanto, se considera que la expresión de estas moléculas en hGF CL \pm P NS es similar a la expresión en hGF de pacientes sin hendiduras.

Para concluir, la mucosa masticatoria es una fuente valiosa de células autólogas para la medicina regenerativa como se ha reportado en varias investigaciones. Así mismo, el fenotipo de los fibroblastos depende del método de extracción del tejido y de las condiciones de cultivo. En esta investigación, se estandarizó un protocolo para el aislamiento, cultivo y expansión de hGF primarios los cuales exhibieron un linaje mesenquimal y características fenotípicas similares a las MSC. Adicionalmente, y teniendo en cuenta que aún no se ha logrado identificado un marcador específico para fibroblastos, se propone que en conjunto los marcadores Vim, Col1A2, IntB1, PDGFR β y α SMA son potencialmente útiles para identificar poblaciones de hGF.

CAPITULO 4

7. Cultivo y caracterización de esferoides de fibroblastos gingivales humanos

CL ± P NS

Introducción

Además del papel bien conocido de los fibroblastos en el mantenimiento y homeostasis y la remodelación de la ECM después de una lesión, está surgiendo una nueva perspectiva sobre el papel pro-regenerativo de los fibroblastos residentes. En este contexto, los fibroblastos pueden actuar de manera intrínseca o modulando el microambiente del nicho de células madre de varias formas: 1) sintetizando componentes matricelulares, tales como, factores de crecimiento o mitógenos, 2) activando vías de señalización, por ejemplo, Wnt, Hedgehog, y ácido retinoico, 3) proliferando en un período de tiempo temprano y restringido de la lesión, y 4) creando el andamio que guíe la regeneración y la inmunomodulación (273).

El modelo de cultivo 3D estimula las capacidades innatas de las células para reestablecer su ambiente a través de contactos célula-célula, célula-ECM, y de auto ensamblar redes complejas que permiten evidenciar comportamientos celulares similares a los que ocurren *in vivo*. Debido a las características de imitar a los tejidos nativos, los esferoides se consideran un enfoque prometedor para la terapia celular y la TE (288).

La formación de esferoides celulares implica el establecimiento de enlaces complejos homo/heterogéneos de moléculas de adhesión celular, proteínas de la ECM e integrinas, a través de diferentes fases que incluye la agregación, compactación y formación del esferoide a través del autoensamblaje sin necesidad de estímulos adicionales dependiendo del tipo celular. El aumento de la expresión de E-cadherina, actina y microtúbulos es esencial para la formación de esferoides e impulsa las dos primeras fases: agregación y compactación, mientras que los microtúbulos y las FAK están involucrados en la fase de formación o maduración. Posteriormente, la producción y síntesis de una ECM endógena, además de la reorganización de las células y la

migración en la ECM son los principales eventos en la maduración del esferoide celular (289).

Por otro lado, la reorganización de las células dentro de los esferoides, que conduce a su condensación es responsable de la disminución del tamaño con el tiempo y se debe principalmente a la disminución continua en el diámetro de las células individuales, lo que podría ser consecuencia de la adaptación del citoesqueleto (290).

Así mismo, se ha descrito en la literatura que el microambiente y estructura de los esferoides presenta diferentes regiones: la zona de células proliferativas que se ubica hacia la periferia, la zona de células inactivas o quiescentes, que corresponde a una zona intermedia entre la zona proliferativa, y la zona central de hipoxia. En consecuencia, el esferoide presenta diferentes tasas de transporte masivo de nutrientes, oxígeno (O), ATP, desechos, CO₂ y lactasa. Las concentraciones de O, glucosa y factores de crecimiento disminuyen hacia el interior de los esferoides, mientras que el CO₂ y los metabolitos se acumulan en la zona central del agregado celular en esferoides mayores a 500 µm (291).

Por lo tanto, el diámetro del esferoide es una variable importante a tener en cuenta al traducir este enfoque al uso clínico. Si bien los esferoides de MSC se pueden formar con diámetros de hasta 600 µm sin un núcleo hipóxico, los esferoides formados por otras células pueden ser más vulnerables a las limitaciones en el transporte de nutrientes (292). Al respecto, Langan et al. (293) compararon esferoides de diferentes tamaños formados a partir de la línea de fibroblastos de ovario de trucha arco iris RTG-2, e identificaron que los esferoides de mayor tamaño tenían áreas más grandes de necrosis en el centro debido a la baja concentración de oxígeno, además en su estudio el mejor tamaño de esferoide estuvo alrededor de 150 a 100 µm de diámetro, es decir no presentaron limitaciones en la disponibilidad de oxígeno.

El número de células por esferoide también representa un elemento importante en el diseño de enfoques en cultivos 3D. El tamaño de los esferoides se puede optimizar modulando la densidad inicial de células sembradas. Adicionalmente, el tipo de célula y la presencia de aditivos en el medio de cultivo tienen un gran impacto en la formación de esferoides. La optimización de los protocolos permite controlar el tamaño y la forma de los agregados celulares, y mejora la reproducibilidad de la técnica, de esta manera se logran formar esferoides más uniformes y esféricos (294).

Se ha descrito ampliamente en la literatura, que el cultivo de esferoides induce cambios en el metabolismo celular, hacia la glucólisis vs. la fosforilación oxidativa (295). Los cambios en el metabolismo celular, así como los cambios en la forma, el establecimiento de uniones célula- célula y la arquitectura del citoesqueleto generados por la organización 3D, pueden regular el estado epigenético y la señalización celular para promover cambios en el destino celular, (296). Por lo tanto, el cultivo 3D, es una estrategia que proporciona condiciones biofísicas y bioquímicas adecuadas, tanto para la activación de vías de señalización, como para la reprogramación celular de fibroblastos, de acuerdo con las investigaciones realizadas recientemente por Lo et al. (228), Li et al. (246) y Roy et al. (247, 248) ya descritas.

Caracterizar esferoides celulares es necesario para extraer datos biológicos relevantes del modelo, así como para la selección y estandarización de técnicas, métodos y protocolos para la validación de esferoides en ensayos preclínicos. Actualmente, se emplean una variedad de técnicas para estudiar las características de los esferoides, tales como: la morfología, la topografía, el tamaño, la organización celular, la expresión de proteínas y genes, los patrones del ciclo celular entre otras, así como el modelado matemático para predecir su tamaño (249).

7.1. Materiales y Métodos

7.1.1. Evaluación por microscopia óptica

Para realizar este análisis, se cultivaron esferoides de los mismos 7 pacientes con CL_±P NS que se seleccionaron para caracterizar por inmunocitoquímica en cultivo en monocapa, y que se relacionaron en la Tabla 6.

Después de realizar el recubrimiento con agarosa en un plato de 96 pozos se sembraron 5×10^3 células por pozo, para un total de 60 esferoides por paciente. En los pozos ubicados en los bordes de cada plato se adiciono PBS, para tener en cuenta la evaporación del medio y el efecto de borde. La morfología de 18 a 20 esferoides seleccionados aleatoriamente en cada plato se monitoreo cada 24 horas durante diez días. Las imágenes de microscopia óptica se adquirieron con un microscopio invertido

Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss) equipado con una cámara AXIOCAM ERC5S (Micron CMOS Far sensor, 2,2 μm x 2,2 μm pixel size, 8 Bit/Pixel; Carl Zeiss). Se utilizó el software ImageJ v1.53h de código abierto, para realizar las medidas del diámetro, área, perímetro, solidez y redondez por un solo investigador y bajo protocolo, con el propósito de evaluar el comportamiento del tamaño de los esferoides a través del tiempo de cultivo.

7.1.2. Inmunohistoquímica

Los esferoides de fibroblastos gingivales CL₊P NS se cultivaron en un plato de 96 pozos con una densidad de 5×10^3 células por pozo entre 2 a 7 días. Para su procesamiento, se aislaron, lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 45 minutos, fueron permeabilizados con Tritón X-100 en PBS al 0.25% durante 30 minutos, y se bloquearon con albumina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS más Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con los mismos anticuerpos primarios empleados para la caracterización del cultivo 2D a 4°C durante toda la noche con algunos cambios en las diluciones así: Stro-1 (1:50), Vim (1:1000), STIM1 (1:50), Col1A2 (1:1000), α SMA (1:100), Itg β 1 (1:50), FAP (1:150), y PDGFR β (1:20). Finalmente, los esferoides se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios cabra anti-ratón Alexa Flúor 594 (Abcam) y cabra anti-conejo Alexa Flúor 488 (Abcam) en una dilución 1:1000. Los núcleos se tiñeron con DAPI y los esferoides se montaron con Vectashield (Sigma Aldrich) por lo menos 1 hora antes de su visualización bajo microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Las imágenes se obtuvieron con la cámara OptixCam Summit K2 y se procesaron con el software libre Fiji/ImageJ v1.53c (plus) para realizar el análisis cualitativo de expresión de los marcadores. Las inmunotinciones de los esferoides se realizaron por triplicado, y como mínimo en tres experimentos independientes.

7.1.3. Microscopia electrónica de barrido, espectroscopia de energía dispersada y electrones dispersados

Los esferoides fueron cultivados en placas de 96 pozos con una densidad de siembra de 5×10^3 células, y aislados durante diferentes días de incubación (del día 3 al día 21). Para estos análisis, se cultivaron y procesaron esferoides de la mayoría de los pacientes seleccionados previamente. Los esferoides se lavaron dos veces con PBS, antes de ser fijados durante toda la noche en glutaraldehído al 2,5% en solución tampón de fosfato de Sorensen (pH 7,2).

Una vez fijados, los esferoides se lavaron de nuevo con PBS, y a continuación, se deshidrataron por completo en una serie graduada de soluciones de etanol del 50% al 100% y finalmente se secaron. Las muestras se llevaron a una cinta de grafito, y fueron recubiertas con oro para el análisis en un microscopio electrónico de barrido (SEM, por su sigla en inglés) de alto vacío (Denton Vacuum Desk IV) para obtener imágenes de alta resolución. Posteriormente, se seleccionaron zonas de interés de los esferoides de acuerdo con el análisis topográfico realizado previamente en el SEM, para realizar la caracterización química de micropartículas por medio de espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS, por su sigla en inglés). Se identificaron las concentraciones en peso expresado en porcentaje de los elementos químicos presentes en las diferentes zonas de interés de los esferoides. Para finalizar, se realizó el análisis por electrones retrodispersados (EB, por su sigla en inglés) en zonas específicas de los esferoides, y de acuerdo con el análisis de EDS previo. Se utilizaron las mismas muestras para todos los análisis.

7.1.4. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Con el propósito de identificar los componentes básicos estructurales, así como la conformación de las moléculas biológicas más relevantes en la superficie de los esferoides hGF CL_±P NS se realizó en análisis por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR; por su sigla en inglés). Para ello, los esferoides seleccionados se cultivaron con una densidad de 5×10^3 células durante 21 días en dos

platos de 96 pozos. La totalidad de los esferoides fueron aislados y fijados en glutaraldehído al 2,5% en solución tampón de fosfato de Sorensen (pH 7,2) durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados en PBS, fueron llevados a una lámina portaobjeto y secados en horno de aire seco a 50 °C durante 24 horas. Los análisis se realizaron en un espectrómetro infrarrojo Shimadzu IRAffinity-1s del laboratorio de Biopolímeros de la Universidad de Antioquia. Las muestras fueron suspendidas en pastillas de bromuro de potasio (*KBr*) grado espectroscópico, y se analizaron por transmitancia en el rango de número de onda de 500 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos por muestra.

7.1.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software R. Se hizo un análisis descriptivo de medidas de tendencia central, para lo cual se calculó el valor promedio de las variables para cada uno de los paciente durante el tiempo de observación establecido. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre pacientes para cada día de cultivo se realizó la prueba ANOVA de una vía, junto con el test Kruskal-Wallis y el test de Levene. La comparación de medias se realizó con el test de Dunnet y el método de Bonferroni. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. La significancia estadística se fijó en un valor $p < 0.05$.

7.2. Resultados

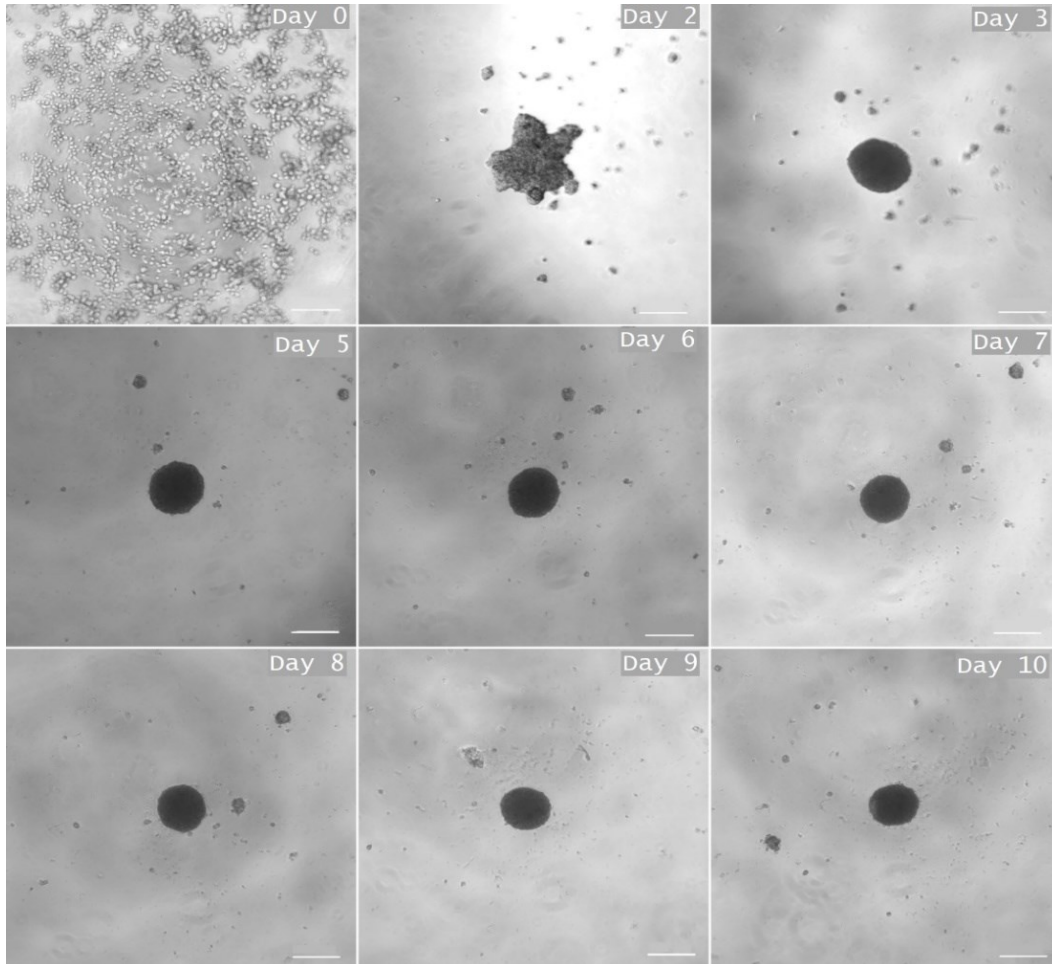
7.2.1. Los *hGF CL* \pm *P NS* formaron esferoides espontáneos con la técnica de superposición de líquidos

Veinticuatro horas después de la siembra, las células se ensamblaron espontáneamente en agregados celulares de forma irregular, y en la mayoría de los casos a partir de las 48 horas iniciaron el proceso de compactación del esferoide. Por lo tanto, debido a la variabilidad individual observada entre las 24 a 48 horas de cultivo, la evaluación de los cambios morfológicos se realizó a partir de las 48 horas y hasta el día

10 de cultivo donde se observó un agregado altamente denso. En la Figura 18. se describen las etapas de formación vs. el tiempo de cultivo de los esferoides.

En general, las células formaron un único esferoide en el pozo; sin embargo, algunas de las muestras formaban esferoides satélites, que se caracterizaron por tener un menor tamaño, pero que finalmente se incorporaron en el esferoide principal. También, se evidenciaron cambios en el tamaño y forma a través del tiempo de cultivo, hasta que los esferoides adquirieron un tamaño estable, alrededor del día 4 de cultivo. Finalmente, todas las muestras incluidas en la investigación formaron estructuras esferoidales con la técnica de superposición de líquidos, y bajo las mismas condiciones de cultivo.

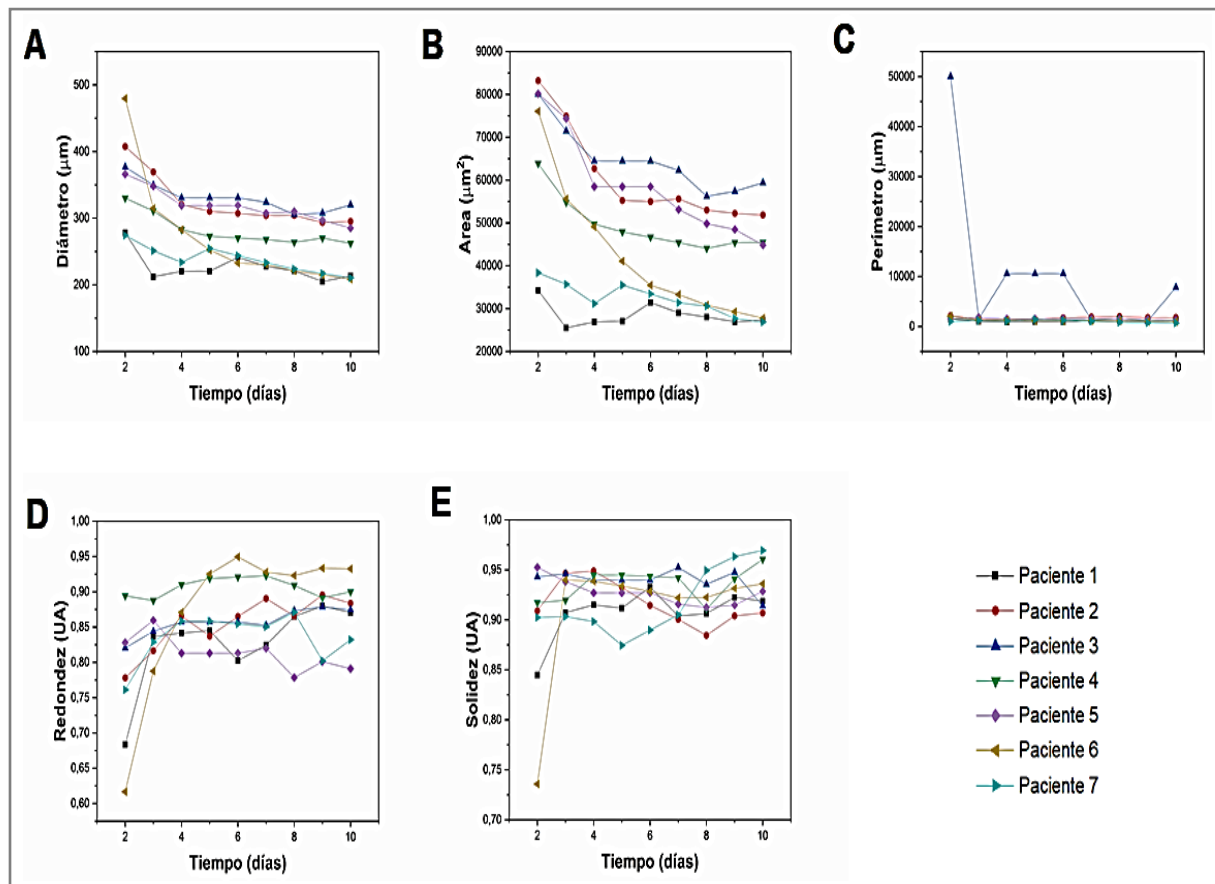
Figura 18. Etapas y cambios morfológicos de los esferoides hGF CL+/-P NS



Nota. Día 0: siembra de la suspensión celular. Día 2: 24 a 48 horas, etapa de agregación celular. Día 3: etapa de condensación, formación de un esferoide celular denso. Día 4 a 5: etapa de compactación esferoidal. Día 6 a 10: esferoide maduro. Barra de escala 200 μ m. Aumento 5X.

Con el fin de evaluar la morfología y el comportamiento de las estructuras esféricas a través del tiempo de cultivo, se calculó la media para las variables: diámetro, área, perímetro, redondez y solidez de 20 esféroides en promedio para cada uno de los pacientes durante los días 2 a 10 de cultivo tal como se muestra en la Figura 19. En términos generales, se evidenció una disminución en el diámetro, el área y el perímetro esférico a través del tiempo, con una tasa global de disminución del diámetro esférico del 28.5% durante los 10 días de cultivo. Así mismo, el diámetro y el área esférica mostraron una tendencia a estabilizarse el día 4 de cultivo para todos los pacientes, sin diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0.05$). El diámetro promedio que se observó el día 4 fue de $290,6 \pm 37,4 \mu\text{m}$, es decir que se consideran esféroides de un tamaño medio.

Figura 19. Tiempo de cultivo vs. morfología de esféroides hGF CL+/-P NS



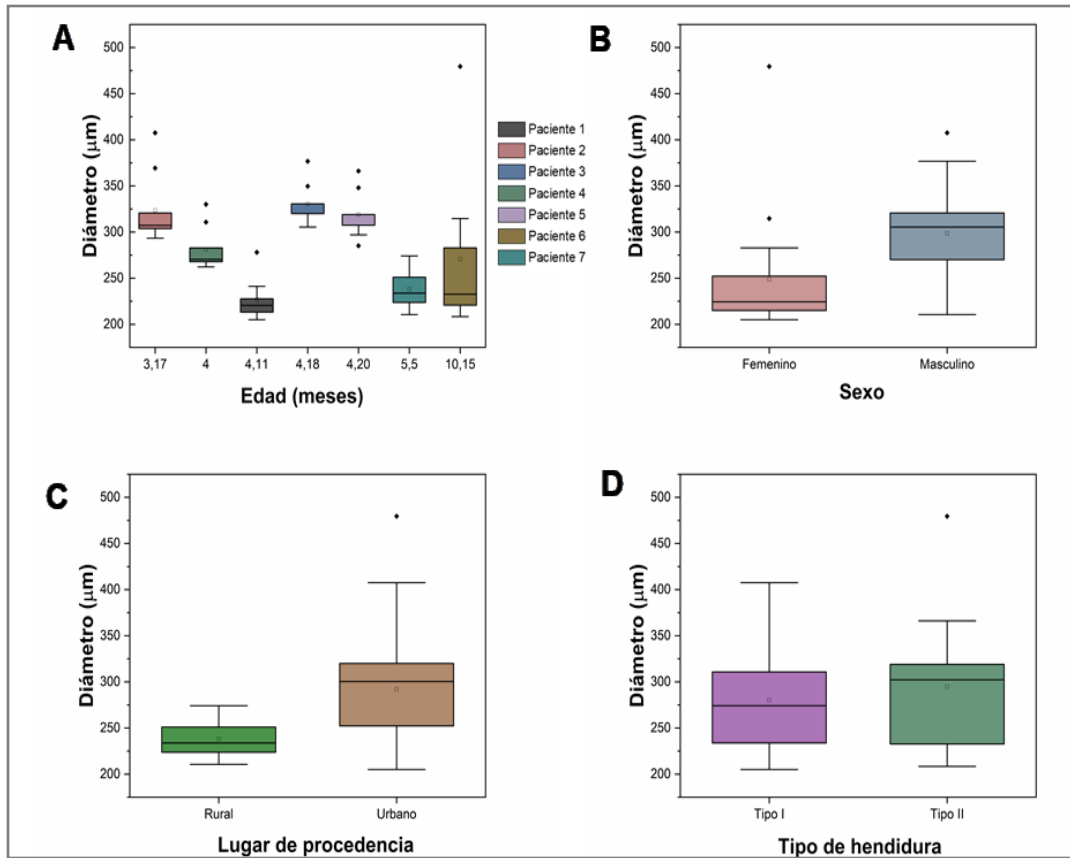
Nota. Cambios morfológicos en los esféroides en: (A). diámetro, (B). área, (C). perímetro (D), redondez y (E). solidez. Densidad de siembra 5.000 células.

El perímetro como indicador de la rugosidad de la superficie disminuyó de forma importante el día 3, y se mantuvo constante durante el período de cultivo restante para la mayoría de los pacientes, excepto para el paciente 3 el cual aumento durante los días 4 a 6 y el día 10 presento nuevamente un pico de crecimiento. Por su parte, la redondez y solidez aumentaron con el tiempo de cultivo. A partir, del tercer día se presentó un incremento importante en la redondez (esfericidad), el cual fue leve pero constante hasta el final del cultivo, para alcanzar valores entre 0,82 y 0,91% (promedio 0,86), lo cual indica una tendencia de forma elipsoidal de la estructura, a causa del desprendimiento de células, o en el caso de los hGF CL+P NS a la gemación de uno o más esferoides secundarios pequeños. Así mismo, la solidez aumento a partir del día 3 y permaneció estable hasta el día 10 de cultivo con valores entre 0,89 y 0,94 indicando una alta concentración celular (Figura 19D, Figura 19E).

Por último, en relación al comportamiento individual del tamaño, y morfología esferoidal a través del tiempo, se observaron diferencias significativas para el paciente 1 y 7, los cuales presentaron para las variables de diámetro, perímetro y área valores inferiores al grupo en general, mientras que el paciente 3 presento en general valores superiores para las mismas variables.

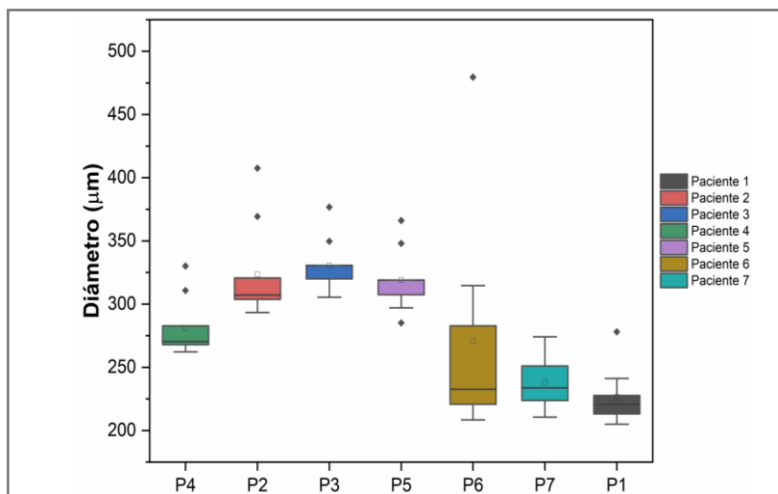
Adicionalmente, la solidez y la redondez presentaron valores similares para todos los pacientes con una tendencia de agrupación. Respecto al análisis del efecto de las variables asociadas a las condiciones individuales de los pacientes, tales como el sexo, edad, procedencia, y el tipo o severidad de la hendidura (Figura 20) vs. el diámetro promedio del esferoide tampoco presentaron diferencias significativas (valor $p < 0.05$), tal como se muestra en la Figura 20. Sin embargo, al comparar el diámetro esferoidal según el sexo, el sexo masculino presento un diámetro promedio mayor frente al femenino (Figura 20B). Al analizar el diámetro promedio esferoidal entre los pacientes tampoco se observó diferencias significativas (valor $p < 0.05$) como se puede observar en la Figura 21.

Figura 20. Variables sociodemográficas vs. diámetro promedio de los esferoides



Nota. Comportamiento del diámetro esferoidal de acuerdo con cada una de las variables sociodemográficas. No se encontraron diferencias significativas (valor $p < 0.05$).

Figura 21. Diámetro promedio esferoidal entre individuos con CL+/-P NS

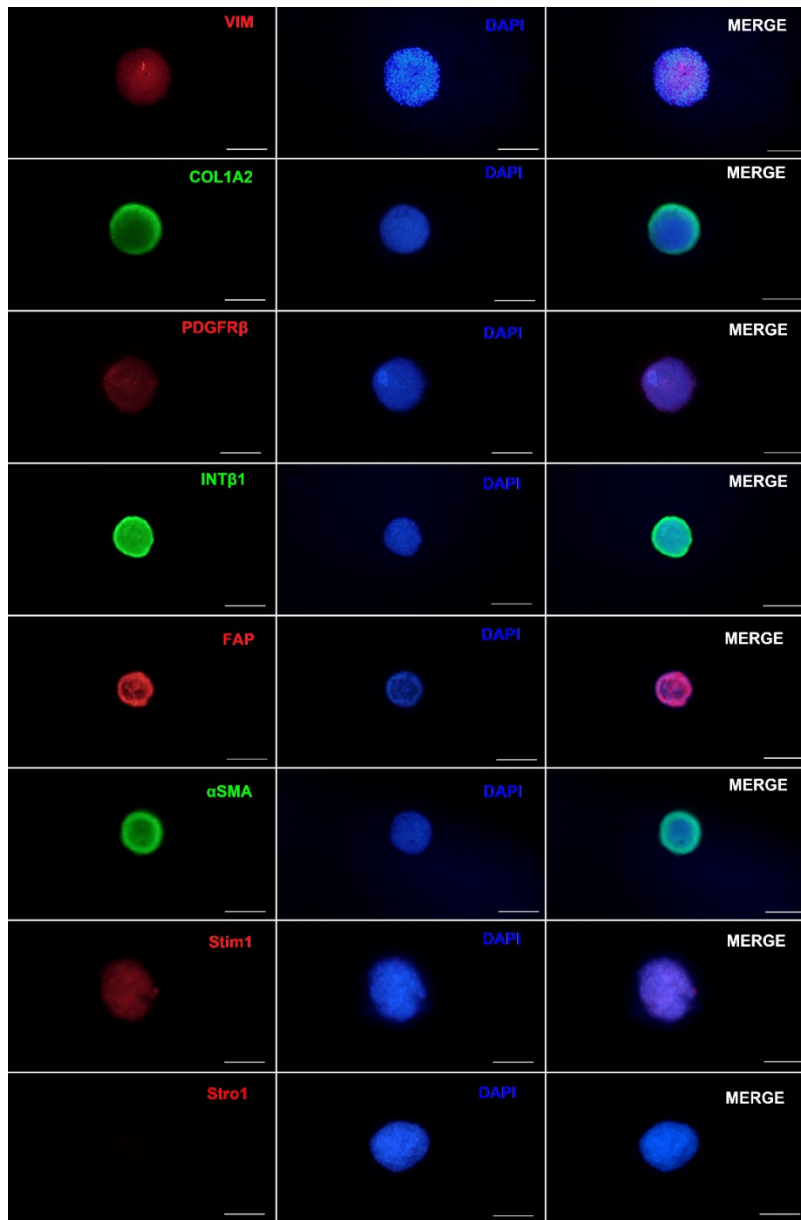


Nota. Comportamiento del promedio diámetro esferoidal para cada uno de los pacientes. No se encontraron diferencias significativas (valor $p < 0.05$).

7.2.2. Los esferoides derivados de hGF CL \pm P expresan marcadores de células activadas y continúan expresando marcadores de linaje mesenquimal

Los esferoides jóvenes (días 3 y 4 de cultivo) en condiciones 3D continuaron expresando los marcadores: Vim, PDGFR β , ItgB1, α SMA y Col1A2 como se observa en la Figura 22.

Figura 22. Análisis por inmunofluorescencia de esferoides de hGF CL \pm -P NS



Nota: Tinción de núcleos con DAPI. Barra de escala 200 μ m. Aumento 10X. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Se presentó una fuerte expresión en la superficie externa del esferoide para los marcadores ItgB1, α SMA y Col1A2 en comparación con la parte central o interna, mientras que Vim y PDGFR β se expresaron de forma homogénea en toda la superficie del esferoide.

Adicionalmente, los esferoides tuvieron una expresión positiva tanto para los marcadores FAP con una mayor intensidad en la superficie externa del esferoide y para STIM1, pero a diferencia de FAP, la expresión de STIM1 fue homogénea sobre la toda la superficie. Así mismo, los esferoides de hGF CL+P NS continuaron siendo negativos para Stro-1.

7.2.3. Los esferoides hGF CL \pm P conforman una estructura altamente cohesiva con depósito de minerales en la superficie

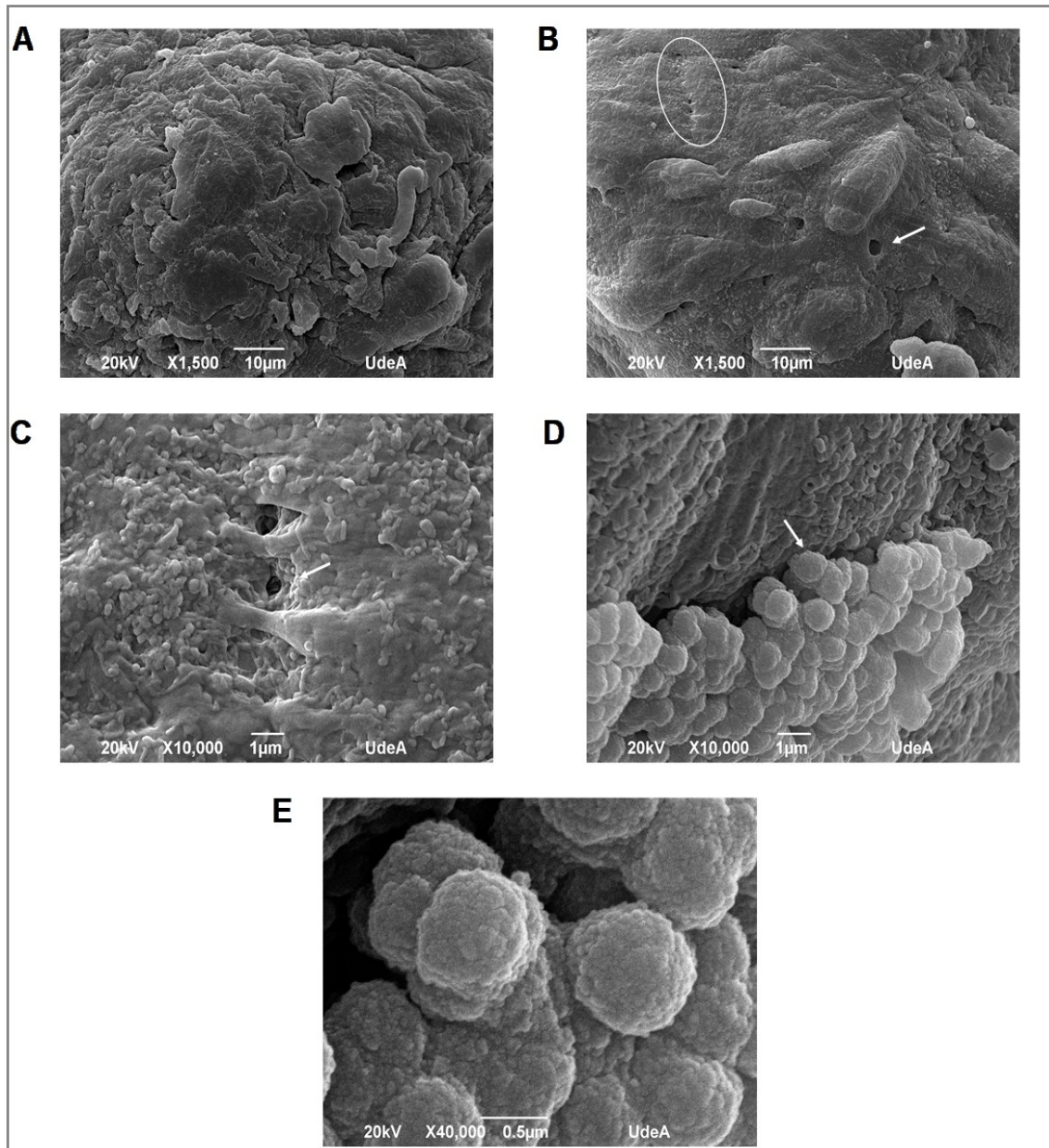
El análisis por SEM permitió evidenciar que la topografía de la superficie esferoidal varió de acuerdo con el tiempo de cultivo. En esferoides jóvenes, se logró observar la presencia de células individuales redondeadas y alargadas incorporándose y rodeando la estructura multicelular (Figura 23A), dando el aspecto de una superficie irregular, mientras que, los esferoides maduros mostraron ser altamente cohesivos con uniones intercelulares muy estrechas, que indujeron el aplanamiento de la superficie a medida que el esferoide se consolidó (Figura 23B). También se observó la presencia de múltiples poros en la superficie esferoidal independientemente del tiempo de cultivo (Figura 23B, Figura 23C). Adicionalmente, se confirmó la reducción en el tamaño de los esferoides, a medida que aumento el tiempo de cultivo.

Como hallazgo importante, se identificó la presencia de múltiples micropartículas esféricas con diámetros que oscilaban entre 0,5 y 0,9 μ m en diferentes zonas de la superficie de los esferoides, y aparentemente el número de estas micropartículas, así como la extensión sobre la superficie esferoidal aumentó dependiendo del tiempo de cultivo (Figura 23D, Figura 23E).

Teniendo en cuenta los hallazgos del SEM, se decidió realizar el análisis de EDS principalmente en las zonas donde fue evidente la presencia de nanopartículas. Los reportes indicaron los niveles de los constituyentes químicos (iones y peso en porcentaje)

para las áreas seleccionadas, en donde se identificaron iones de fosfato y de calcio principalmente.

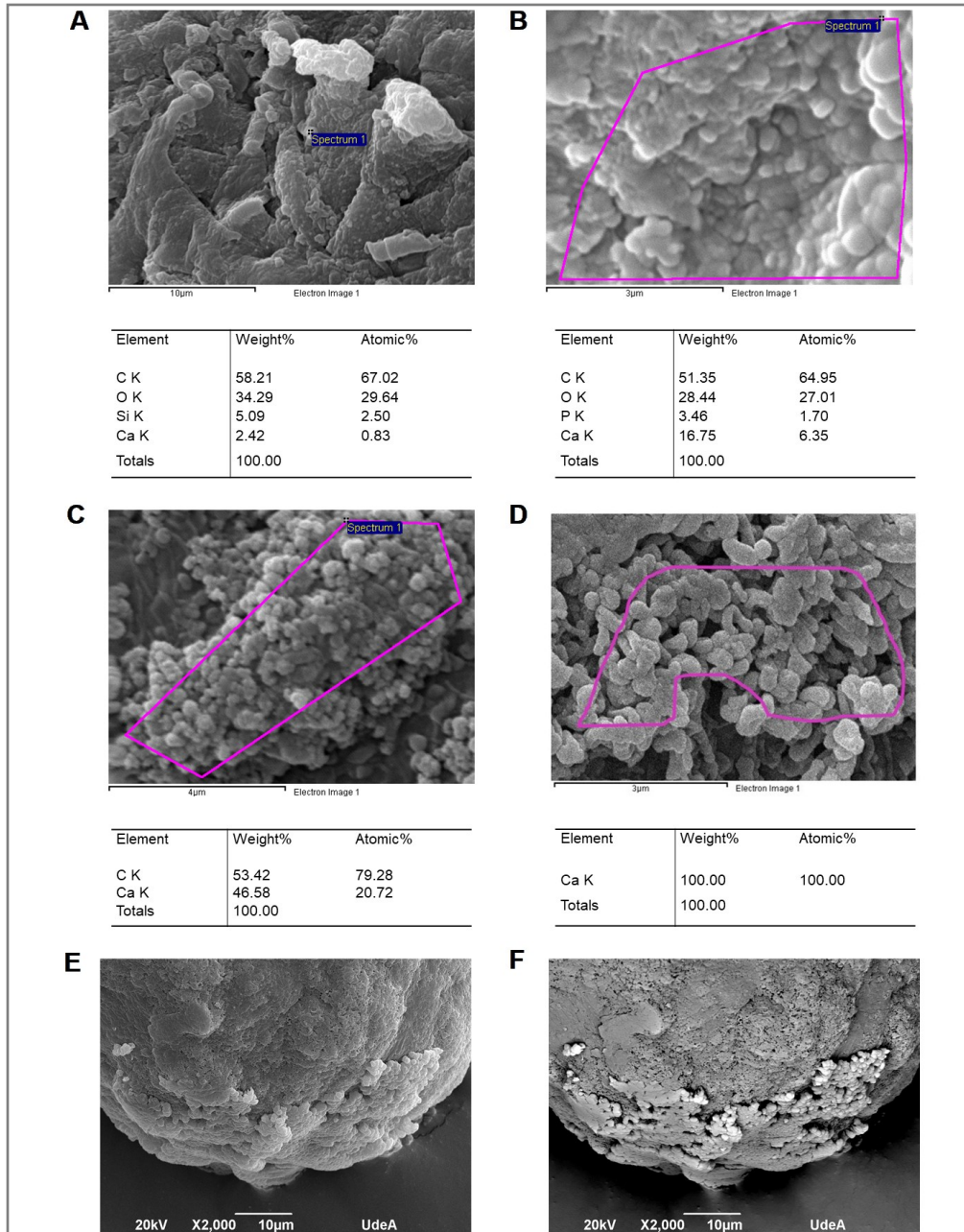
Figura 23. Morfología y tipografía de la superficie esferoidal de hGF CL+/-P NS



Nota. (A). Esferoide joven (día 3 de cultivo) exhibe una superficie irregular. (B). Esferoide con 7 días de cultivo, presenta uniones celulares estrechas (círculo blanco) y múltiples poros (flecha blanca). (C). Con mayor aumento se observan las uniones célula-célula estrechas. (D) y (E). Formación de múltiples micropartículas en la superficie de los esferoide que se indican con la flecha blanca (9 días de cultivo).

Algunas de las imágenes obtenidas junto con el análisis de EDS se presentan en la Figura 24.

Figura 24. Análisis ultraestructural de la superficie esferoidal de hGF CL+/-P NS



Nota. Las microfotografías del SEM mostraron la presencia de micropartículas esféricas en múltiples zonas de la superficie de los esferoides hGF CL+P NS. Los resultados de EDS se presentan en las tablas y muestran los elementos detectados así: carbono (C), oxígeno (O) fósforo (P), calcio (Ca), silicio (Si). (A). 3 días de cultivo. (B). 3 días de cultivo. (C).21 días de cultivo (D). 21 días de cultivo. (E). Imagen de SEM de un esferoide de 9 días de cultivo y (F). Imagen por EB del mismo esferoide de la imagen (E).

En estas imágenes se observan conglomerados de nanopartículas sobre la superficie de esferoides de 3 días de cultivo (Figura 24A) y de 21 días de cultivo (Figura 24B, Figura 24C, Figura 24D) donde se identificó que los iones de carbono (C), oxígeno (O) fósforo (P) y calcio (Ca) constituían las micropartículas. Además, también se evidenció como la relación de peso expresada en porcentaje fue variable para cada uno de los iones dependiendo de la zona analizada. En la Figura 24E se muestra la microfotografía de un esferoide de 9 días de cultivo donde también se observa, pero con menor aumento el cúmulo de nanopartículas depositadas sobre la superficie del esferoide.

Adicionalmente, el análisis de EB del mismo esferoide y que se presenta en la Figura 22F, muestra como la mayor electro dispersión de electrones generó una imagen con mayor brillo en la misma zona donde se ubicaron las nanopartículas, indicando así la formación de una estructura cristalina con elementos químicos más pesados que en el resto de la superficie esferoidal.

En la Tabla 8. se relaciona la totalidad de los datos obtenidos de los análisis de EDS de acuerdo, con el tiempo de cultivo de cada una de las muestras. En este caso, se puede observar cómo varió el porcentaje para cada uno de los iones. Por ejemplo, para el (Ca) se encontraron porcentajes entre el 100% y el 2.8%, mientras que, para el (P) solo se pudo identificar en una de las muestras en un bajo porcentaje en peso (3.46%). Igualmente, el (C) y el (O) presentaron valores muy similares que variaron entre el 58,81% y el 28.44% en peso.

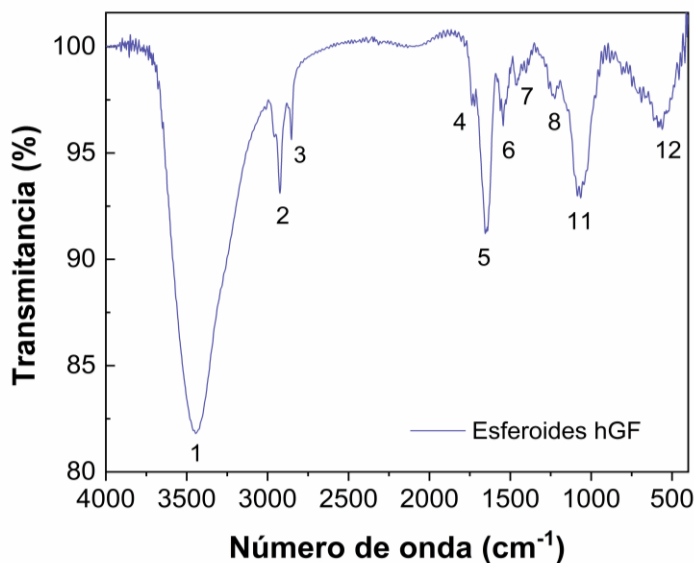
Tabla 8. Iones identificados en la superficie esferoidal de hGF CL+/-P NS

<u>Iones %</u> <u>Muestra</u>	<u>C</u>	<u>O</u>	<u>P</u>	<u>Ca</u>	<u>Fe</u>	<u>Día de cultivo</u>
4	51.35	28.44	3.46	16.75		21
3				100.00		21
3	29.73	56.29		13.99		14
3	49.82			50.18		11
3		47.38		26.71	9.38	9
5	58.81	29.65		3.50		7
3	48.43	49.48		2.08		3

7.2.4. El cultivo 3D induce la síntesis de fosfato de calcio amorfo en hGF CL ± PNS

Para corroborar la información experimental obtenida por EDS y por EB, se realizó la FTIR de los esferoides cultivados en condiciones estándar durante 21 días. Esta técnica, debido a su alta sensibilidad, permite obtener información detallada del estado bioquímico de las células y tejidos bajo distintas condiciones. En la Figura 25. se presenta el espectro infrarrojo completo de los esferoides de hGF CL₊P NS, donde se logró identificar bandas relacionadas el agua ligada a la muestra (pico 1) en 3444 cm⁻¹, así como las bandas de los lípidos posiblemente asociados a la membrana celular en el rango de los 3000 - 2700 cm⁻¹ (picos 2, 3 y 4).

Figura 25. Espectro FTIR de los esferoides de hGF CL₊/- NS

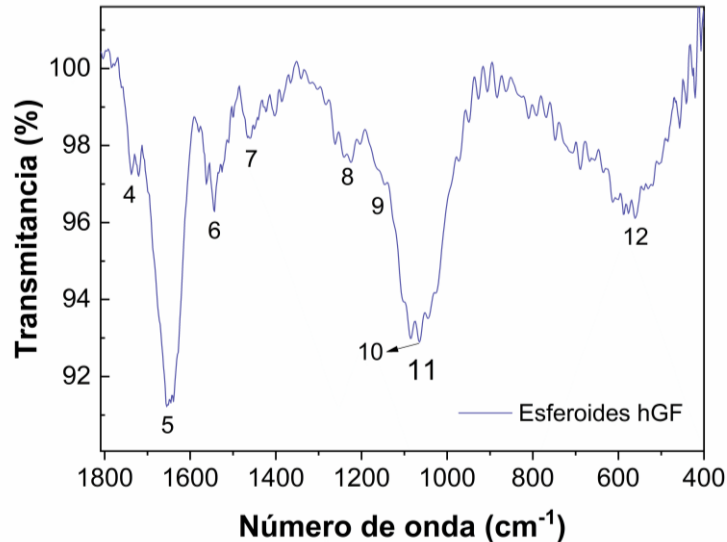


En la Figura 26 se presenta el espectro de la zona de la huella dactilar que comprende de los 1.500 a los 400 cm⁻¹. Así mismo, los grupos funcionales identificados con la correspondiente frecuencia de los picos, y los modos de vibración se describen en detalle en la Tabla 9. y se correlacionan con las moléculas presentes en la superficie de los esferoides, y las microesferas identificadas en el SEM y analizadas por EDS.

Principalmente, se confirmó la presencia de las bandas vibracionales correspondientes a los grupos funcionales fosfatos [PO₄³⁻] (picos 11 y 12), y carbonatos

[CO₃²⁻] (pico 7) de carácter inorgánico. También, se evidenciaron los grupos amidas correspondientes a las proteínas asociadas a la ECM así: amida I en el rango 1712-1591cm⁻¹ (pico 5), las bandas para amida II en el rango 1644-1550 cm⁻¹ (pico 6), y para amida III en el rango 1300-1200 cm⁻¹ (pico 8).

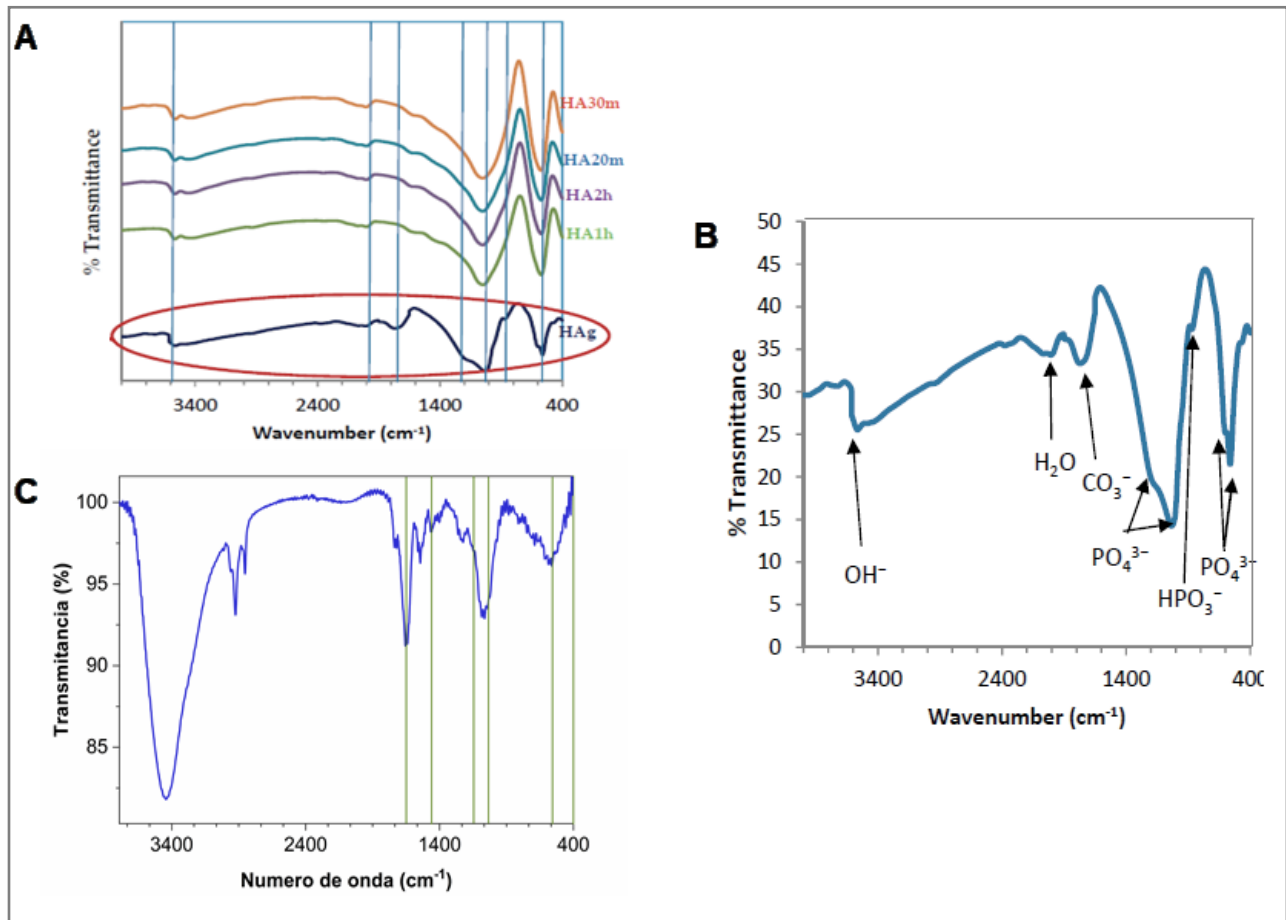
Figura 26. Huella dactilar del espectro FTIR de los esferoides de hGF CL+/-P NS



Adicionalmente, se realizó la comparación de las bandas y los picos del espectro FTIR de los esferoides de hGF CL_±P NS, con el espectro FTIR de hidroxiapatita (HAp) sinterizada en un horno de tecnología asistida por microondas a 1100°C durante diferentes tiempos (2 horas, 1 hora, 30 y 20 minutos), de acuerdo con Shaban et al. (302), tal como se observa en la Figura 27. En resumen, el análisis FTIR y la comparación del espectro de los esferoides hGF con el de la hidroxiapatita, confirma que la composición de las nanopartículas identificadas en la superficies de los esferoides hGF corresponde a fosfatos de calcio amorfo.

Tabla 9. Bandas y picos relevantes del espectro FTIR de esferoides hGF CL+/-P NS

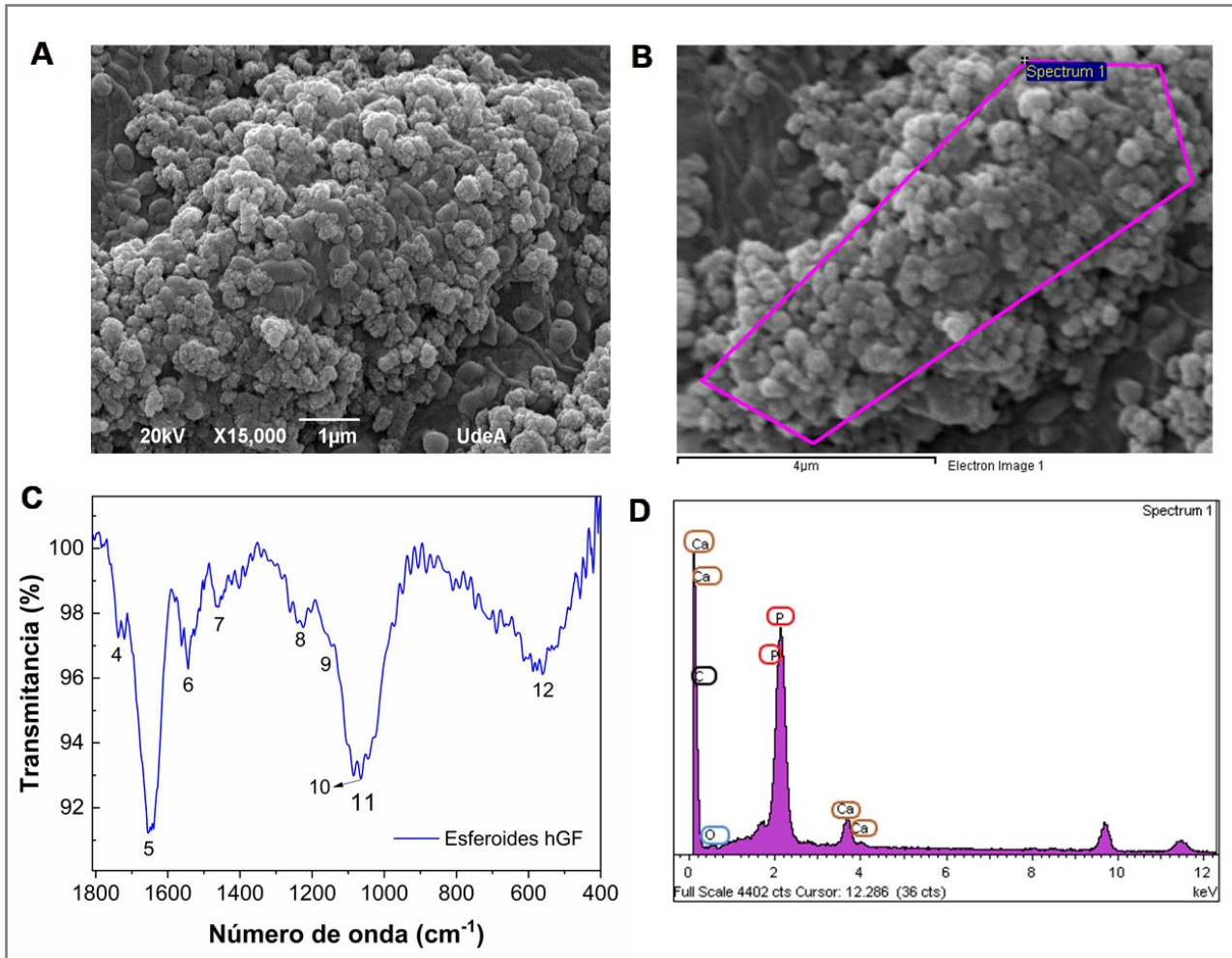
Pico Número	Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupos funcionales	Modo Vibracional	Banda / Picos Referencia	Referencia
1	3444,86	OH	Agua ligada a las muestras		
2	2956,87	CH ₃ Grupos metileno de lípidos celulares	Modo de estiramiento asimétrico CH ₂	Lípidos (3000-2700) 2946-2889	(297)
3	2852,71	Cadenas alquílicas saturadas de lípidos celulares	=CH Modo de Estiramiento	2990-2836	(297)
4	1737,86	COO ⁻ Éster carbonílico de ácidos grasos	C=O Estiramiento de la fracción éster	1740	(297) (298)
5	1649,13	Amida I	C=O Estiramiento	Proteínas (1700 – 1500) 1650	(298) (299)
6	1544,98	Amida II	C–N Estiramiento y N–H flexión	Pico superpuesto (CO ₃ ⁻) 1540-1550	(298) (299)
7	1460,11 1423 y 1404	CO ₃ ²⁻	v ₃ CO ₃ v ₂ CO ₃	Banda notable con picos de alrededor de 1550–1414 cm ⁻¹ Banda notable alrededor de 875 cm ⁻¹	(299) (300) (301) (301)
8	1224,79	Amida III		1240	(301)
9	1143	HPO ₄ ²⁻	v ₃ HPO ₄ ²⁻	1143,1163	(299)
10	1064	Carbohidratos-proteoglicanos	Estiramiento C-O del anillo de azúcar	1060 Pico superpuesto	(298) (300)
11	1192- 935 1064	PO ₄ ³⁻	v ₁ - v ₃ PO ₄ ²⁻	Banda ancha con un máximo alrededor de 1030 cm ⁻¹ y un hombro discreto alrededor de 1095 cm ⁻¹	(298) (299) (300) (301)
12	557		v ₄ PO ₄	Parcialmente en dos picos distintos alrededor de 604 y 563 cm ⁻¹ 569, 590	(299)

Figura 27. Espectro FTIR: hidroxiapatita vs. superficie esferoidal hGF CL+/-P NS

Nota. (A). Espectros FTIR de la HAp sintetizada por tecnología asistida por microondas. Círculo rojo: espectro FTIR de la HAp (corresponde a la imagen B). Verde HAp, HAp convencional sinterizada a 1100°C durante 1 hora (HAp1h) y 2 horas (HAp2h) respectivamente, HAp híbrida de microondas sinterizada a 1100°C para 20 minutos (HAp20m) y 30 minutos (HAp30m) respectivamente. (B). Espectro FTIR de la HAp. Tomado de Shaban NZ et al. (302). (C). Espectro FTIR de los esferoides hGF CL_±P NS.

En la Figura 28. y en la Tabla 10. se presentan de forma secuencial las imágenes y datos obtenidos por SEM, EDS y FTIR de los esferoides hGF CL_±P NS de 21 días de cultivo. En conjunto, los análisis de SEM, EDS, EB y FTIR sugieren la formación y depósito de micropartículas esféricas de fosfatos de calcio amorfo en la superficie de esferoides derivados de hGF CL_±P NS.

Figura 28. SEM, EDS y FTIR de la superficie de esferoide de 21 días de cultivo



Nota. (A). Imagen de SEM. Aumento 15.000X. (B). Imagen EDS de la misma zona fotografiada con SEM. (C). Espectro FTIR de esferoide derivado de hGF CL+P NS. (D). Patrón EDS: Ca: calcio, C: carbono, O: oxígeno, P. fósforo.

Tabla 10. Iones presentes en superficie de esferoide de 21 días de cultivo

Iones	C	O	P	Ca	Total
%	51.35	28.44	3.46	16.75	100.00

7.4. Discusión

El CL₊P NS afecta negativamente la vida de los individuos en múltiples esferas, incluida la salud mental, las condiciones económicas e incluso las relaciones sociales. Además, puede generar un aumento de la mortalidad a lo largo de la vida de las personas afectadas. Teniendo en cuenta la etiología compleja del defecto, en la actualidad se adelantan investigaciones en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos dirigidas a la regeneración de los tejidos afectados por las hendiduras orofaciales (303, 304). Sin embargo, es necesario continuar investigando estrategias y mecanismos moleculares que ayuden a mejorar los resultados de estas intervenciones. Uno de los intentos para simular las condiciones *in vivo*, es la formación de agregados multicelulares 3D, un enfoque que busca recopilar información más precisa simulando las condiciones reales de los tejido.

En esta investigación se reporta por primera vez la formación de esferoides derivados de hGF CL₊P NS utilizando el método de superposición de líquidos con agarosa. Se seleccionó como material de recubrimiento la agarosa debido a que es un polímero de origen natural, biológicamente inactivo, de bajo costo, no tóxico, y que permite manipular su rigidez fácilmente, con el fin de evaluar el potencial regenerativo intrínseco de los hGF.

Los hGF CL₊P NS cultivados en placas recubiertas con agarosa al 1% se autoensamblaron y formaron esferoides. Sin embargo, es importante precisar que al emplear concentraciones de agarosa diferente se afectó la formación de los esferoides celulares, por ejemplo, cuando se usó agarosa en una concentración inferior al 1% las células migraron hacia el fondo de plástico, por el contrario, cuando se usaron concentraciones más altas, las células entraron en apoptosis. Estos resultados, se pueden explicar por los diferentes mecanismos celulares de transducción de estímulos mecánicos, los cuales varían con las características físicas del material como la rigidez, la cual a su vez depende de la concentración del polímero (211). Como lo han demostrado varios investigadores, la rigidez y la porosidad de la agarosa juegan un papel clave en la adhesión, migración y proliferación de diferentes tipos de células y puede afectar la

morfología y motilidad de los fibroblastos. En este sentido, Mirab et al. (305) emplearon agarosa al 2.5% para formar esferoides con células de glioma maligno humano U251, por su parte, Li et al. (306) utilizaron agarosa al 1% para formar agregados multicelulares con células derivadas de folículos dentales humanos. Por lo tanto, se suma evidencia que la agarosa es un sustrato que logra simular la rigidez de los tejidos para inducir respuestas de mecanotransducción celular.

Los esferoides derivados de hGF CL₊P NS alcanzaron la etapa de compactación aproximadamente a las 48 horas de siembra, y la etapa de consolidación, es decir cuando la estructura presentó alta densidad, redondez y solidez, el día 4 de cultivo sin diferencias significativas entre los individuos (Figura 18). Adicionalmente, las variables morfológicas evaluadas (diámetro, área, perímetro, redondez y solidez) tampoco presentaron diferencias significativas entre los individuos durante los 10 días de seguimiento (Figura 19). Por su parte, el análisis del efecto de las variables asociadas a las condiciones individuales de los pacientes, como el sexo, edad, procedencia, y el tipo o severidad de la hendidura (Tabla 6) vs. el diámetro promedio del esferoide no presentaron diferencias significativas (Figura 20). Teniendo en cuenta, que este tipo de análisis relacionado con la formación de esferoides de diferentes individuos, no se ha reportado en la literatura, los resultados de la presente investigación sugieren que el modelo 3D de cultivo de hGF CL₊P NS es altamente reproducible independientemente de la condición del donante, y posiblemente puede llegar a ser útil como método de diagnóstico/pronóstico para las hendiduras craneofaciales, y para modelar la enfermedad *in vitro*.

En relación a la viabilidad del esferoide, los estudios realizados por Nath et al. (307) y Koudan et al. (308) reportaron que esferoides con un tamaño mediano garantizan la difusión de oxígeno y nutrientes en la región central de los agregados manteniendo la integridad del esferoide; por el contrario, cuando los esferoides tienen un tamaño mayor de 450 μm disminuye el transporte por difusión de oxígeno y nutrientes hacia las células densamente agrupadas en la región central provocando mayor riesgo de desarrollar centros hipóxicos, que conducen a la necrosis celular y la desintegración del esferoide.

En la presente investigación, el diámetro inicial promedio de los esferoides fue de $358,90 \pm 72,83 \mu\text{m}$, y el diámetro promedio el día 10 de cultivo fue de $261,44 \pm 41,5 \mu\text{m}$, es decir que, con la estandarización del protocolo descrito se logró obtener esferoides de

tamaño mediano. Este resultado, sumado a la evaluación por SEM y el seguimiento realizado por microscopia óptica indicaron una viabilidad hasta por 30 días de los esferoides hGF CL₊P NS, tiempo suficiente para ensayos que requieran cultivos a largo plazo.

Otro compartimiento que se observó en el cultivo 3D de los hGF CL₊P NS fue el decrecimiento gradual del diámetro a través del tiempo, que es consistente con reportes de esferoides formados a partir de fibroblastos primarios de diversos tejidos sanos. Esta característica, se puede relacionar con la remodelación progresiva de la ECM y la adaptación del citoesqueleto celular, de acuerdo con la investigación de Deynoux et al. (309). Así, como con la investigación de Koudan et al. (308) donde se describió el decrecimiento del diámetro de esferoides de hDF primarios, el cese de la proliferación y la adopción una forma esférica durante todo el periodo de observación de 9 días.

Contrario a los esferoides derivados de fibroblastos humanos, los esferoides derivados de otro tipo de células, tales como la línea celular de carcinoma colorectal HT-29 (310), células derivadas de hepatoma HepG2 (311), y la línea celular de cancer de mama MCF-7 (312) proliferaron generando un aumento gradual y constante del diámetro esferoidal, lo cual reflejó alteraciones del ciclo celular, la proliferación e indiferenciación propias de las células cancerígenas. Cabe anotar, que en estas investigaciones también se utilizó la técnica de superposición de líquidos con agarosa.

Los criterios para seleccionar esferoides óptimos para terapias avanzadas varían en función de los objetivos del estudio y son de gran importancia a la hora de traducir este enfoque en la clínica (288, 290). Algunos estudios seleccionan los esferoides según la viabilidad celular (313, 314) o el tamaño (288, 291), mientras que otros estudios los seleccionan de acuerdo con la máxima proliferación y una mínima apoptosis (314), así como con la producción de citoquinas angiogénicas (315) entre otros factores tróficos. Variables como la densidad celular inicial de siembra (316, 317) y el tiempo de incubación (271,272) se modifican para lograr el esferoide óptimo. En esta investigación, se optimizó la densidad celular de siembra inicial para controlar el tamaño y la forma de los agregados celulares y así, reproducir la formación de esferoides de hGF con la técnica de superposición de líquidos (262).

De acuerdo con estos hallazgos, Nithiananthan (153) y Chukkapalli y Lele (318) demostraron que Vim, α SMA, Col1A2 e Itg β 1 forman parte de la maquinaria celular adaptativa de los procesos de mecanotransducción de fibroblastos en respuesta a las características físicas de la ECM. Del mismo modo, los esferoides de hGF CL \pm P NS en las primeras etapas de formación (día 2 a 4 de cultivo) continuaron expresando los marcadores mesenquimales Vim, Col1A2, Itg β 1, α SMA y PDGFR β (Figura 22), estos marcadores mostraron una distribución específica en la estructura del esferoide.

La Vim se distribuyó uniformemente en la zona central de los esferoides hGF CL \pm P NS. De acuerdo con la investigación de Hu et al. (319), los filamentos intermedios de Vim proporcionan a las células mesenquimales una red de citoesqueletos que les permite adaptarse y mantener la integridad y viabilidad celular en condiciones extremas. Por lo tanto, la Vim participa activamente durante la deformación y el estrés oxidativo al que se someten los hGF en un entorno 3D.

Diferente al cultivo 2D, los esferoides fueron positivos para FAP (Figura 22). Estos resultados concuerdan con la investigación realizada por Avery et al. (115), en la que los cambios en el entorno mecánico produjeron cambios tanto funcionales, como en el perfil de expresión génica para subconjuntos de fibroblastos activados por FAP y/o activados por α SMA durante el desarrollo, la regeneración y la remodelación de los tejidos, demostrando una vez más la capacidad adaptativa y la plasticidad de los hGF.

Los resultados de la presente investigación también mostraron, que el cultivo de hGF CL \pm P NS en un sustrato con baja rigidez como la agarosa (5-100 kPa) promovió la expresión de FAP y α SMA, por el contrario, una ECM rígida como el poliestireno (3×10^6 kPa) indujo el fenotipo α SMA. Es importante destacar que aún no se han reportado mutaciones de nucleótidos o polimorfismos para estos marcadores que se relacionen con la etiología de las hendiduras craneofaciales (287). En consecuencia, se cree que la expresión de estas moléculas en hGF CL \pm P NS es similar en los hGF de individuos sin hendiduras. Aunque, el papel fisiológico de la FAP aún no se ha establecido claramente, se sabe que está regulada positivamente durante la remodelación fisiológica de los tejidos, la cicatrización de heridas y la inflamación crónica, además de procesos como el cáncer y la fibrosis.

La evaluación de los marcadores Col1A2 y FAP en los esferoides fue evidente con una mayor intensidad en la zona externa del esferoide, mientras que en la zona central se atenuó. Por lo tanto, se considera que la expresión de FAP en etapas tempranas de los esferoides hGF CL_±P NS está relacionada con la remodelación de ECM, involucrando activamente a Col1 en el cambio progresivo del tamaño del esferoide (320).

Por su parte, la Itgβ1 se comportó de forma similar al Col1A2, mostrando una mayor expresión en la zona periférica (Figura 22), lo cual es consistente con su función biológica de unión a ECM. Estos resultados son similares a los obtenidos por Morimoto y Kunii (321) y Gupta y Johansson (322) quienes reportaron un aumento de la expresión de Itgβ1 y la formación de esferoides compactos derivados de fibroblastos debido a una contracción celular más fuerte, lo cual también se refleja en la disminución gradual del tamaño de los esferoides.

Las interacciones funcionales de estas moléculas en los esferoides aún no se han evaluado ampliamente. Sin embargo, estos resultados se pueden explicar por el proceso de MET, al que se sometieron los hGF para recapitular su origen ectomesenquimal y formar esferoides altamente compactos. La reprogramación que se evidenció en hGF CL_±P NS juega un papel importante en la formación espontánea de esferoides, un proceso que difiere cuando la agregación celular se induce por métodos mecánicos (333).

Como ya se mencionó, con el propósito de establecer la presencia de una subpoblación MSC dentro de los cultivos celulares 2D y 3D de hGF CL_±P NS, se evaluó la expresión del marcador Stro-1. Los resultados mostraron que los hGF CL_±P NS en cultivo 2D y 3D fueron negativos para Stro-1, lo cual sugiere un fenotipo del nicho de células diferenciadas (284).

Por su parte, las imágenes obtenidas por SEM mostraron cómo los esferoides hGF CL_±P NS exhibieron una superficie cada vez más lisa y continua (Figura 24A, Figura 24 C, Figura 24D) a medida que maduró la estructura 3D. Según Lin et al. (334) los cambios en la apariencia de la superficie esferoidal se han atribuido a la alta secreción de ECM por parte de las células en la zona periférica del esferoide. Esto también se verificó en este estudio con los resultados positivos de inmunofluorescencia obtenidos para Col1A2, Itgβ1 y FAP.

Asimismo, se evidenció la presencia de poros en la superficie de los esferoides (Figura 23B, Figura 23C). Se considera que los poros permiten la difusión de nutrientes y oxígeno garantizando la viabilidad de las células en toda la estructura. La formación de interacciones célula-célula cercanas también fue evidente (Figura 23B). Aunque, no se determinó la naturaleza de las uniones, estas modulan múltiples cascadas de señalización que en última instancia determinan la morfología y el comportamiento de las células individuales y el esferoide en su conjunto (308).

Otro de los resultados interesantes en la inmunotinción de los esferoides hGF CL_±P NS fue la expresión positiva de STIM1 de forma homogénea en toda la superficie esferoidal, este marcador se indagó con base en los resultados preliminares de SEM y EDS. Tanto, STIM1 como algunas de las proteínas de su interactoma se ha relacionado con la reorganización del citoesqueleto y respuestas de mecanotransducción en fibroblastos, de acuerdo con la investigación de Gammons et al (335).

El Ca²⁺ induce la activación de múltiples vías de señalización celular, ya sea solo o junto con otras señales químicas o físicas, tales como el estiramiento de la membrana nuclear. La deformación celular puede desencadenar el aumento citoplasmático y/o nucleoplásmico de la concentración de Ca²⁺, a través de canales catiónicos mecanosensibles ubicados en la membrana plasmática o el retículo endoplasmático y activar canales iónicos como Piezo1. En términos generales, los canales iónicos mecanosensibles a menudo están conectados a la mecanotransducción de la superficie celular, sin embargo, estudios recientes sugieren que la deformación celular también controla los canales mecanosensibles en el retículo endoplasmático a través de la deformación nuclear. Este hecho, puede permitir la entrada de Ca²⁺ a través de mecanismos dependientes de Stim/ Orai-1. Sin embargo, aún se desconoce cómo la mecánica nuclear regula la liberación de Ca²⁺ intracelular, y la evidencia sugiere que este mecanismo puede ser específico del tipo de célula (336).

Adicionalmente, Chen et al. (337) demostraron el papel fundamental de la entrada de Ca²⁺ mediada por STIM1/Orai-1 durante la diferenciación odontogénica de las MSC de pulpa dental, por medio de la liberación de exosomas para la mineralización de la ECM.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la expresión de STIM1 en hGF CL_±P NS se puede relacionar con los resultados de los análisis por SEM, EDS, EB y FTIR (Figura 23., Figura 24., Figura 25.) que en conjunto mostraron la formación de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo en la superficie de los esferoides (Tabla 9.). Estos depósitos de minerales fueron aumentando a medida que aumento el tiempo de cultivo, así mismo la relación Ca/P fue variable entre las zonas del esferoide (Figura 24.). Estos hallazgos se informan por primera vez en esta investigación, y además sugieren la inducción de un fenotipo mineralizante de los hGF CL_±P NS en cultivo 3D.

El análisis de FTIR (Figura 26) permitió identificar los grupos funcionales fosfatos (PO₄³⁻) y carbonatos (CO₃²⁻) en la superficie de los esferoides hGF CL_±P NS similar a los rangos de banda reportados por Querido et al. (298, 299). Así mismo, los resultados de otras moléculas como lípidos y amidas de la fase orgánica esferoidal correspondían a los picos y bandas reportados en la literatura (Tabla 9).

Estos métodos son altamente específicos y sensibles, diferente a las tinciones no específicas que se emplean de forma rutinaria para evaluar depósitos minerales en procesos de diferenciación celular, tales como como la alizarina roja y la tinción de Von Kossa. Por lo tanto, se destaca el uso de estas técnicas para evaluar los procesos de mineralización de células y tejidos *in vitro*.

Los resultados de la presente investigación también se asemejan a los de Hara et al. (338) quienes evaluaron los proceso de mineralización temprana mediada por osteoblastos durante la osificación intramembranosa de la calvaria de ratones, un proceso similar a la mineralización del paladar en humanos. Por medio de SEM, EDS y microscopia electrónica de transmisión los autores describieron una alta compactación de la células y la expresión de uniones comunicantes de Cx43, seguido por el depósito de fosfato de calcio amorfo en “vesículas de matriz” hacia el espacio intercelular.

Asi mismo, las investigaciones más recientes acerca de la diferenciación osteogénica de MSC humanas en cultivo 3D, con o sin la adición de factores externos como medios de diferenciación o moléculas inductoras muestran algunas similitudes con el cultivo 3D de hGF CL_±P NS. Por ejemplo, las investigaciones realizadas por Kim y Adachi (339, 340) demostraron que la condensación celular que ocurre en cultivo 3D es igual o más importante aún, que la inducción química para que las células experimenten

diferenciación osteogénica al recapitular el proceso de condensación mesenquimal durante la osificación. Adicionalmente, las condiciones de hipoxia y la despolimerización de la actina favorecieron el proceso de diferenciación celular.

Así mismo, la ultraestructura de los esferoides hGF CL₊P NS es muy similar a la superficie de los esferoides de una línea celular de osteoblastos que Gaitán-Salvatella et al. (341) reportaron mediante la técnica de levitación magnética. En este caso, el SEM mostró un estrecho contacto entre las células y la formación de una red tridimensional de pequeñas estructuras que indicaron el depósito de una ECM mineralizada como se puede observar en el Anexo 3.

En resumen, los resultados de la presente investigación sugieren que los esferoides hGF CL₊P NS adquieren un fenotipo mineralizante como consecuencia de la organización 3D donde intervienen múltiples moléculas asociadas con la adhesión y condensación celular, así como la reorganización del citoesqueleto y la posible activación de canales iónicos, que finalmente se traducen en cambios en la homeostasis del Ca²⁺ y la activación de la entrada de Ca²⁺ operada por SOCE.

Por lo tanto, y debido a las limitaciones del presente estudio es necesario evaluar el papel de STIM1/Orai1 como uno de los posibles mecanismos, que medie procesos de diferenciación celular y mineralización de la ECM via biomecánica en hGF en cultivo 3D. Así como, evaluar la expresión cuantitativa de los marcadores mesenquimales, tanto en etapas tempranas como avanzadas del cultivo 3D, y la expresión de marcadores de células pluripotentes en los hGF, la cual fue reportada por Lo et al. (228) en fibroblastos dérmicos en cultivo 3D.

CAPITULO 5

8. Evaluación de los cambios en la expresión génica de los fibroblastos gingivales de CL ± P NS en cultivo 3D

Introducción

La embriogénesis, particularmente la formación del tercio medio de la cara implica una serie de eventos sincronizados y complejos que conlleva a interacciones entre un amplio número de moléculas, y diferentes tipos y comportamientos celulares que intervienen en el crecimiento, la estructura y el patrón de los procesos faciales. Las células mesenquimales que hacen parte de los procesos faciales derivan de las células de la cresta neural craneofacial, de igual forma los fibroblastos comparten el mismo origen, y contribuyen al crecimiento de los procesos faciales a través de la actividad proliferativa y la secreción continua de ECM previo a su fusión (342).

Investigaciones recientes como las de Chiquet et al. (343), Wang XM. et al. (344), Pang X. et al. (345) han estudiado la relación entre diferentes moléculas de la ECM y las respuestas de mecanotransducción celular durante la embriogénesis del paladar. Específicamente, Chiquet et al. (343) sugirieron que la reorientación de las regiones palatina media y posterior es inducida por la contracción celular mediada por integrinas, el citoesqueleto de actina y la activación de la vía RhoA/ROCK, junto con cambios en la composición de la ECM asociados a los patrones de expresión espacio temporal de la TNC y la Mmp-13, y el aumento de la rigidez dentro de los procesos palatinos. Por su parte Wang et al. (344) determinaron en un modelo murino, que la sobreexpresión de β -catenina inducida por el cloruro de litio, un agente farmacológico empleado en el tratamiento de trastornos psicóticos, retrasó la elevación de los procesos palatinos al alterar la síntesis del citoesqueleto de actina F mediada por Cdc42 en el mesénquima palatino. Finalmente, Pang X. et al. (345) investigaron el papel de la β -catenina mesenquimal en el desarrollo del paladar por medio de un modelo murino knockout condicional de β -catenina (Sox9CreER; Ctnnb1 F/F). Los ratones knockout mostraron

retraso en la elevación del paladar, además de una proliferación celular anormal y supresión de la señalización Wnt canónica mesenquimal, así mismo, la polimerización de la actina F se redujo significativamente.

Estas investigaciones dan cuenta de la complejidad de los mecanismos de mecanotransducción durante la embriogénesis del paladar, sin embargo, se requiere más investigación para comprender cómo estos eventos pueden afectar el desarrollo del paladar. Así mismo, las vías de mecanotransducción se consideran objetivos probables para el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y/o terapéuticas (46). En este contexto, es necesario investigar nuevos enfoques terapéuticos basados en la bioingeniería tisular.

Se ha establecido ampliamente que las propiedades del microambiente celular juegan un papel crucial en la regulación de la identidad celular a través de cascadas de mecanotransducción, que en última instancia afectan la forma y estructura nuclear y, por ende, el estado epigenético. Diversos factores biomecánicos en el microambiente incluyendo la nanotopografía local, la rigidez del sustrato, la presentación del ligando, así como la geometría de las células y los tejidos, juegan un papel determinante en el proceso final de inducción del destino celular. Los primeros cambios durante la reprogramación celular tienen que ver con la activación de genes responsables de la organización del citoesqueleto y la reorganización de la cromatina (237). A medida que las células interactúan con sustratos definidos, que promueven la formación de esferoides, las células se someten a una reorganización del citoesqueleto, lo cual induce cambios en la forma y plasticidad del núcleo celular. Finalmente, los cambios en la mecánica nuclear conducen a la reorganización 3D de la cromatina, el perfil epigenético y, lo que es más importante, el perfil de transcripción de las células (243).

Se considera que el cultivo 3D tiene la capacidad de imitar la especificidad característica del tejido nativo y simular las condiciones fisiológicas mejor que los cultivos 2D convencionales. Específicamente, los fibroblastos en respuesta al cambio del entorno biomecánico del cultivo 3D cambian el perfil de expresión génica, sin la adición de otros estímulos, tal como lo demostraron Chen et al. (346) al comparar el perfil de expresión de fibroblastos humanos de prepucio en cultivos 2D vs. 3D por medio de RNAseq. Los resultados demostraron un cambio de más de 2 veces en los niveles de expresión de los

genes que fueron evaluados. Los genes con aumento en la expresión correspondían principalmente a factores de transcripción, factores de crecimiento, proteínas de señalización o proteínas involucradas en el ensamblaje cromosómico. Los genes regulados negativamente estaban relacionados con el control del ciclo celular, la organización del citoesqueleto, y la morfogénesis de la estructura celular, la síntesis de ECM y los péptidos señal.

Por su parte, Lo et al. (228) compararon el transcriptoma de cultivos en monocapa y de esferoides derivados de hDF, también con la técnica de RNAseq. Los resultados fueron similares al estudio de Chen, et al. (346). En el cultivo 3D, los genes con aumento en la expresión correspondían a factores de transcripción, proteína quinasas, proteínas relacionadas con la regulación de la expresión génica, transducción de señales y diferenciación. Los genes con una disminución en la expresión correspondían a proteínas de la ECM, el citoesqueleto, y genes relacionados con la adhesión celular.

Se ha descrito de forma general, que durante el proceso de formación de esferoides la señalización ECM-célula se pierde a favor de la señalización del contacto célula-célula con el subsecuente aumento de la actividad de la vía PI3K/Akt, lo cual induce la sobreexpresión de *Tbx3*, y de genes asociados a pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*, y *NANOG*) adicionalmente, aumenta la expresión de genes asociados a la MET (*REX1*, *FGF4*, y *DPPA2*) y se disminuye la expresión de genes asociados a la EMT, eventos que relacionados con la reprogramación celular (347, 348).

La evidencia actual, muestra cómo el cultivo celular 3D induce respuestas de mecanotransducción y eventos celulares relacionados con la reprogramación celular, lo cual implica cambios en el perfil de transcripción de las células, por lo tanto, en esta investigación se realizó el análisis comparativo de la expresión génica de hGF CL₊P NS en cultivo 2D y 3D con el fin de explorar la modulación de un panel de genes diana relacionados con la ECM (*COL1A1*, *TNC*), vías de mecanotransducción (*ACTA2*, *ITGA5*, *ITGB1*, *BMP2*, *VCL*, *RHOA*, *CTNNA1*) y marcadores de precursores osteogénicos (*ALPL*, *RUNX2*, *WNT3a*, *SPP1*), que puedan explicar los hallazgos obtenidos por medio de los análisis de SEM, EDS, EB y FTIR de los esferoides derivados de hGF CL₊P NS, y de esta forma orientar su implementación en enfoques de ingeniería de tejidos para la

reconstrucción de los tejidos craneofaciales, o que sirvan como una herramienta de pronóstico para el tratamiento del CL₊P NS.

8.1. Materiales y métodos

8.1.1. Extracción de RNA de las células en cultivo monocapa y de esferoides

Para realizar el análisis de expresión génica, se utilizaron las muestras de los mismos 7 pacientes seleccionados previamente de forma aleatoria. Se aisló el RNA total del cultivo en 2D y 3D con el Kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células en 2D se cultivaron de manera estándar y se aislaron 500.000 células de cada una de las muestras. Por su parte, el cultivo 3D se realizó en platos de 24 pozos con una densidad de siembra de 3×10^4 células por pozo y en el día 4 de cultivo se aisló la totalidad de los esferoides presentes. Las células se lavaron con PBS, y se centrifugaron dos veces a 800 g por 5 minutos.

Posteriormente, las células provenientes de los cultivos 2D y 3D se resuspendieron en 350 μ L y 700 μ L de buffer RTL respectivamente. El pellet de esferoides se homogenizó previamente con un pestle, y luego se realizó vortex a las muestras por 1 minuto. A continuación, se adicionó 1 volumen de etanol al 70% para obtener una solución 1:1 y se resuspendió por 30 segundos antes de transferir el volumen total a la columna RNeasy. Se centrifugaron las columnas a 12000 rpm por 30 segundos. En estas mismas condiciones se realizó un lavado con buffer RW1, y posteriormente se agregó el buffer RPE para realizar dos lavados, el primero con 700 μ L y el segundo lavado con 500 μ L centrifugando a 12000 rpm por 30 segundos. Luego, se adicionaron 50 μ L de agua libre de RNasas y se centrifugó a 14500 rpm por 1 minuto. Al finalizar el proceso de extracción, las muestras se llevaron al termociclador a 60° C por 5 minutos para aumentar la solubilidad del RNA y eliminar la posible contaminación con etanol. El RNA aislado se trató con DNasa I (Thermo Fisher Scientific), la proporción RNA - DNasa I se mantuvo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se procedió a cuantificar el RNA. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

8.1.3. Evaluación de la cantidad y calidad del RNA

La cantidad y pureza del RNA se evaluaron con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para cada medición, se utilizaron 2 μL de RNA y 2 μL del blanco (agua grado molecular). Las relaciones de absorbancia A260nm/A280nm, y A260nm/A230nm fueron medidas. Valores entre 1,9 a 2, y 2 a 2,3 respectivamente se consideraron para RNA aislado puro y sin proteínas. La concentración de RNA se calculó en ng/ μL . Se obtuvo para las muestras de hGF CL+P NS en la relación A260nm/A280nm valores entre 1,7nm y 2nm y para la relación A260nm/A230nm valores entre 1,7nm y 2,2nm, por lo tanto, se seleccionaron las muestras con mejor calidad. La cantidad de RNA que se logró extraer en promedio para los cultivos en monocapa fue de 250 ng/ μL , y para los cultivos 3D entre 11,2 ng/ μL y 18,3 ng/ μL .

Para evaluar la integridad del RNA se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE. Para el análisis se tomaron 3 μL de RNA y se mezclaron con 1 μL de buffer de carga (Invitrogen), para realizar la tinción se utilizó GelRed (Biotium) al 1%. La presencia de subunidades ribosómicas 28S y 18S se evaluó de acuerdo con el marcador de peso molecular de DNA de 1 kilobase (GeneOn) como se observa en la Figura 29.

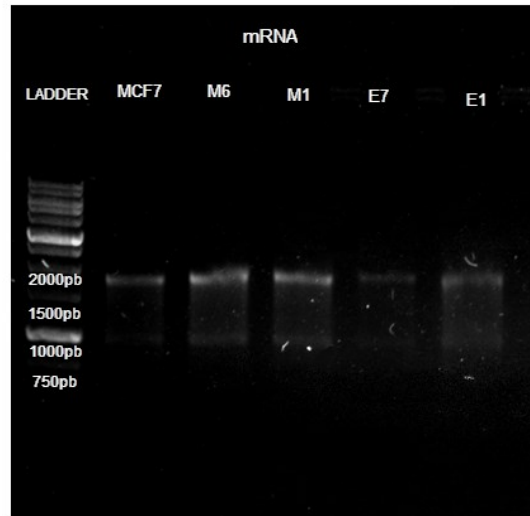
Las condiciones de la corrida fueron 80 voltios durante una hora. Las imágenes se adquirieron con el fotodocumentador XR de Bio-Rad. Como control se emplearon células de la línea MCF-7, y el proceso de extracción de RNA se realizó bajo las mismas condiciones.

8.1.2. Síntesis de cDNA por transcripción inversa

El RNA total de cada muestra (aproximadamente 350 ng) se transcribió en cDNA utilizando el kit de síntesis de cDNA Applied Biosystems High Capacity (Thermo Fisher Scientific) con la enzima MultiScribe. La síntesis de cDNA se realizó en un termociclador Verity Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) de 96 pozos. Cada 20 μL de la mezcla de reacción de cDNA contenía 10.0 μL de 2X RT buffer Mix (dNTP, octámeros aleatorios y oligo dT-16), 1.0 μL de 20X RT Enzima Mix, y hasta 9 μL de muestra de RNA, para finalizar se aforo con agua libre de nucleasas. La transcripción inversa se realizó

bajo siguientes condiciones: primer paso a 25 °C por 10 minutos, segundo paso a 37 °C durante 120 minutos, tercer paso de inactivación enzimática a 85 °C durante 5 minutos, y el paso de finalización a 4 °C.

Figura 29. Análisis en gel de agarosa de la calidad del RNA extraído de hGF



Nota. Las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S son visibles en las muestras de cultivo 2D y 3D así: MCF-7 línea celular control, M1 y M2 cultivos 2D, E7 y E5 cultivos 3D de hGF CL₊P NS

8.1.3. Diseño de primers

Todos los primers fueron evaluados utilizando el software de código abierto en línea Primer-BLAST. Los números de acceso de los genes obtenidos y verificados en la base de datos de nucleótidos Genbank fueron utilizados en la herramienta Primer-BLAST donde se establecieron los parámetros para los primers para la PCR en tiempo real (qRT-PCR), para obtener una longitud de producto máximo de 200 pares de bases con un contenido de guanina y citosina entre 40 - 60%, y temperaturas de fusión entre 57 y 60°C. En la Tabla 11. se presentan los detalles de los primers empelados.

Tabla 11. Secuencias de primers utilizados en cultivo 2D y 3D de hGF CLP+/-P NS

Genes	Secuencia	Producto (pb)	Referencia
Matriz extracelular			
<i>COL 1A1</i>	Forward 5'- CCCCAGCCACAAAGAGTCTAC-3' Reverse 5'- TTGGTGGGATGTCTTCGTCT-3'	150	(349)
<i>TNC</i>	Forward 5'-CAACCTGATGGGGAGATATGGGGA-3' Reverse 5'-GAGTGTTTCGTGGCCCTCCAG-3'	78	(167)
Mecanotransducción			
<i>ACTA2</i>	Forward 5' -GCCAAGCACTGTTCAGGAATC- 3' Reverse 5' -TTGTCACACACCAAGGCAGT -3'	80	Primer BLASTS
<i>BMPR2</i>	Forward 5' -GACTGTCCATGAGGCTGACTG -3' Reverse 5' -CTGATAGTGCCAACCTCGCTT -3'	85	Primer BLASTS
<i>ITGA5</i>	Forward 5'- AAGACTTTCTTGCAGCGGGA- 3' Reverse 5'- GCCACCTGACGCTCTTTTTG- 3'	122	(350)
<i>ITGβ1</i>	Forward 5' -ACGCCGCGCGGAAAAGATGAAT -3' Reverse 5'- CCACCCACAATTTGGCCCTGCTT- 3'	157	(351)
<i>VCL</i>	Forward 5' -CTGAACCAGGCCAAAGGTT-3' Reverse 5' -GATCTGTCTGATGGCCTGCT-3'	78	(35 +1)
<i>RHOA</i>	Forward 5' -AGAGGTGTATGTGCCACAGTGTT-3' Reverse 5' -AGGCGATCATAATCTTCCTGCCCA-3'	114	(352)
<i>CTNNB1</i>	Forward 5' -GAGGACAAGCCACAAGATTACA -3' Reverse 5' -CCAAGATCAGCAGTCTCATTCC -3'	101	(353)
Marcadores de osteoprogenitores			
<i>ALPL</i>	Forward 5'- CTATCCTGGCTCCGTGCTCC -3' Reverse 5' -TTAACTGATGTTCCAATCCTGCG -3'	82	Primer BLASTS
<i>RUNX2</i>	Forward 5'- GACCAGTCTTACCCCTCCTACC-3' Reverse 5'- CTGCCTGGCTCTTCTTACTGAG-3'	190	(354)
<i>WNT3a</i>	Forward 5'-TGACTCGCATCATAAGGGGC-3' Reverse 5 -GTGGTCCAGGATAGTCGTGC-3'	181	(355)
<i>SPP1</i>	Forward 5'- CAACAAATACCCAGATGCTGTGGC-3' Reverse 5'- GGACTTACTTGAAGGGTCTGTGG-3'	94	(356)
Housekeeping genes			
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTA -3' Reverse 5'- GGCCATCCACAGTCTTCTGAG-3'	120	(357)
<i>RPL27</i>	Forward 5'-TGAAACCTGGGAAGGTGGTGC-3' Reverse 5'-TCTTGGCGATCTTCTTCTTGCC-3'	180	(358)

8.1.4. PCR convencional

La especificidad de amplificación de cada uno de los genes de interés relacionados con la ECM, la mecanotransducción, y marcadores de osteoprogenitores en los cultivos 2D y 3D de hGF CL_±P NS fue verificada por medio de PCR convencional

Se incluyeron los genes Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el gen de la proteína ribosómica 60S L27 (RPL27) como control de todas las reacciones. Como control positivo se emplearon células madre aisladas de medula ósea (BM-MS) tratadas bajo las mismas condiciones de las muestras.

Se utilizó el kit GoTaq DNA polimerasa (Promega). Cada reacción se realizó en un termociclador Verity Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). Por cada 20 μ L de reacción se adicionaron 4 μ L de buffer 5X Green Go Taq PCR, dNTPs 1,0 μ L (para una concentración final de 0.2mM por cada dNTP), 1,0 μ L de cada primer para una concentración final de 0,2 μ M en la reacción, GoTaq DNA polimerasa 0.10 μ L, plantilla de cDNA de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, es decir 2ng/ μ L, y se completó el volumen de la reacción con agua libre de RNAsas.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, un segundo paso de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, luego el alineamiento por 30 segundos a la temperatura específica para cada par de primers, y un paso de elongación a 72 °C por 30 segundos, se programaron 35 ciclos, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 minutos, y el paso de finalización a 4°C. Adicionalmente, se realizó una rampa de temperatura de melting de los primers para seleccionar la temperatura adecuada en las reacciones.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis para la cual se cargó 3 μ L del producto de PCR mezclado con 1.5 μ L de buffer de carga (Invitrogen), para la tinción se utilizó GelRed (Biotium) al 1%. Los tamaños de los productos de PCR fueron determinados mediante comparación con un marcador de peso molecular de 1000 a 50 pares de bases (GeneOn) en un gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X a 70 voltios durante 60 minutos. Las imágenes se adquirieron con el fotodocumentador XR de Bio-Rad.

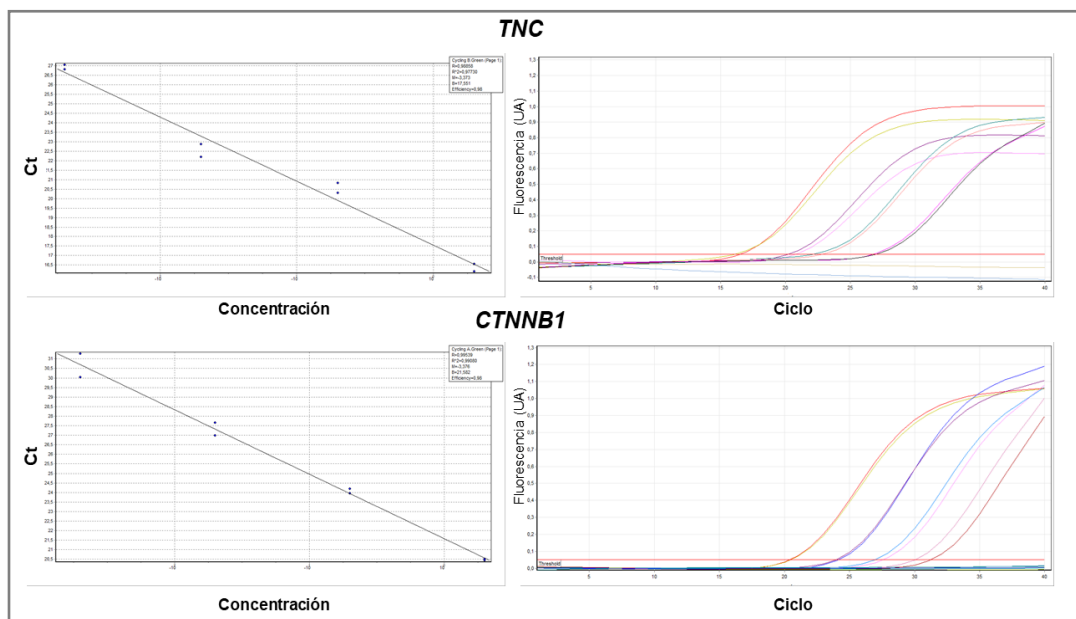
8.1.5. Validación de los primers por PCR en tiempo real

Se realizaron experimentos preliminares a la qRT-PCR para cada uno de los primers seleccionados, con el fin de determinar la eficiencia de amplificación. Se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green (Qiagen) y el termociclador RotorGen Q 5-Plex HRM (Qiagen)

con software de procesamiento v2.3.1. Se realizó una recta de calibración a partir de una muestra aleatoria de cDNA. Por cada 20 μL de reacción se adicionaron 10 μL de buffer 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1,2 μL de cada primer para una concentración final de 0,3 μM en la reacción, cDNA en diluciones seriadas 1:10 partiendo de una concentración de 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de la siguiente forma: 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 0,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 0,02 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 0,002 $\text{ng}/\mu\text{L}$, en agua libre de RNAsas, cada reacción se realizó por duplicado.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un primer paso de hot start de 95 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, un segundo paso de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, luego el alineamiento por 30 segundos a la temperatura específica para cada par de primers, y un último paso de elongación a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos durante 40 ciclos de amplificación. Se considero adecuado un rango de eficiencia de reacción entre el 95% y el 100%. En la Figura 30 se presentan como ejemplo las rectas de calibración de los genes TNC y CTNNB1, con las respectivas graficas de amplificación de las diluciones empleadas.

Figura 30. Rectas de calibración de la qRT-PCR

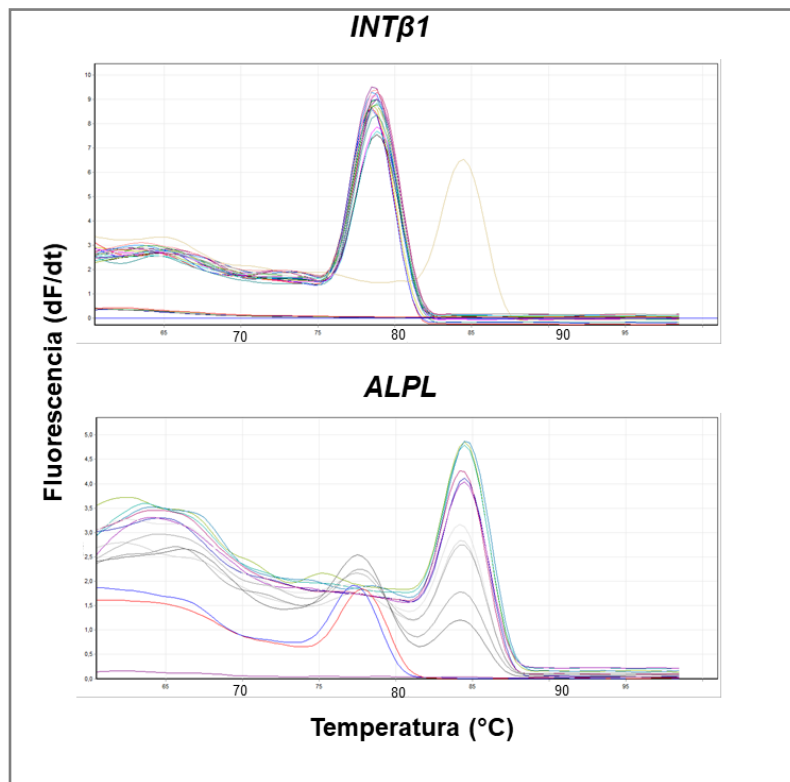


Se adicionó un paso final de rampa de melting, en el cual se eleva la temperatura de la reacción un grado centígrado cada 5 segundos, desde 60 $^{\circ}\text{C}$ hasta 99 $^{\circ}\text{C}$, con el

propósito de verificar la temperatura de melting del amplicón, y confirmar que solo se estaba amplificando un objetivo para diferenciar la formación de dímeros de primers que pueden interferir con la cuantificación del amplicón.

En la Figura 31. se presentan dos ejemplos de las curvas de disociación donde se observa un solo pico de temperatura de melting de los amplicones en 78,6 °C, lo cual indica un producto de tamaño único de amplificación del gen de la *ITGβ1*, mientras que, en la curva de amplificación del gen de la *ALPL* se observan dos picos, el primero a 78°C que corresponde a la formación de dímeros de primers, que por lo general presentan una temperatura de fusión mucho más baja que la del amplicón, y un segundo pico a 84,8 °C que en este caso corresponde a la amplificación del gen *ALPL*.

Figura 31. Curvas de disociación de los genes *ITGβ1* y *ALPL*



8.1.6. Genes normalizadores o housekeeping genes

Se utilizó la herramienta on line RefFinder, que permite introducir los datos de los Ct obtenidos en la qRT-PCR para realizar el análisis de la estabilidad de los housekeeping genes (HKG) por medio de los software Bestkeeper, Normfinder, Genorm y Delta Ct simultáneamente. Se evaluó el comportamiento de la expresión de los genes *GAPDH* y *RPL27* en los cultivos 2D y 3D, con el objeto de seleccionar el mejor gen normalizador.

Los resultados aparecen directamente como gráficas, donde se presenta de izquierda a derecha los genes que fueron más estables a los menos estables. Además, Reffinder también utiliza sus propios algoritmos para proporcionar un ranking con los genes más estables en función del análisis obtenido con los tipos de software mencionados.

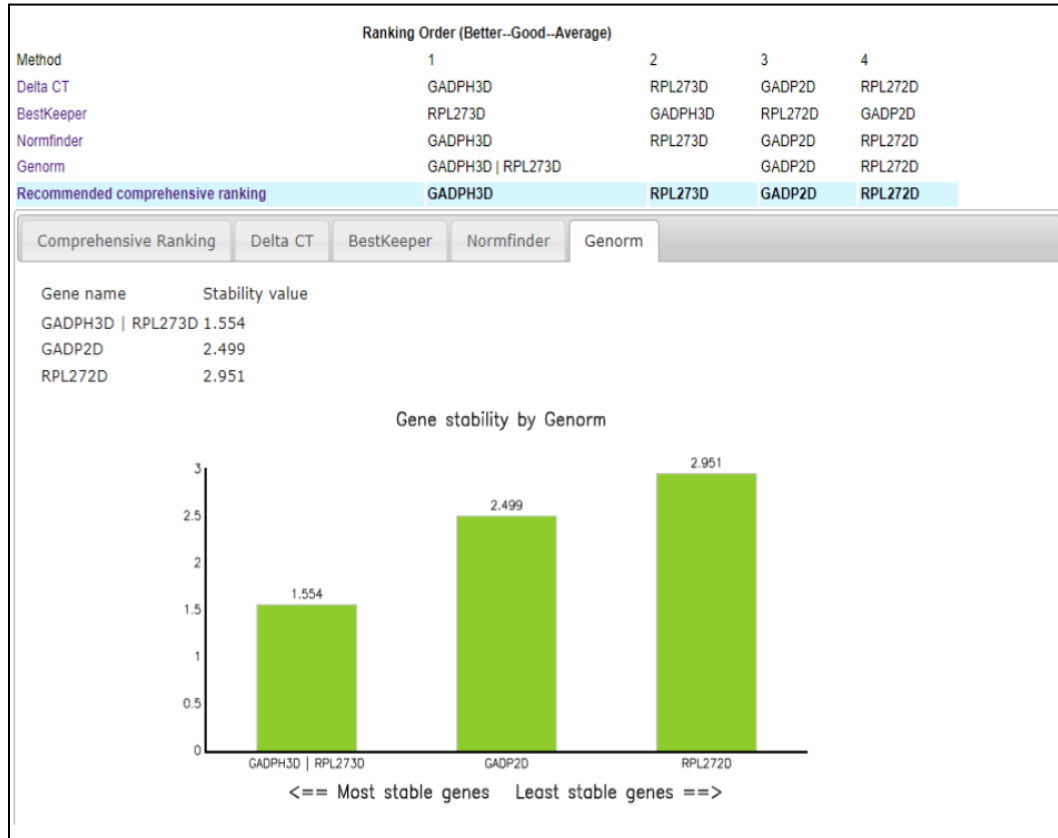
Se evidenció que la expresión de *GAPDH* y *RPL27* fue muy variable entre las muestras y entre las formas de cultivo 2D y 3D. Sin embargo, la expresión conjunta de *GAPDH* y *RPL27* fue más estable en el cultivo 3D, además de presentar un aumento en la expresión relativa para los dos genes. Adicionalmente, y con base en los análisis ejecutados con la herramienta RefFinder, específicamente el resultado que proporcionó el software Genorm, el cual asignó un promedio de estabilidad similar para los genes *RPL27* y *GAPDH* en cultivos 3D, así como un valor de mayor estabilidad para el gen *GADPH* en cultivo 2D frente al gen *RPL27* como se observa en la Figura 32 se tomó la decisión de utilizar el promedio de los Ct obtenidos para *RPL27* y *GAPDH* como valor normalizador.

8.1.7. PCR en tiempo real y análisis de los niveles de expresión génica

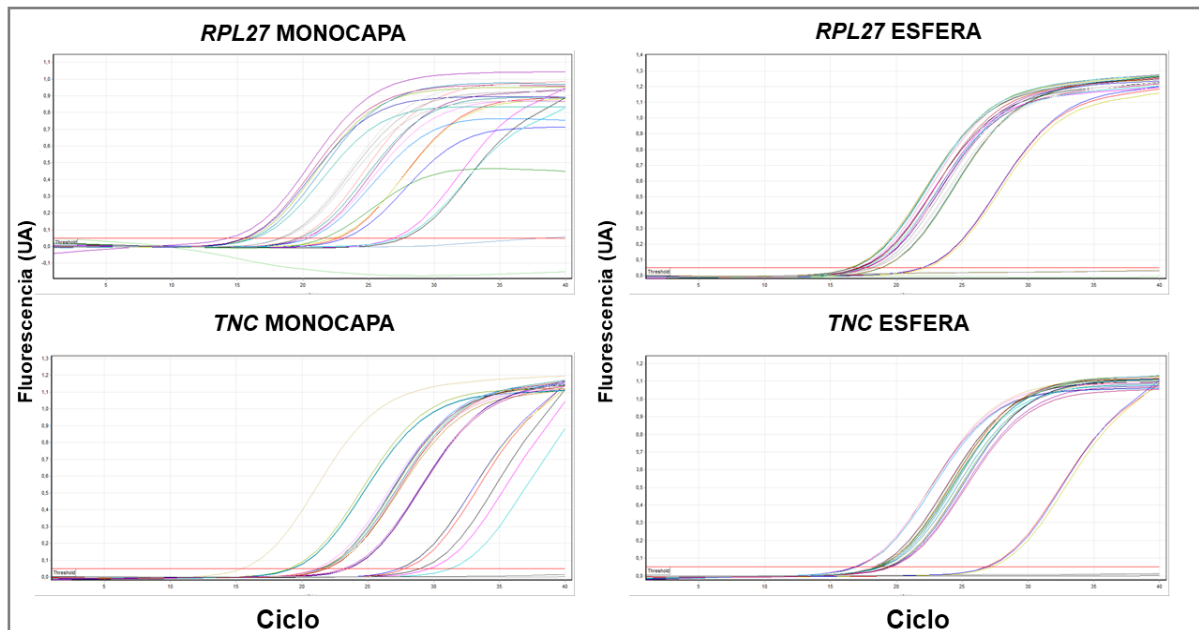
Para evaluar los niveles de expresión de los genes diana, y de acuerdo con los resultados de las rectas de calibración se seleccionó la concentración de 0,2 ng/μl de cDNA. Como ya se mencionó, se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) y el termociclador RotorGen Q 5-Plex HRM (Qiagen) con un disco rotor 36, y el software de procesamiento v2.3. Por cada 20 μL de reacción se adicionaron 10 μL de buffer 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1,2 uL de cada primer (para una

concentración final de 0,3 μM), cDNA de acuerdo a la recomendaciones del fabricante, y se aforo con agua libre de RNAsas, cada reacción se realizó por triplicado.

Figura 32. Resultados del análisis RefFinder para *GAPDH* y *RPL27*



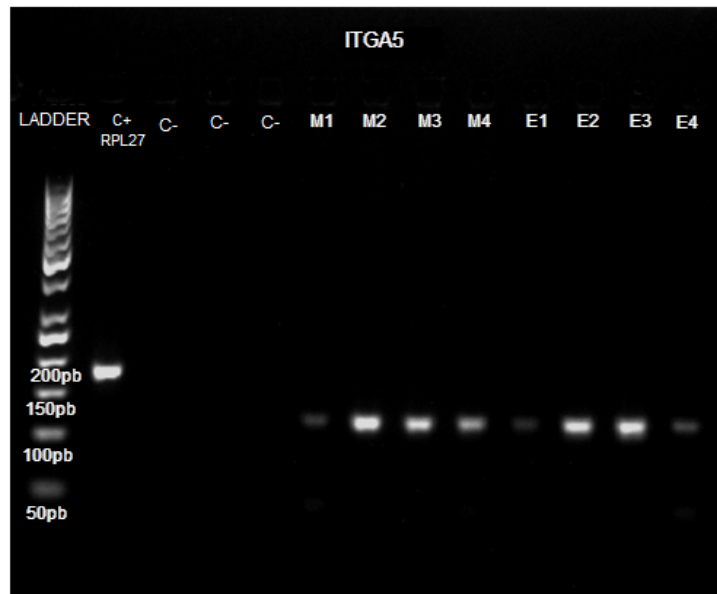
Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un primer paso de hot start de 95 °C por 15 minutos, un segundo paso de desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, luego el alineamiento por 30 segundos a la temperatura específica para cada par de primers, y un último paso de elongación a 72 °C por 30 segundos. Se programaron 40 ciclos para los pasos de desnaturalización, alineamiento y elongación. En la Figura 33. se presentan como ejemplos, las curvas de amplificación obtenidas para los genes *RPL27* y *TNC* en cultivos 2D y 3D.

Figura 33. Gráfica de amplificación de los genes *RPL27* y *TNC* en cultivos 2D y 3D

Se empleó el método del doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) para calcular la relación de expresión de cada muestra en las dos condiciones de cultivo. Los valores de la temperatura teórica de melting, la temperatura de melting en la reacción para cada uno de los amplicones, así como el valor del threshold, y la eficiencia de reacción para cada gen se presentan en el Anexo 2.

8.1.8. Verificación de productos de qRT-PCR

De forma aleatoria, se seleccionaron algunos productos de la qRT-PCR para verificar el tamaño del amplicón por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en TBE 1X, a 70 V durante una hora, y tinción con Gel Red (Biotium). En este caso se empleó un marcador de peso molecular de DNA de 1000 a 50 pares de bases (Thermo Fisher Scientific) como se presenta en la Figura 34. Las imágenes se adquirieron con el fotodocumentador XR de Bio-Rad. Todos los procedimientos incluyeron controles negativos y positivos apropiados.

Figura 34. Análisis en gel de agarosa de los amplicones de la qRT-PCR

Nota. El gel de agarosa evidenció el tamaño de 122 pb de los amplicones de la qRT-PCR para el gen *ITGA5* así: M1, M2, M3, M4: muestras de cultivo 2D; E1, E2, E3, E4: muestras de cultivo 3D.

8.1.9. Análisis estadístico

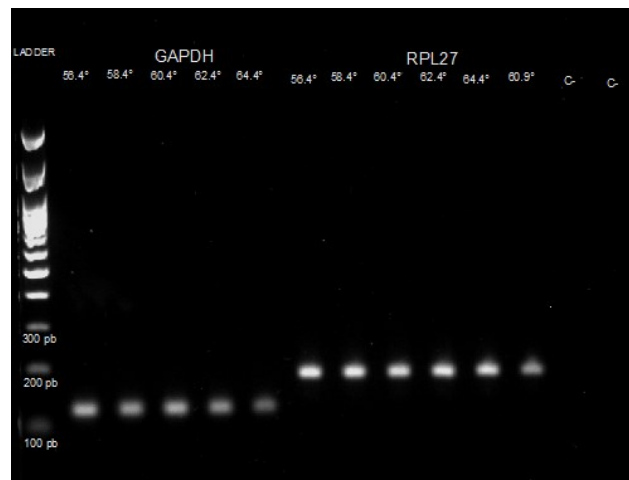
Se evaluó la significancia de las diferencias de expresión relativa de los genes en cultivo 2D y 3D con el modelo lineal mixto, que incorpora componentes de varianza asociado a la variación intra e intrerclase, en este caso la variabilidad individual relacionada con la naturaleza de la enfermedad y del efecto asociado al tipo de cultivo. Los datos se presentaron como la media \pm error estándar de las medidas repetidas. Se consideró el valor $p < 0,05$ estadísticamente significativo. Para la evaluar la relación entre pares de genes se empleó el coeficiente de correlación de Pearson. Todas las pruebas se realizaron en el software R.

8.2. Resultados

8.2.1. Los genes *GAPDH* y *RPL27* fueron amplificados de forma específica en los cultivos 2D de hGF CL \pm P NS

La detección del fragmento del gen *RPL27* mostro una señal más intensa y consistente comparada con la señal de *GAPDH* bajo las condiciones establecidas para la PCR convencional, tal como se observa en la Figura 35. De acuerdo con la intensidad de la señal emitida en las rampas de temperatura, se eligió la temperatura de melting de 60 °C para los dos genes. Adicionalmente, se seleccionó el gen *RPL27* como control para los ensayos de la PCR convencional y la qRT-PCR.

Figura 35. Rampa de temperatura para los genes *GAPDH* y *RPL27*



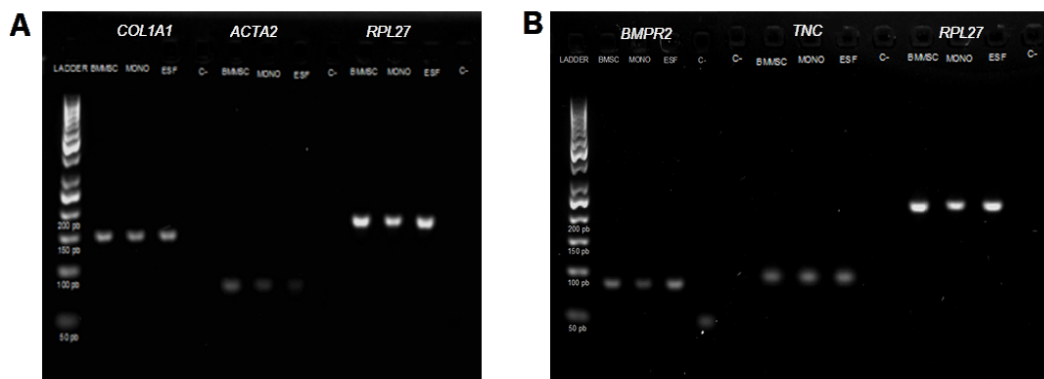
Nota. Se selecciono la temperatura de melting de 60°C para los housekeeping genes

8.2.2. Especificidad en la amplificación de genes de respuesta de la ECM, mecanotransducción y marcadores de precursores osteogénicos por PCR convencional en los cultivos 2D y 3D de hGF CL \pm P NS

Se realizo un análisis comparativo de la amplificación de los genes diana en los hGF CL \pm P NS tanto en cultivo 2D como 3D. Según estos resultados, los hGF CL \pm P NS presentaron especificidad en la amplificación para todos los genes diana (Figura 36, Figura 37, Figura 38). Sin embargo, la intensidad de la banda del amplicón del genes

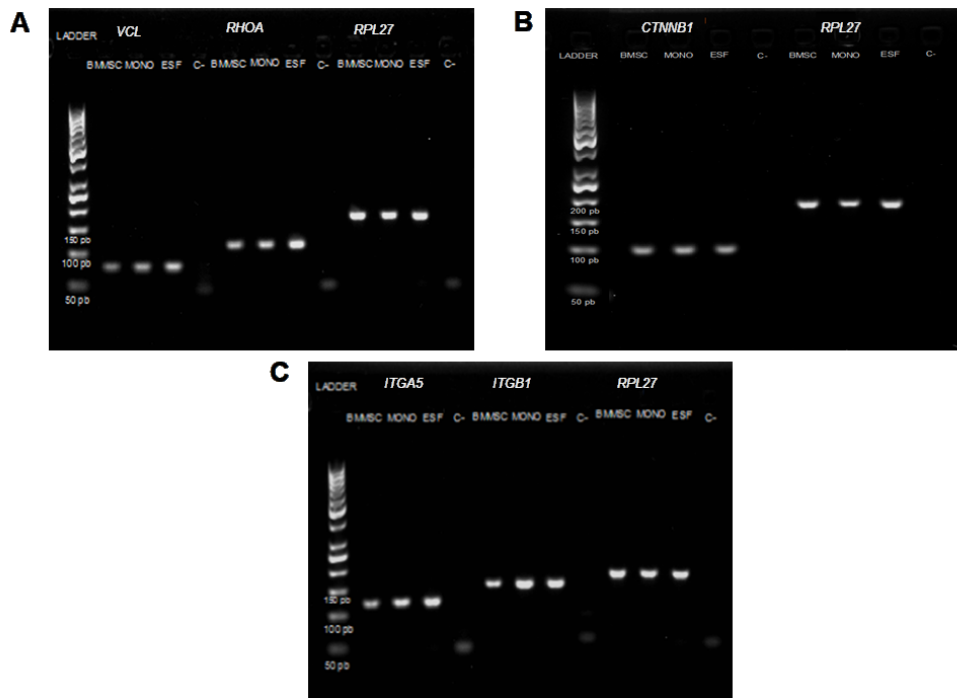
ACTA2 disminuyó la intensidad en las muestras de las monocapas y los esferoides analizados (Figura 36A), mientras que los amplicones del gen *ALPL* en las monocapas y esferoides de hGF CL₊P NS analizados no amplificaron (Figura 38A).

Figura 36. Productos de PCR de los genes *COL1A1*, *ACTA2*, *BMPR2* y *TNC*



Nota. (A). Productos de los genes *COL1A1*, *ACTA2*. (B). Productos de los genes *BMPR2* y *TNC*. *RPL2*: control. BMSC: células madre de médula ósea humana. Mono: cultivos 2D. Esf: cultivos 3D.

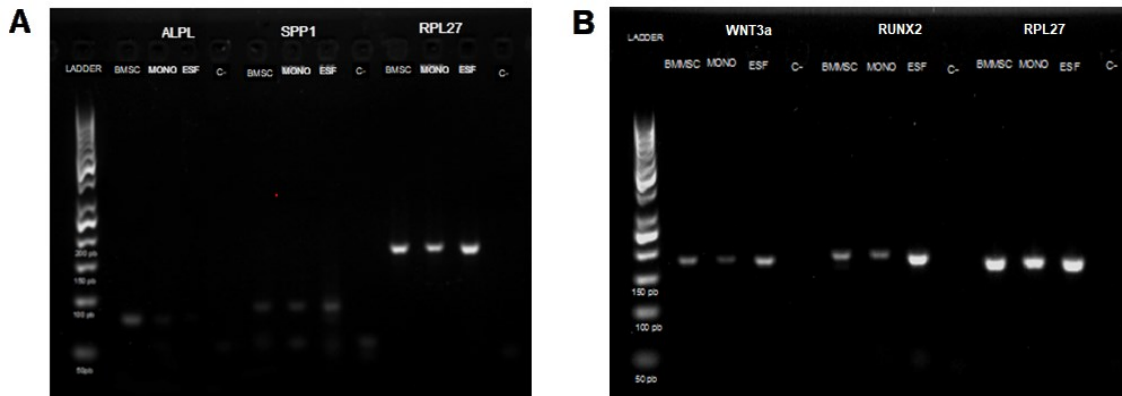
Figura 37. Productos de PCR de *VCL*, *RHOA*, *CTNNB1*, *ITGA5* e *ITGβ1*



Nota. (A). Productos de los genes *VCL* y *RHOA*. (B). Productos del gen *CTNNB1*. (C). Productos de los genes *ITGA5* e *ITGβ1*. BMSC: células madre de médula ósea humana. Mono: cultivos 2D. Esf: cultivos 3D. *RPL27*: control.

En el caso de los genes *BMPR2*, *VCL*, *RHOA*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ALPL* Y *SPP1* los controles negativos de la reacción evidenciaron una banda de amplificación de menor peso molecular que los genes diana, las cuales se relacionaron con dímeros de primers, formados por complementariedad entre estos.

Figura 38. Productos de PCR de los genes *ALPL*, *SPP1*, *WNT3a* y *RUNX2*

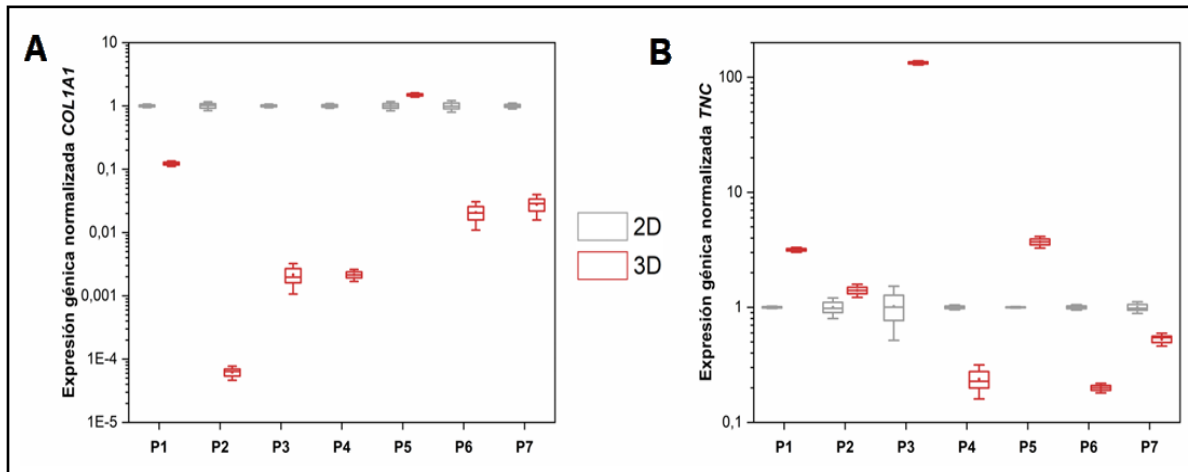


Nota. (A). Productos de los genes *ALPL* y *SPP1*. (B). Productos de los genes *WNT3a* y *RUNX2*.
BMSC: células madre de médula ósea humana. Mono: cultivos 2D. Esf: cultivos 3D. *RPL27*: control.

8.2.3. Genes relacionados con la ECM y respuestas de mecanotransducción se modularon significativamente y presentaron gran variabilidad individual

Después de un período de incubación de 4 días, los esferoides derivados de hGF CL_±P NS evidenciaron una modulación significativa para la mayoría de los genes diana, así como una gran variabilidad individual.

Específicamente, para los genes relacionados con la ECM, se observó que el gen del *COL1A1* en la mayoría de los pacientes, disminuyó la expresión significativamente (cambio promedio de 0,02 veces), excepto para el paciente N° 5 el cual presentó un aumento de 1,5 veces ($p < 0.001$) (Figura 39A), por su parte, la *TNC* presentó un aumento cambio promedio de 1,5 veces ($p < 0.01$) para la mayoría de los pacientes (Figura 39B), sin embargo, en este caso hay que resaltar que el paciente N° 3 presentó un aumento en la expresión relativa de este gen de 133 veces.

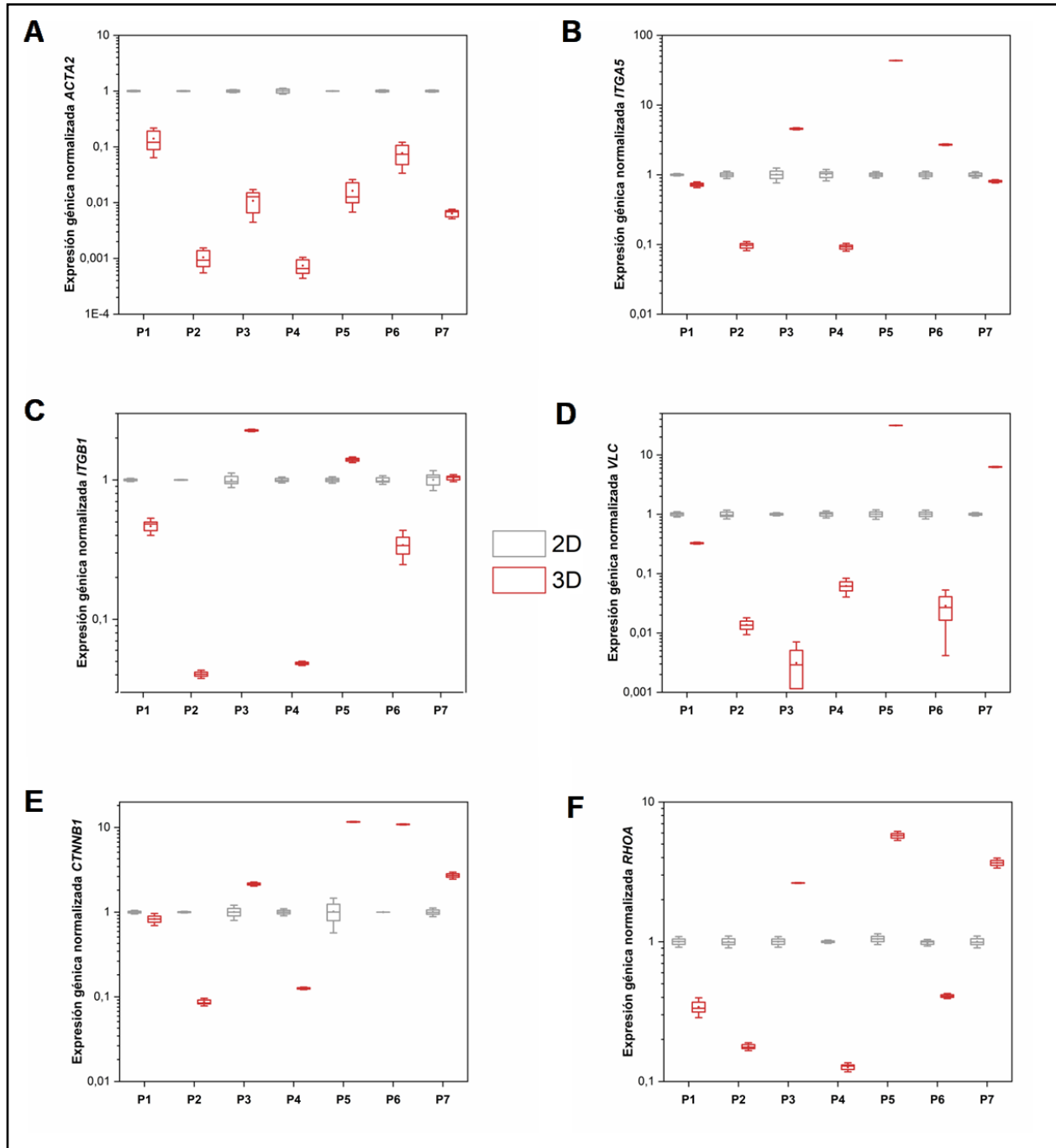
Figura 39. Expresión de genes relacionados con ECM en hGF CL+/-P NS

Nota. (A). Expresión de *COL1A1* ($p < 0.001$), (B). Expresión de *TNC* ($p < 0.01$).

Los genes de respuestas de mecanotransducción presentaron una gran variabilidad individual, con la tendencia a disminuir la expresión para la mayoría de los pacientes (Figura 40).

Sin embargo, el gen *CTNNB1* tuvo un cambio promedio de 6,8 veces ($p < 0.001$) para la mayoría de los pacientes (Figura 40), y disminuyó en 3 de los 7 pacientes 0,3 veces ($p < 0.001$). Los genes que disminuyeron la expresión significativamente para la mayoría de los pacientes fueron: *ACTA2* con un cambio promedio de 0.03 veces ($p < 0.001$) en todos los individuos de forma consistente (Figura 40A), la *ITGA5* con un cambio promedio de 0,42 veces ($p < 0.01$) (Figura 40B); *VCL* tuvo un cambio promedio 0,08 veces ($p < 0.01$) (Figura 40D), mientras que el gen *RHOA* cambió un promedio de 0,26 veces, no obstante, aumentó en 3 de los pacientes en promedio 4,0 veces ($p < 0.01$) (Figura 40F).

Finalmente, no presento cambios significativos en la expresión el gen de la *ITGβ1* (Figura 40C), sin embargo, disminuyó la expresión 0,22 veces en promedio para 4 de los 7 pacientes, y aumentó 1,56 veces para el resto de los pacientes ($p > 0.05$).

Figura 40. Expresión de genes relacionados con mecanotransducción en hGF

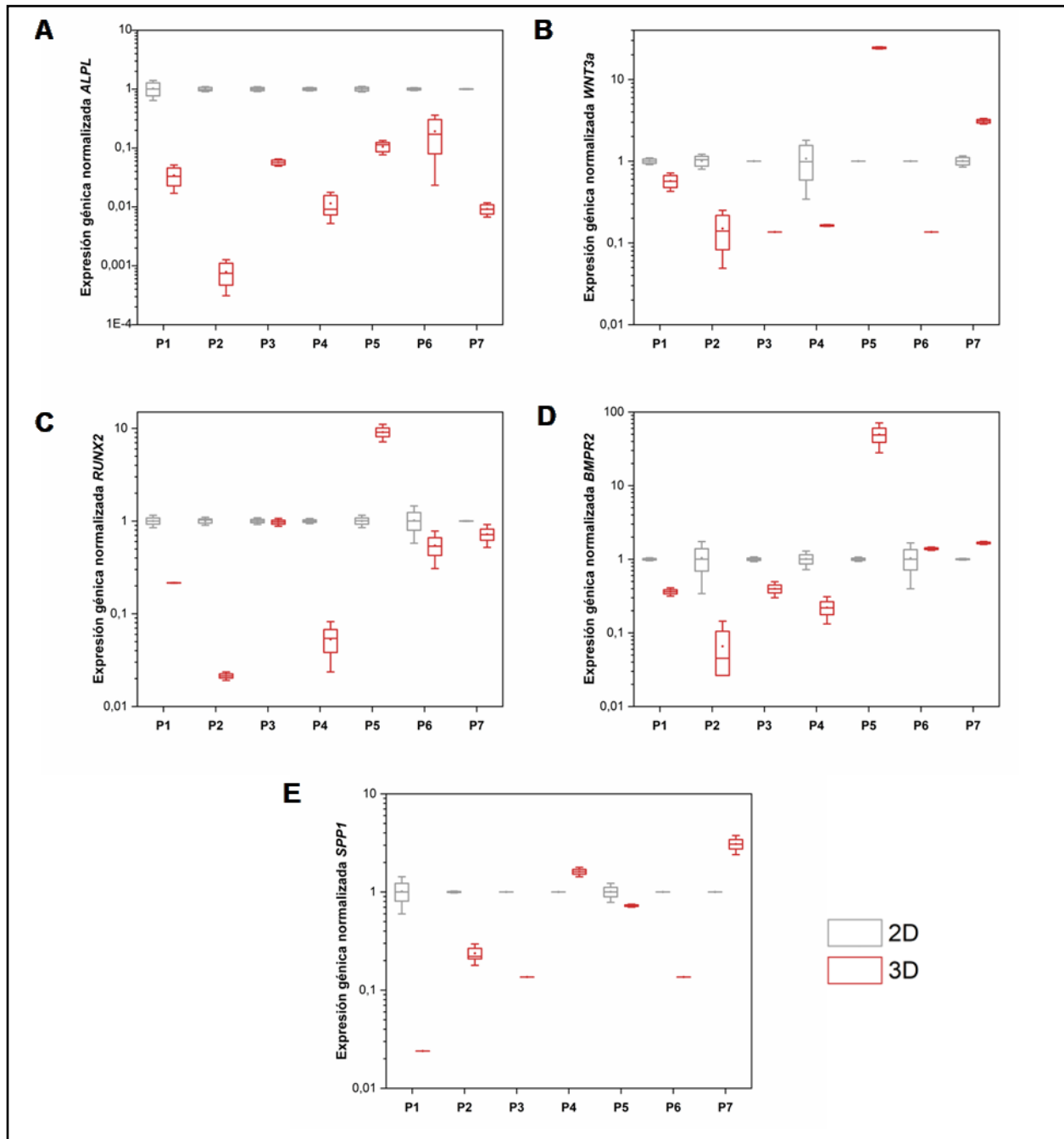
Nota. (A). Expresión de *ACTA2* ($p < 0.001$). (B). Expresión de *ITGA5* ($p < 0.01$). (C). Expresión de *ITGB1* ($p > 0.05$). (D). Expresión de *VCL* ($p < 0.01$). (E). Expresión de *RHOA* ($p < 0.01$). (F). Expresión de *CTNNB1* ($p < 0.001$).

8.2.4. Los genes de marcadores de osteoprogenitores se modularon significativamente en esferoides derivados de hGF CL ± P NS

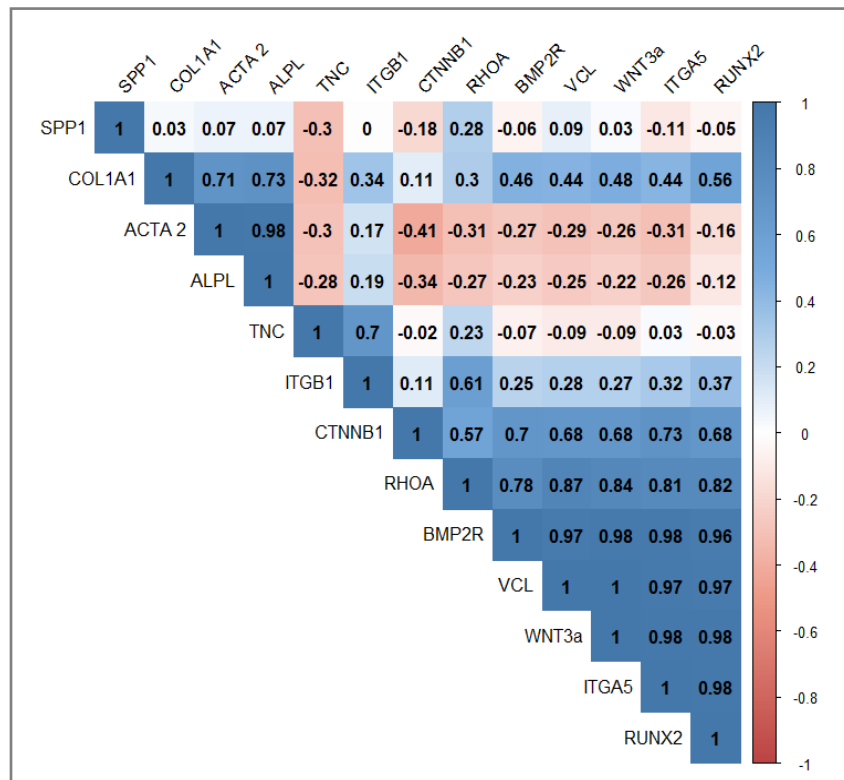
De manera similar al gen asociado a respuestas de mecanotransducción *ACTA2*, el gen *ALPL* disminuyó significativamente para todos los individuos, en este caso, presento una disminución en la expresión de 0,05 veces en promedio; ($p < 0.001$) (Figura 41A). Así mismo, el gen *BMPR2* cambio en promedio 0,26 veces; para la mayoría de los pacientes, sin embargo, para 2 de los pacientes aumento 1,5 veces, y para el paciente N° 5 aumento 49,4 veces; ($p < 0.028$) (Figura 41D). Por su parte, el gen *WNT3a* cambio en promedio 0,23 veces para la mayoría de los individuos, pero para el paciente N° 5 aumento 24,34 veces, mientras que, para el paciente N° 7 aumento 3,0 veces; ($p < 0.01$) (Figura 41B).

Por último, los genes que no presentaron cambios significativos de expresión fueron, *RUNX2*, aunque disminuyó la expresión en la mayoría de los pacientes 0,42 veces en promedio el paciente N° 5 presento un aumento en la expresión de 9,0 veces; ($p > 0.05$) (Figura 41C), y el gen *SPP1* disminuyó la expresión 0,47 veces en promedio, pero el paciente N° 7 aumento su expresión en 3,07 veces (Figura 41E).

Finalmente, en la Figura 42 se presenta el análisis de correlación de Pearson, el cual identifiqué los genes que disminuyeron la expresión sinérgicamente en los esferoides hGF CL±P NS con un índice de correlación igual o mayor al 98%, estos fueron: *WNT3a-ITGA5*, *WNT3a-BMPR2*, *BMPR2-ITGA5*, y *ACTA2-ALPL*. A pesar que, el gen *RUNX2* no presentó un cambio de la expresión estadísticamente significativo en el cultivo 3D, el análisis de correlación mostro una alta interacción de este gen con los genes *ITGA5* y *WNT3a*. Esta alta correlación sugiere patrones de expresión similar para este grupo de genes en los hGF CL±P NS bajo las condiciones de cultivo 3D, lo cual a su vez indica una relación funcional entre las respuestas de mecanotransducción celular y la diferenciación hacia un fenotipo de célula osteoprogenitora.

Figura 41 Expresión de marcadores osteoprogenitores en hGF

Nota. (A). Expresión de *ALPL* ($p < 0.001$). (B). Expresión de *BMPR2* ($p < 0.028$). (C). Expresión de *WNT3a* ($p < 0.01$). (D). Expresión de *RUNX2* ($p > 0.05$), (E). Expresión de *SPP1* ($p > 0.05$)

Figura 42. Genes regulados sinérgicamente en esferoides hGF CL+/-P NS

En la Tabla 12. se presenta el resumen del panel de genes evaluados. Como ya se mencionó, el perfil de expresión para todos los individuos fue muy variable, sin embargo, se puede inferir que el cultivo 3D, independientemente de las características individuales de los pacientes logro inducir en la gran mayoría de los genes una disminución significativa en la expresión. La disminución en la expresión de los genes *ACTA2* Y *ALPL* que fue altamente significativa y de forma consistente para todos los individuos, sugiere que estos genes participan en la reprogramación celular a la cual se someten los hGF CL+P NS en condiciones de cultivo 3D y aún más, el cambio en la expresión de estos genes se relaciona posiblemente con la diferenciación de estas células hacia un fenotipo mineralizante.

Tabla 12. Cambios en la expresión de genes diana en individuos con CL+/-P NS

Paciente	Genes con aumento de la expresión	Genes con disminución de la expresión	Genes sin cambio de expresión
1	<i>TNC</i>	<i>COL1A, ACTA, BMPR2, ITGA5, ITGβ1, VCL, RHOA, CTNN1, ALPL, RUNX2, WNT3a, SPP1.</i>	
2	<i>TNC</i>	<i>COL1A, ACTA, BMPR2, ITGA5, ITGβ1, VCL, RHOA, CTNN1, ALPL, RUNX2, WNT3a, SPP1.</i>	
3	<i>TNC, ITGA5, ITGB1, RHOA, CTNNB1.</i>	<i>COL1A, ACTA, BMPR2, ALPL, WNT3a, SPP1.</i>	<i>RUNX2</i>
4	<i>SPP1.</i>	<i>COL1A, TNC, ACTA, BMPR2, ITGA5, ITGβ1, VCL, RHOA, CTNN1, ALPL, RUNX2, WNT3a.</i>	
5	<i>COL1A, TNC, BMPR2, ITGA5, ITGβ1, VCL, RHOA, CTNN1, RUNX2, WNT3a.</i>	<i>ACTA, ALPL, SPP1.</i>	
6	<i>BMPR2, ITGA5, CTNNB1.</i>	<i>COL1A, TNC, ACTA, ITGB1, VCL, RHOA, ALPL, RUNX2, WNT3a, SPP1.</i>	
7	<i>BMPR2, CTNNB1, VCL, RHOA, WNT3a, SPP1.</i>	<i>COL1A, TNC, ITGA5, ACTA, ALPL, RUNX2.</i>	<i>ITGB1</i>

8.3. Discusión

La expresión en tiempo real de los genes diana de los hGF CL_±P NS en cultivo 3D presentó una alta variabilidad entre los individuos. Sin embargo, fue evidente una modulación significativa en la expresión de la mayoría de los genes en cultivo 3D vs. 2D para todos los individuos (Figura 39, Figura 40, Figura 41). Es importante, considerar que se eligió el día 4 de cultivo para extraer el RNA de los esferoides por ser el momento en el que los parámetros morfológicos indicaron el establecimiento de una estructura esferoidal madura. Sin embargo, es probable que los esferoides hGF CL_±P NS aún se encontraran en un estadio temprano de diferenciación o reprogramación celular, teniendo en cuenta que Roy et al. (247) reportaron una reprogramación mecánica por confinamiento lateral en la línea de fibroblastos NIH3T3 después de 10 días de cultivo.

De otro lado, la investigación de Chen et al. (346) mostró un número importante de genes expresados diferencialmente en células cultivadas en 2D y 3D por medio de la técnica de gota colgante en una línea celular de fibroblastos de prepucio humano, a las 48 horas de cultivo. Adicionalmente, la expresión diferencial de los genes fue relacionada con regiones genómicas que exhibieron cambios estructurales. Los investigadores

encontraron el aumento en la expresión de 1253 genes y la disminución en la expresión de 2044 genes. Similar a los resultados de la presente investigación, reportaron la disminución significativa de los genes *ACTA2*, *VCL*, y *BMP2*, y otros genes tales como, *STIM*, *VIM*, *RHOA*, *FAP*, y *PDGFRB*. Sin embargo, a diferencia de los resultados de la presente investigación encontraron que los genes *COL1A2*, y *SPP1* aumentaron su expresión, mientras que la *TNC* disminuyó la expresión. Estas diferencias, se pueden relacionar principalmente con el origen y la posición anatómica de los fibroblastos. Mientras que, los fibroblastos de prepucio se originan del mesenquimal, los hGF se originan de las células de la cresta neural, lo cual establece perfiles específicos de expresión génica durante el desarrollo y en los tejidos adultos. Esto, se traduce en diferencias como el tamaño celular, la tasa de proliferación, la función inmunomoduladora, la producción de componentes de ECM, la expresión de moléculas de adhesión, MMPs, TIMPs, etc. (134, 135).

A pesar, que la población de células, las técnicas, y el tiempo de cultivo en el que se realizaron los análisis de expresión génica en estos estudios difieren de la presente investigación, es evidente que el cultivo 3D de los hGF CL+P NS logro inducir cambios en la expresión de la gran mayoría de los genes diana en todos los pacientes, adicionalmente, estos cambios se relacionan con genes involucrados en respuestas de mecanotransducción celular tales como, *COL1A2*, *TNC*, *ACTA2*, *VCL*, *RHOA*, *INTGA5*, y *CTNNA1*.

La disminución altamente significativa de la expresión del gen *COL1A1* para la mayoría de las muestras de hGF CL+P NS en cultivo 3D (en promedio, 98% menor expresión) fue un resultado similar al que reportaron Lo et al. (228) y Hartman et al. (359) en cultivos 3D de fibroblastos humanos dérmicos y de ratón. Estos estudios, también informaron la disminución de la expresión de varios genes relacionados con la ECM, hecho que se asoció con procesos de desdiferenciación o reprogramación celular.

En conjunto, los resultados de la presente investigación y la evidencia actual sugieren que la disminución significativa de la expresión del gen *COL1* en los esferoides de hGF CL+P NS se relacionó con procesos de MET y de reprogramación celular via mecanotransducción. Adicionalmente se demostró que los hGF exhiben plasticidad, característica deseable para los enfoques de medicina regenerativa.

Es muy importante mencionar que sólo una de las muestras (el paciente N° 5) aumentó 1,42 veces la expresión del gen *COL1A1* (Figura 39A) no obstante, las variables morfológicas de los esferoides mostraron un comportamiento similar al resto del grupo (Figura 19). El aumento, de la expresión del *COL1A1* en este caso, se puede relacionar con el proceso de cicatrización hipertrófica secundaria a la queiloplastia que presentó el paciente, y que además coincide con el aumento de la expresión de los genes relacionados con la vías de señalización integrina/FAK/RhoA y Wnt/ β -catenina (Figura 40, Figura 41) cuando se comparó con el resto del grupo. La sobre activación de estas vías se ha asociado a la cicatrización patológica, por lo tanto, los resultados de la expresión génica en cultivo 3D para este paciente reflejaron una desregulación de las vías de cicatrización, de acuerdo con la revisión de Jiang y Rinkevich (268).

Por su parte, el perfil de expresión de los genes diana del paciente N° 3 presentó un comportamiento similar al del paciente N° 5. Sin embargo, en este caso se observó un aumento bastante significativo en la expresión del gen de la *TNC* (133,28 veces) y una regulación aumentada para los genes involucrados en las vías de señalización integrina/FAK/RhoA y β -catenina, pero no para Wnt. Así mismo, la morfología de los esferoides de este paciente tuvo un comportamiento diferente al resto del grupo: durante los días 3 a 6 se observó un aumento en el perímetro, el cual disminuyó el día 7 y permaneció estable hasta el día 10 cuando de nuevo mostró un aumento. Así mismo, las medidas del diámetro, área y solidez de los esferoides de este paciente presentaron valores altos respecto al grupo (Figura 19E). Adicionalmente, el paciente refirió antecedentes familiares patológicos (hermana con cancer, y CL+P familiar) que se pueden relacionar específicamente con una alta expresión del gen de la *TNC*, de acuerdo con la revisión de Midwood et al. (360), donde se describe que una de las funciones principales de la *TNC* es la de ser una proteína de respuesta al estrés patológico, es decir, que la síntesis de la proteína se induce rápidamente en muchos tejidos y por lo tanto, modula la adhesión, migración y proliferación celular. Por ejemplo, en cultivos de fibroblastos que se someten a tensión de tracción, la activación mediada por la ItgB1 de RhoA induce el ensamblaje y la contracción de la actina, esto da como resultado la translocación nuclear del regulador transcripcional leucemia megacarioblástica 1 (MKL1) para activar la expresión de la *TNC* (361). La mayoría de los pacientes también presentó

un aumento promedio de 1,53 veces en la expresión de la *TNC*. Al respecto, la investigación de Chiquet et al. (343) evidenció que la expresión de *TNC* durante la elevación de las apófisis palatinas puede modular la adhesión celular y de esta forma influir en la aparición de hendiduras orofaciales.

De otro lado, la revisión reciente de Albacete et al. (362) y la investigación de Li et al. (363), demostraron como la *TNC* se secreta al espacio extracelular por medio de microvesículas donde una iones de Ca^{2+} y participar en la mineralización de la ECM. Sin embargo, este proceso requiere de más investigación, y tal vez pueda estar relacionado con la mineralización que ocurre en la superficie de los esferoides hGF CL₊P NS.

En resumen, la evidencia actual y los resultados de esta investigación muestran que las alteraciones en la expresión y síntesis de moléculas de la ECM como el Col1 y la *TNC* juegan un papel importante en la etiología del CL₊P NS, y por lo tanto requiere de mayor investigación. Igualmente, la modulación en la expresión de estos genes de ECM en condiciones de cultivo 3D sugieren una posible reprogramación de los hGF.

De igual forma, se conoce ampliamente que la regulación de la actividad de las integrinas está sujeta a la variación de la biomecánica del sustrato, incluida la elasticidad y la nanotopografía del ligando de la ECM, es decir que genera respuestas de mecanotransducción e influye de manera importante en el destino, tanto de los fibroblastos como de las MSC (364). Estas características tienen que ver directamente con la menor expresión de los genes de la *ITGA5* y la *ITGB1* en cultivo 3D para la mayoría de pacientes. Sin embargo, la modulación a la que se sometió el gen de la *ITGA5* fue significativa, mientras que para la *ITGB1* no ocurrió lo mismo. Por lo tanto, es posible considerar que la *ITGB1* tienen la capacidad de regular un programa transcripcional mecano sensible relativamente conservado en hGF, y que además participe en la formación y mantenimiento de la estructura esferoidal, tal como se evidencio en la inmunotinción de los esferoides hGF CL₊P NS y se discutió en el capítulo 4.

Adicionalmente, por afinidad al sustrato específicamente al Col1 es muy probable que la $\text{Itg}\beta 1$ haya conformado heterodímeros con las subunidades $\alpha 1$ o $\alpha 2$ para inducir cambios transcripcionales que se adapten a la composición y arquitectura de una ECM biomecánicamente distinta al entorno 2D, demostrando así la plasticidad de los hGF.

La literatura y los resultados de las ultraestructura de los esferoides en esta investigación, también sugieren la posible interacción entre las integrinas y los canales iónicos para regular la proliferación y la diferenciación celular de hGF en cultivos 3D, de acuerdo con la investigación de Becchetti et al. (365), por lo tanto, esta es una perspectiva que se debe continuar investigando.

De otro lado, para la mayoría de los pacientes la expresión de β -catenina (*CNNB1*) aumentó en promedio 6,8 veces. Estos resultados, muestran de nuevo la alta variabilidad en los perfiles de expresión génica y cómo el cultivo 3D indujo cambios importantes en la expresión de este grupo de genes. Adicionalmente, la β -catenina se relaciona con el gen *WNT3a*, el cual disminuyó significativamente la expresión para la mayoría de los pacientes el día 4 de cultivo. Estos resultados muestran la necesidad de evaluar de forma dependiente del tiempo la modulación en la expresión del panel de genes propuesto en esta investigación.

Así mismo, se indagaron los cambios en la expresión de otros marcadores de células osteoprogenitoras tales como *RUNX2*, *SPP1*, *BMP2* y *ALPL*. Para la mayoría de los pacientes, este grupo de genes disminuyó significativamente (entre un 77% y un 95% menor expresión). Sin embargo, el cambio en la expresión de *RUNX2* y *SPP1* no fue estadísticamente significativa. Estos datos indicaron que en el día 4 de cultivo los esferoides la expresión de los genes *RUNX2* y *SPP1* se mantuvo muy similar al cultivo en monocapa, es decir, que el cultivo 3D no logró modular su expresión (Figura 41C, Figura 41E).

A pesar, de la alta variabilidad en la expresión de los genes diana para todos los individuos, es importante resaltar que dos genes relacionados con la respuesta de mecanotransducción y con marcadores de osteoprogenitores mostraron una disminución significativa en la expresión en cultivo 3D en comparación con el cultivo 2D. El primer gen fue *ACTA2*, el cual disminuyó en promedio 97%. Estos resultados, son similares a las investigaciones realizadas por Zhou et al. (366), Närvä et al. (367), y Yu et al. (368)

en esferoides de MSC, donde demostraron que la baja adhesión a la ECM y la fuerte adhesión célula-célula mediada por la relajación del citoesqueleto de actina fueron características de alta pluripotencia, y que estas características estaban íntimamente relacionadas con el proceso de reprogramación celular. Adicionalmente, la investigación de Lo et al (288) concluyó que durante la formación de esferoides las células se someten a procesos de MET la cual induce también la reprogramación celular. Incluso, en poblaciones naturalmente heterogéneas como los hDF, únicamente el cambio de microambiente 2D a 3D fue capaz de inducir patrones de expresión génica que indicaron la “desdiferenciación” o “reprogramación” hacia la pluripotencia. Por lo tanto, en la presente investigación, se propone que la disminución altamente significativa del gen *ACTA2* está relacionada con la respuesta de mecanotransducción del citoesqueleto de los hGF CL₊P NS para adaptarse a las condiciones del cultivo 3D e inducir cambios en la expresión génica, procesos de MET, y posiblemente reprogramación celular via biomecánica, de acuerdo con Bidarra et al (347).

El segundo gen, fue *ALPL* el cual también presento una disminución significativa (en promedio 95%) para todos los pacientes sin excepción. Este resultado muy probablemente está relacionado con el proceso de mineralización de la superficie de los esferoides y sugiere la diferenciación osteogénica desde estadios tempranos del cultivo 3D de los hGF CL₊P NS, de acuerdo con la investigación que realizaron Yamamoto et al. (369) en células inmortalizadas de la papila dental de ratón. En ese caso, las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos de baja adherencia sin ningún factor exógeno que indujera la diferenciación. De forma similar a esta investigación se observó el día 1 de cultivo una baja expresión de *ALPL*. Sin embargo, en las células inmortalizadas de la papila dental la expresión de *ALPL* fue aumentando durante los 14 días de cultivo, así como el resto de marcadores osteogénicos que evaluaron por qRT-PCR. También, evidenciaron la formación de nódulos mineralizados con alizarina roja el día 2 de cultivo los cuales fueron aumentando con el tiempo. Adicionalmente, por medio de inmunotinción observaron particularmente en la zona periférica de los esferoides la expresión relativamente fuerte de vinculina, pFAK y pPaxilina, moléculas asociada a integrinas el día 14 de cultivo. Los resultados de la presente investigación, se aproximan a los de Yamamoto et al (369), y en conjunto sugieren un fenotipo mineralizante para los hGF

CL_±P NS en cultivo 3D, sin embargo, es importante hacer el análisis de expresión génica en diferentes puntos temporales del cultivo de esferoides hGF.

De otro lado, el análisis de correlación de Pearson (Figura 42) identifico genes que se modularon sinérgicamente en los esferoides hGF CL_±P NS. En este caso, fueron *WNT3a - ITGA5*, *WNT3a – BMPR2*, *BMPR2 - ITGA5*, y *ACTA2 – ALPL*, y a pesar que, el gen *RUNX2* no presento un cambio estadísticamente significativo, el análisis de correlación mostró una alta interacción de este gen con la *ITGA5* y con *WNT3a*. Esto quiere decir, que estas parejas de genes presentaron patrones de expresión similar bajo las condiciones del cultivo 3D, lo cual a su vez indica una relación funcional entre las respuestas de mecanotransducción celular y la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante.

Otra de las limitaciones de la presente investigación, tiene que ver con que solamente se evaluó la expresión génica el día 4 del cultivo 3D. Es importante tener en cuenta, que el comportamiento y la diferenciación celular dependen de una red compleja de señales que operan en diferentes periodos y escalas del tiempo, por lo tanto, comprender la temporo-espacialidad de las vías y respuestas de mecanotransducción de los hGF CL_±P NS debería ayudar a explicar los cambios del fenotipo celular. Por lo tanto, queda pendiente evaluar la modulación de los marcadores osteoprogenitores en periodos más avanzados del cultivo principalmente, así como dilucidar el mecanismo por el cual los esferoides hGF CL_±P NS depositan minerales en condiciones de cultivo 3D.

Ahora bien, puede ser que los hGF se sometan a un proceso de diferenciación osteogénica parcial, de acuerdo con la investigación de Monterubbianes (202) o quizás, también es posible que los hGF CL_±P NS cuenten con una mejor capacidad de respuesta ante un estímulo de tipo mecánico, frente a la inducción química.

Igualmente, se debe considerar que la alta variabilidad de expresión en los perfiles génicos de los hGF aislados de pacientes CL_±P NS, limito la interpretación de los datos recolectados, y además pueden estar relacionados con el estado y severidad de la enfermedad, de acuerdo con las investigaciones adelantadas por Krivicka et al. (271), y Živicová et al. (370), así como el hecho, que son múltiples los genes y los mecanismos moleculares y celulares asociados a la presencia de hendiduras craneofaciales. Sin embargo, del panel de genes evaluado por qRT-PCR, se sugiere que los genes *ACTA2* y

ALPL pueden ser candidatos como marcadores de los cambios fenotípicos a la cual se someten los hGF CL₊P NS en cultivo 3D. El resto de genes evaluados se debe continuar estudiando, para aclarar su rol en los cambios que induce el cultivos 3D en estas células.

Para finalizar, se resalta la estandarización de los protocolos de aislamiento y cultivo en condiciones 2D y 3D de los hGF CL₊P NS, así como la estandarización de los protocolos empleados en la evaluación ultraestructural de los esferoides. En un futuro, tal como lo plantean Parisi et al. (321) será posible adaptar estas metodologías para establecer modelos celulares clínicamente relevantes, para el estudio de los procesos de crecimiento y desarrollo craneofacial, así como de las anomalía craneofaciales, y la medicina traslacional de enfermedades complejas.

9. Conclusiones

En esta investigación, se demostró la capacidad de aislar y expandir de forma eficiente células provenientes de defectos congénitos como el CL_±P NS, así como la capacidad de inducir cambios importantes en el fenotipo de los hGF via biomecánica empleando técnicas de cultivo celular de baja complejidad, con insumos accesibles, y lo más interesante aun, sin el uso de factores externos o inductores químicos. Los fibroblastos residentes en la mucosa masticatoria de pacientes, que presentaron diferentes fenotipos de hendiduras, formaron de manera espontánea y consistente estructuras multicelulares tridimensionales como respuesta al medio ambiente del cultivo, específicamente a la rigidez del sustrato, lo cual a su vez indujo cambios en la expresión de genes relacionados con la ECM, la mecanodetección y vías de mecanotransducción celular, así como en los genes marcadores de células osteoprogenitoras evaluados. Al respecto, las células lograron crear un ambiente mineralizante en el nicho, el cual fue evidente por el depósitos de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo en la superficie de los esferoides, que eventualmente pueden servir como una matriz osteoinductora y/u osteoconductora en enfoques de ET para la regeneración de los tejidos óseos craneofaciales.

Adicionalmente, se sumó evidencia de la plasticidad de los hGF para someterse a procesos que sugieren eventos de reprogramación parcial via biomecánica y, por lo tanto, de la capacidad intrínseca para servir como fuente celular de fácil acceso y con muy baja morbilidad, para enfoques de medicina regenerativa.

Asi mismo, la alta variabilidad individual en la expresión de los perfiles genéticos de los individuos que conformaron la muestra, respalda la evidente necesidad de implementar enfoques de medicina personalizada en el diagnóstico, tratamiento y prevención de las hendiduras craneofaciales, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los individuos en todas sus dimensiones. De otro lado, a pesar de la alta variabilidad en los perfiles genéticos, las células aisladas y expandidas de todos los pacientes, presentaron cambios en el fenotipo celular via biomecánica, hecho que deja abierta la posibilidad de implementar enfoques de medicina regenerativa, así como la estimulación

biomecánica por medio de aparatología ortopédica de forma más racional, independientemente del tipo y severidad de la hendidura.

Finalmente, también se evidencio la posible aplicación del modelo de esferoides derivado de hGF para el estudio de enfermedades congénitas, específicamente las hendiduras craneofaciales, y como posible medio de diagnóstico y/o pronóstico de patologías asociadas con las hendiduras.

10. Recomendaciones

Es necesario continuar estudiando la capacidad que demostraron tener los hGF en cultivo 3D para generar un ambiente mineralizante en vista que, en el presente estudio no se logró demostrar cambios significativos en la expresión de genes osteoinductores y osteoprogenitores, por lo tanto, es importante estudiar los cambios en la expresión génica de los hGF a través del tiempo, y a más largo plazo en condiciones de cultivo 3D. Igualmente, es importante establecer el papel que juega la vía de señalización STIM1/Orai1-SOCE en la respuesta de mecanotransducción celular en los hGF, y su posible relación con el ambiente mineralizante que indujo el cultivo 3D de estas células.

Adicionalmente, se propone con este modelo de células primarias y con la implementación de diferentes tecnologías de cultivo tridimensional como, por ejemplo, el uso de microplacas de ultrabaja adherencia, campos magnéticos etc., así como el cocultivo con otras células derivadas de la mucosa bucal y del tejido óseo craneofacial, para continuar con la investigación traslacional, y la medicina personalizada enfocada en la regeneración de los tejidos blandos y mineralizados de la región cráneo-maxilo facial, así como avanzar en el conocimiento de los eventos de mecanotransducción y sus implicaciones en los tejidos bucales.

Por lo tanto, con este trabajo se propone continuar con una línea de investigación para establecer modelos celulares enfocados en el estudio de la biología oral *in vitro*, así como avanzar en la comprensión de los procesos biológicos que subyacen a la enfermedades complejas en humanos, como el CL \pm P y otras anomalías craneofaciales poco frecuentes, teniendo en cuenta que cerca del 5-7 % de todos los casos de CL \pm P, la hendidura orofacial puede ser parte de síndromes raros que se presentan con anomalías adicionales fuera de la región orofacial y que generalmente son causadas por una mutación de un solo gen, anomalías cromosómicas o exposición a teratógenos durante el embarazo.

Referencias

1. Mandal S, Mandal P, Bhattacharjee S. Reminiscing the genetic of orofacial clefting. *Int J Ana Res.* 2015; 3(2): 1063 -72.
2. Beaty T, Marazita ML, Leslie E. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. *F1000 Research.* 2016; 5: 2800.
3. Mastroiacovo P, Maraschini A, Leoncini E, Mossey P, Bower C, Castilla E, et al. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the international perinatal database of typical oral clefts (IPDTC). Working Group. *Cleft Palate–Craniofac J.* 2011; 48(1):66-81.
4. Rengifo H, Guarnizo B. Analysis of the prevalence and incidence of cleft lip and palate in Colombia. *Cleft Palate Craniofac J.* 2020; 57(5): 552-559.
5. Panetta N.J. Tissue engineering in cleft palate and other congenital malformations. *Pediatr Res.* 2008; 63(5): 545-51.
6. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12: 167-78.
7. Brouwer M, Lundvig M, Middelkoop E, Wagener A, Von den Hoff W. Mechanical cues in orofacial tissue engineering and regenerative medicine. *Wound Rep Reg.* 2015; 23:302-11.
8. Teven Ch, Fisher S, Ameer G, He TC, Reid RR. Biomimetic approaches to complex craniofacial defects. *Ann Maxillofac Surg.* 2015; 5(1): 4–13.
9. Payne F, Balasundaram I, Deb S, Di Silvio L, Fan K. Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 52:7–15.
10. Martín-Del-Campo M, Rosales-Ibañez R, Rojo L. Biomaterials for cleft lip and palate regeneration. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9): 2176.
11. Scalzone A, Flores-Mir C, Carozza D, d'Apuzzo F, Grassia V, Perillo L. Secondary alveolar bone grafting using autologous versus alloplastic material in the treatment of cleft lip and palate patients: systematic review and meta-analysis. *Prog Orthod.* 2019; 20(1):6.
12. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res.* 2014; 9(1): 799X-9-18.

13. Pilipchuk P, Plonka B, Monje A, Taut D, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater.* 2015;31(4):317-38.
14. Mossaad A, Badry E, Abdelrahman M, Abdelazim A, Ghanem W, Hassan S, et al. Alveolar cleft reconstruction using different grafting techniques. *Maced J Med Sci.* 2019; 7(8): 1369-1373.
15. Mazzetti V, Alonso N, Brock S, Ayoub A, Massumoto M, Eça P. Importance of stem cell transplantation in cleft lip and palate surgical treatment protocol. *J Craniofac Surg.* 2018; 29(6) :1445-1451.
16. Liu J, Lamme N, Steegers-Theunissen P, Krapels P, Bian Z, Marres H, et al. Cleft palate cells can regenerate a palatal mucosa in vitro. *J Dent Res.* 2008; 87(8): 788-92.
17. Franco LM, Restrepo L. Producción y aplicación de equivalentes epiteliales autólogos para la recuperación de un defecto de fisura palatina en un paciente. *Rev Nac Odontol.* 2012; 8: 17-23
18. Melek L. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta Dental Journal.* 2015; 12: 211- 23.
19. Zhang W, Yelick C. Craniofacial tissue engineering. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1): a025775.
20. Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile V. Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(12): 1310-1319.
21. Merrell J, Stanger Z. Adult cell plasticity in vivo: De-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17(7): 413–25.
22. Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell Transplant.* 2019; 28(7): 801–812.
23. Ichim E, O’Heeron P, Kesari S. Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2018; 16(1): 1–9.
24. Soundararajan M. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: two sides of the same coin? *J Cell Physiol.* 2018; 233(12): 9099–109.
25. Mossey P, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol.* 2012; 16: 1-18.

26. Matsuda Y, Takahashi K, Kamioka H, Naruse K. Human gingival fibroblast feeder cells promote maturation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes. *Bioch Biophys Res Comm*. 2018; 503(3): 1798–1804.
27. Mah W, Jiang G, Olver D, Cheung G, Kim B, Larjava H, Häkkinen L. Human gingival fibroblasts display a non-fibrotic phenotype distinct from skin fibroblasts in three-dimensional cultures. *PLoS One*. 2014;9(3): e90715.
28. Alfonso García SL, Parada-Sanchez MT, Arboleda Toro D. The phenotype of gingival fibroblasts and their potential use in advanced therapies. *Eur J Cell Biol*. 2020; 99:151123. doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151123.
29. Abdal-Wahab M, Abdel Ghaffar KA, Ezzatt OM, Hassan AAA, El Ansary MMS, Gamal AY. Regenerative potential of cultured gingival fibroblasts in treatment of periodontal intrabony defects (randomized clinical and biochemical trial). *J Periodontal Res*. 2020; 55: 441-452.
30. Milinkovic I, Aleksic Z, Jankovic S, Popovic O, Bajic M, Cakic S, Lekovic V. Clinical application of autologous fibroblast cell culture in gingival recession treatment. *J Periodon Res*. 2015; 50(3): 363–370.
31. Kaufman G, Nunes L, Eftimiades A, Tutak W. Enhancing the Three-Dimensional Structure of Adherent Gingival Fibroblasts and Spheroids via a Fibrous Protein-Based Hydrogel Cover. *Cells Tissues Organs*. 2016; 202(5-6): 343–354.
32. Woappi Y, Altomare D, Creek KE, Pirisi L. Self-assembling 3D spheroid cultures of human neonatal keratinocytes have enhanced regenerative properties. *Stem Cell Res*. 2020; 49:102048.
33. Li S, Ding C, Guo Y, Zhang Y, Wang H, Sun X, Zhang J, Cui Z, Chen J. Mechanotransduction regulates reprogramming enhancement in adherent 3D keratocyte cultures. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021; 9:709488.
34. Pittenger F, Discher E, Péault M, Phinney G, Hare M, Caplan I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 2019; 4: 22.
35. Lansky Z, Mutsafi Y, Houben L, Ilani T, Armony G, Wolf SG, et al. 3D mapping of native extracellular matrix reveals cellular responses to the microenvironment. *J Struct Biol X* 2019; 1: 100002.36. Marcucio R, Hallgrimsson B, Young M. Facial Morphogenesis: Physical and Molecular Interactions Between the Brain and the Face. *Curr Top Dev Biol*. 2015; 115: 299-320.
36. Marcucio R, Hallgrimsson B, Young M. Facial Morphogenesis: Physical and Molecular Interactions Between the Brain and the Face. *Curr Top Dev Biol*. 2015; 115: 299-320.

37. Abramyan J, Richman J. Craniofacial development: discoveries made in the chicken embryo. *Int J Dev Biol.* 2018; 62(1-2-3): 97-107.
38. Jiang R, Bush O, Lidral C. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006; 235(5): 1152–116
39. Danescu A, Mattson M, Dool C, Diewert V, Richman J. Analysis of human soft palate morphogenesis supports regional regulation of palatal fusion. *J. Anat.* 2015; 227: 474–486.
40. Hooper J, Feng W, Li H, Leach S, Phang T, Siska C, Williams T. Systems biology of facial development: contributions of ectoderm and mesenchyme. *Developmental Biology,* 2017; 426(1): 97-114.
41. Fan X, Loebel DA, Bildsoe H, Wilkie E, Tam P, Qin J, Wang J, Tam P. Tissue interactions, cell signaling and transcriptional control in the cranial mesoderm during craniofacial development. *AIMS Genetics,* 2016; 3(1): 74-98.
42. Worley M, Patel K, Kilpatrick A. Cleft lip and palate. *Clin Perinatol.* 2018; 45(4): 661-678.
43. Lan Y, Xu J, Jiang R. Cellular and molecular mechanisms of palatogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2015; 115: 59-84.
44. Hammond N, Dixon J, Dixon M. Periderm: Life-cycle and function during orofacial and epidermal development. *Semin Cell Dev Biol.* 2019; 91: 75-83.
45. Li C, Lan Y, Jiang R. Molecular and cellular mechanisms of palate development. *J Dent Res.* 2017; 96(11): 1184-1191.
46. Paiva K, Maas S, Dos Santos M, Granjeiro M, Letra A. Extracellular matrix composition and remodeling: current perspectives on secondary palate formation, cleft lip/palate, and palatal reconstruction. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:340.
47. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of Orofacial Cleft Birth Defects. *Curr Genet Med Rep.* 2015; 3: 118–126.
48. Burg L, Chai Y, Yao A, Magee W, Figueiredo JC. Epidemiology, etiology, and treatment of isolated cleft palate. *Front. Physiol.* 2016; 7(67).
49. Beriaghi S, Myers S, Jensen S, Kaimal S, Chan C, Schaefer G. Cleft lip and palate: association with other congenital malformations. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2009; 33 (3): 207-210.

50. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013; 163C (4): 246-258.
51. Ahmed MK, Bui AH, Taioli E. Epidemiology of Cleft Lip and Palate. In: Almasri, M. A. editor. *Designing Strategies for Cleft Lip and Palate Care* [Internet]. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Jun 05]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/53918> doi: 10.5772/6716.
52. Saleem K, Zaib T, Sun W, Fu S. Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon.* 2019; 5(12): e03019.
53. Carlson C, Nidey L, Butali A, Buxo C, Christensen K, Deleyiannis F, Hecht J., et al. Genome-wide interaction studies identify sex-specific risk alleles for nonsyndromic orofacial clefts. *Genet Epidemiol.* 2018; 42(7): 664-672.
54. Gallagher E, Siebold B, Collett B, Cox T, Aziz V, Cunningham M. Associations between laterality of orofacial clefts and medical and academic outcomes. *Am J Med Genet A.* 2018;176(2): 267-276.
55. Hermann N, Darvann T, Munch A, Kreiborg S. Parental age in relation to the severity of cleft lip and/or palate. *Orthod Craniofac Res.* 2018; 21(4): 236–241.
56. Honein, M., Rasmussen, S., Reefhuis, J., Romitti, P., Lammer, E., Sun, L., Correa, A. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 2007;18(2): 226–233.
57. Dietz, A., Pedersen, D., Jacobsen, R., Wehby, G., Murray, J., Christensen, K. Risk of breast cancer in families with cleft lip and palate. *Ann. Epidemiol.* 2012; 22 (1): 37-42.
58. Wilcox, A., Lie, R., Solvoll, K., Taylor, J., McConnaughey, D., Abyholm, F., Drevon, C. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population-based case-control study. *BMJ.* 2007; 334 (7591): 464.
59. McKinney C, Pisek A, Chowchuen B, et al. Case-control study of nutritional and environmental factors and the risk of oral clefts in Thailand. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2016; 106(7): 624–632.
60. Escobar L, Prada J, Téllez C, Castellanos J. Bases genéticas de la formación de fisuras labiales y/o palatinas en humanos. *CES odontol.* 2013; 26(1):57-67.
61. Prabhu S, Krishnapillai R, Jose M, Prabhu V. Etiopathogenesis of orofacial clefting revisited. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):228-32.

62. Mandal, S., Mandal, P.K., & Bhattacharjee, S.K. Reminiscing the genetics of orofacial clefting. *Int J Anat Res.* 2015; 3(2):1063-72.2015.
63. Beaty T, Murray J, Marazita M, Munger R, Ruczinski I, Hetmanski B, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 525-9.
64. Basha M, Demeer B, Revencu N, Helaers R, Theys S, Bou Saba S, et al. Whole exome sequencing identifies mutations in 10% of patients with familial non-syndromic cleft lip and/or palate in genes mutated in well-known syndromes. *J Med Genet.* 2018; 55(7): 449-458.
65. Liberton K, Verma P, Almpani K, Fung PW, Mishra R, Oberoi S, et al. Craniofacial Analysis May Indicate Co-Occurrence of Skeletal Malocclusions and Associated Risks in Development of Cleft Lip and Palate. *J Dev Biol.* 2020; 8(1): 2.
66. Watkins S, Meyer R, Strauss R, Aylsworth A. Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clin. Plast. Surg.* 2014; 41:149-163.
67. Bell C, Raynes-Greenow C, Turner M, Bower C, Nassar N, O'Leary M. Maternal alcohol consumption during pregnancy and the risk of orofacial clefts in infants: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2014; 28(4): 322-332.
68. Yan C, Deng-Qi H, Li-Ya C, Mang Y, Ke-Hu Y. Transforming Growth Factor Alpha Taq I Polymorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate Risk: A Meta-Analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 2018;55(6): 814-820.
69. Leslie E, Carlson J, Shaffer J, Butali A, Buxo C, Castilla E, Marazita M. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate. *Hum. Genet.* 2017;136 (3): 275-286.
70. Yu Y, Zuo, X, He M, Gao J, Fu Y, Qin C, Bian Z. Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity. *Nat. Commun.* 2017;8: 14364.
71. Leslie E, Carlson J, Shaffer J, Feingold E, Wehby G, Laurie C, Marazita M, A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25 (13): 2862-2872.
72. Mossey P, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol.* 2012;16: 1-18.

73. Adeyemo L, Butali A. Genetics and genomics etiology of nonsyndromic orofacial clefts. *Mol Genet Genomic Med.* 2017;5(1): 3-7.
74. Huang L, Jia Z, Shi Y, Du Q, Shi J, Wang Z, et al. Genetic factors define CPO and CLO subtypes of nonsyndromic orofacial cleft. *PLoS Genet.* 2019;15(10): e1008357.
75. Li Y, Shi B, Song Q, Zuo H, Zheng Q. Effects of lip repair on maxillary growth and facial soft tissue development in patients with a complete unilateral cleft of lip, alveolus and palate, *J Craniomaxillofac Surg.* 2006; 34: 355-361.
76. Voshol E, van Adrichem N, van der Wal G, Koudstaal J. Influence of pharyngeal flap surgery on maxillary outgrowth in cleft patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013; 42(2): 192-197.
77. Shi B, Losee J, The impact of cleft lip and palate repair on maxillofacial growth. *Int J Oral Sci.* 2015;7(1): 14-17.
78. Von den Hoff J, Carvajal P, Ongkosuwito E, van Kuppevelt T, Daamen W. Muscle fibrosis in the soft palate: Delivery of cells, growth factors and anti-fibrotics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146: 60-76.
79. Generali C, Primozic J, Richmond S, Bizzarro M, Flores-Mir C, Ovsenik M, Perillo L. Three-dimensional evaluation of the maxillary arch and palate in unilateral cleft lip and palate subjects using digital dental casts. *Eur J Orthod.* 2017;39(6): 641-645.
80. Brudnicki A, Rachwalski M, Wiepszowski L., Sawicka E. Secondary alveolar bone grafting in cleft lip and palate: A comparative analysis of donor site morbidity in different age groups. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019;47(1):165-169.
81. Rawashdeh M, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 46:665-670.
82. Smith M, Williams F, Ward B. Hard tissue reconstruction. In: Miloro M, Kolokythas A, editors. *Management of complications in oral and maxillofacial surgery.* Chichester: Wiley-Blackwell; 2012. p. 286.
83. Buser D. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry. 2nd Ed. Chicago: Quintessence; 2010. USA.
84. Greenwood H, Thorsteinsdottir H, Perry G, Renihan J, Singer P, Daar A. Regenerative medicine: new opportunities for developing countries. *Int. J. Biotechnol.* 2006; 8, 60-77.

85. Fischbach M, Bluestone J, Lim W. Cell-based therapeutics: the next pillar of medicine. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(179): 179ps7.
86. Scibona E, Morbidelli M. Expansion processes for cell-based therapies. *Biotechnol Adv.* 2019; 37(8):107455.
87. Hoogendoorn KH. Advanced Therapies: clinical, non-clinical and quality considerations. *Pharmaceutical Biotechnology.* 2019; 357–402.
88. Rohban R, Pieber T. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:5173732.
89. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T., et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med.* 2017; 376(11): 1038-1046.
90. Subbarayan R, Murugan D, Ranga S, Gingival spheroids possess multilineage differentiation potential. *J Cellular Physiol.* 2018; 233(3): 1952–1958.
91. Ueda M, Hata KI, Sumi Y, Mizuno H, Niimi A. Peri-implant soft tissue management through use of cultured mucosal epithelium. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1998; 86: 393-400.
92. Lauer G, Otten JE, von Specht BU, Schilli W. Cultured gingival epithelium. A possible suitable material for pre-prosthetic surgery. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 1991; 19:21-26.
93. Bodner L, Grossman N. The use of cultured mucosal graft for preprosthetic surgery *Refuat. Hapeh. Vehashinayim.* 2001; 18:32-4, 109.
94. Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blaauw EH, Witjes MJ, Vissink A. Use of cultured mucosal grafts to cover defects caused by vestibuloplasty: an in vivo study. *J. Oral Maxillofac.Surg.* 1995; 53: 872-878.
95. Llamas S, Recuero I, Romance A, García E, Peña I, Del Valle AF, Meana A, Larcher F, Del Río M. Tissue-engineered oral mucosa for mucosal reconstruction in a pediatric patient with hemifacial microsomia and ankyloglossia. *Cleft Palate Craniofac J.* 2014; 51(2): 246-51.
96. Bodner L, Grossman N. Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: a clinical study. *J. Oral Maxillofac.Surg.* 2003; 61:169-173.
97. Sumi Y, Hata KI, Sawaki Y, Mizuno H, Ueda M. Clinical application of cultured oral epithelium for palatal wounds after palatoplasty: a preliminary report. *Oral Dis.* 1999; 5 (4): 307-12.

98. Méndez R, López-Cedrún JL, Patiño B, Vázquez I, Martín-Sastre R, Tellado MG, et al. Plasma enriquecido en plaquetas en la alveoloplastia de pacientes fisurados. *Cir. Pediatr.* 2006; 19: 23-26.
99. González-Sánchez JG, Jiménez-Barragán K. Cierre de fístulas nasopalatinas recurrentes con plasma rico en factores de crecimiento en pacientes con paladar hendido. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2011; 62(6): 448-53.
100. Clavijo-Alvarez JA, Vecchione L, DeCesare G, Irwin Ch, Smith DM, Grunwaldt L. Autologous bone grafting with adjunctive use of acellular dermal matrix for alveolar cleft defects: early outcomes. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010; 47(2):116-21.
101. Kamal M, Ziyab A, Bartella A, Mitchell D, Al-Asfour A, Hölzle F, et al. Volumetric comparison of autogenous bone and tissue-engineered bone replacement materials in alveolar cleft repair: a systematic review and meta-analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 56(6): 453-462.
102. Garcia A, Prada R, Ávila-Portillo M, Rojas N, Gómez-Ortega V, Menze E. New technique for closure of alveolar cleft with umbilical cord stem cells. *J Craniofac Surg.* 2019; 30(3): 663-666.
103. Hopper A, Al-Mufarrej F. Gingivoperiosteoplasty. *Clin Plast Surg.* 2014; 41:233-240.
104. Amer H, Rose J, Shakesheff M, Modo M, White J. Translational considerations in injectable cell-based therapeutics for neurological applications: concepts, progress and challenges. *NPJ Regen Med.* 2017; 2:23.
105. Pittenger F, Discher E, Péault M, Phinney G, Hare M, Caplan I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med.* 2019; 4:22.
106. Lansky Z, Mutsafi Y, Houben L, Ilani T, Armony G, Wolf SG, Fass D. 3D mapping of native extracellular matrix reveals cellular responses to the microenvironment. *J Struct Biol X.* 2019; 1:100002.
107. Barnes L, Marshall C, Leavitt T, Hu M S, Moore AL, Gonzalez J, et al. Mechanical forces in cutaneous wound healing: emerging therapies to minimize scar formation. *Adv Wound Care.* 2017;7(2):47-56.
108. Pratsinis H, Mavrogonatou E, Kletsas D. Scarless wound healing: from development to senescence. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019; 146:325-343.
109. Bu L, Baba H, Yoshida N, Miyake K, Yasuda T, Uchihara T, Tan P, Ishimoto T. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene.* 2019; 38(25):4887-4901.

110. Burgy O, Königshoff M. The WNT signalling pathways in wound healing and fibrosis. *Matriz Biol.* 2018; 68–69: 67–80.
111. Lv FJ, Tuan R, Cheung K, Leung V. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014; 32: 1408-1419.
112. Baranyi U, Winter B, Gugerell A, et al. Primary Human Fibroblasts in Culture Switch to a Myofibroblast-Like Phenotype Independently of TGF Beta. *Cells.* 2019; 8(7):721.
113. Denu R, Nemcek S, Bloom D, Goodrich A, Kim J, Mosher D, et al. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol.* 2016; 136(2): 85-97.
114. Häkkinen L, Larjava, H. Fournier, BP. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy.* 2014; 16(9): 1171-1186.
115. Avery D, Govindaraju P, Jacob M, Todd L, Monslow J, Puré E. Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. *Matrix Biology.* 2018; 67: 90-106.
116. Cho N, Razipour S, McCain M. TGF- β 1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Exp Biol Med.* 2018; 243(7): 601-612.
117. Rinn J, Wang J, Allen N, Brugmann S, Mikels A, Liu H, et al. A dermal HOX transcriptional program regulates site-specific epidermal fate. *Genes and Dev.* 2008; 22(3): 303-307.
118. Foote A, Wang Z, Kendzioriski C, Thibeault S. Tissue specific human fibroblast differential expression based on RNA sequencing analysis. *BMC Genomics.* 2019 20(1): 308.
119. Loh K, Chen A, Koh PW, Deng T, Sinha R, Tsai J, et al. Mapping the pairwise choices leading from pluripotency to human bone, heart, and other mesoderm cell types. *Cell.* 2016; 166(2):451-468.
120. Khanbabaei H, Teimoori A, Mohammadi M. The interplay between microRNAs and Twist1 transcription factor: a systematic review. *Tumor Biol.* 2016; 37(6): 700-7019.
121. Nieto M, Huang R, Jackson R, Thiery J. Emt: 2016. *Cell.* 2016; 166(1): 21-45.
122. Chakraborty D, Šumová B, Mallano T, Chen C, Distler A, Bergmann C, et al. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun.* 2017; 8 (1): 1-16.

123. Muppala S, Raghunathan V, Jalilian I, Thomasy S, Murphy C. YAP and TAZ are distinct effectors of corneal myofibroblast transformation. *Exper Eye Res.* 2019; 180:102-109.
124. Bucala R. Fibrocytes at 20 Years. *Mol Med.* 2015; 21(Suppl 1): S3-S5.
125. Kerosuo L, Nie S, Bajpai R, Bronner M. Crestospheres: long-term maintenance of multipotent, premigratory neural crest stem cells. *Stem Cell Rep.* 2015;5(4):499-507
126. Dupin E, Calloni G, Coelho-Aguiar J, Le Douarin N. The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol.* 2018; 444(Suppl 1): S47-S59.
127. Goodnough L, DiNuoscio G, Ferguson J, Williams T, Lang R, Atit R. Distinct requirements for cranial ectoderm and mesenchyme derived Wnts in specification and differentiation of osteoblast and dermal progenitors. *PloS Gen.* 2014;10(2):12-14.
128. Yoshida T, Vivatbutsiri P, Morriss-Kay G, Saga Y, Iseki S. Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mechan Dev.* 2008; 125(9-10): 797-808.
129. Isaac J, Nassif A, Asselin A, Fohrer-Ting H, Klein C, Gogly B, et al. Involvement of neural crest and paraxial mesoderm in oral mucosal development and healing. *Biomater.* 2018; 172: 41-53.
130. Abe S, Yamaguchi S, Sato Y, Harada K. Sphere-derived multipotent progenitor cells obtained from human oral mucosa are enriched in neural crest cells. *Stem Cells Trans Med.* 2016; 5(1): 117-128.
131. Fournier B, Loison-Robert L, Ferré F, Owen G, Larjava H, Häkkinen L. Characterisation of human gingival neural crest-derived stem cells in monolayer and neurosphere cultures. *Eur Cell Mater.* 2016; 31: 40-58.
132. Janson D, Rietveld M, Mahé C, Saintigny G, El ghalbzouri A. Differential effect of extracellular matrix derived from papillary and reticular fibroblasts on epidermal development. *Eur J Dermatol.* 2017; 27(3): 237-246.
134. Philippeos C, Telerman S, Oulès B, Pisco A, Shaw T, Elgueta R, et al. Spatial and single-cell transcriptional profiling identifies functionally distinct human dermal fibroblast subpopulations. *J Invest Dermatol.* 2018; 138(4): 811-825.
135. Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, Noma T. Gene signature of human oral mucosa fibroblasts: comparison with dermal fibroblasts and induced pluripotent stem cells. *BioMed Res Intern.* 2015; 2015:121575.
136. Huang C, Akaishi S, Ogawa R. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Arch Dermatol Res.* 2012; 304(8): 589- 597.

137. Ebisawa K, Kato R, Okada M, Sugimura T, Latif MA, Hori Y, Narita Y, Ueda M, Honda H, Kagami, H. Gingival and dermal fibroblasts: their similarities and differences revealed from gene expression. *J Biosci Bioeng.* 2011; 111(3): 255-258.
138. Cianfarani S. Insulin-like growth factor-II: new roles for an old actor. *Front Endocrinol.* 2012; 3:118.
139. Cui N, Hu M, Khalil R. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 147: 1-73.
140. Punj A, Shenoy S, Kumari NS, Pampani P. Estimation of antioxidant levels in saliva and serum of chronic periodontitis patients with and without ischemic heart disease. *Int J Dent.* 2017; 2017: 1965697.
141. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med-Czech.* 2008; 53(8): 397- 411.
142. Workman G, Bradshaw A. Production and purification of recombinant human SPARC. *Methods Cell Biol.* 2018; 143: 335-345.
143. Hastings J, Skhinas J, Fey D, Croucher D, Cox T. The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *Br J Pharmacol.* 2019; 176: 82-92.
144. Squier C, Brogden K. The functions of oral mucosa. En: Squier C, Brogden K. *Human oral mucosa.* Ed 2. New York, NY: Wiley; 2013. p 1-7.
145. Glim J, Everts V, Niessen F, Ulrich M, Beelen R. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(10): 1048-1055.
146. Ciano J, Beatty B. Regional quantitative histological variations in human oral mucosa. *The Anat Rec.* 2015; 298 (3): 562-578.
147. Hsieh P, Jin Y, Chang C, Huang C, Liao S, Yuan K. Elastin in oral connective tissue modulates the keratinization of overlying epithelium. *J Clin Periodont.* 2010;37(8):705-711.
148. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham C, Gurtner G. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev.* 2019; 99(1): 665-706.
149. Vicente-Manzanares M, Horwitz A. Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci.* 2011; 124(23): 3923-3927.
150. Guo F, Carter D, Mukhopadhyay A, Leask A. Gingival fibroblasts display reduced adhesion and spreading on extracellular matrix: a possible basis for scarless tissue repair. *PloS One.* 2011; 6(11): 1-9.

151. Gladkikh, A., Kovaleva, A., Tvorogova, A., Vorobjev, I. Heterogeneity of focal adhesions and focal contacts in motile fibroblasts. *Meth Mol Biol.* 2018; 1745: 205-218.
152. Walraven M, van Vliet S, Beelen R, van Egmond M, Ulrich M. Blocking α 1-integrin reverts the adhesive phenotype of adult fibroblasts towards a foetal-like migratory phenotype. *Exp Dermatol.* 2016; 25(6), 480-482.
153. Nithiananthan S, Crawford A, Knock J, Lambert D, Whawell S. Physiological fluid flow moderate fibroblast responses to TGF- β 1. *J Cellular Bioch.* 2017;118(4):878-890.
154. Corcuera A, Ansorena E, Montiel-Duarte C., Iraburu, M. AGAP2: Modulating TGF β 1-signaling in the regulation of liver fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(4):1400.
155. Guo F, Carter D, Leask A. Mechanical tension increases CCN2/CTGF expression and proliferation in gingival fibroblasts via a TGF β -dependent mechanism. *PloS One.* 2011; 6(5): 1-10.
156. Guo F, Carter DE, Leask A. miR-218 regulates focal adhesion kinase-dependent TGF β signaling in fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2014; 25(7): 1151-1158.
157. Schulz J, Plomann M, Sengle G, Gullberg D, Krieg T, Eckes B. New developments on skin fibrosis - Essential signals emanating from the extracellular matrix for the control of myofibroblasts. *Matrix Biol.* 2018; 68 (69): 522-532.
158. Santos A, Lagares D. Matrix Stiffness: the conductor of organ fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2018; 20(1): 2.
159. Wang JH, Thampatty BP, Lin JS, Im HJ. Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene.* 2007 Apr 15;391(1-2):1-15.
160. Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res.* 2006 Feb 1;312(3):205-14.
161. Chiquet M, Katsaros C, Kleetsas D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontol 2000.* 2015;68(1):21-40.
162. Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(5):911-20.
163. Glim J, Van Egmond M, Niessen F, Everts V, Beelen R. Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Reg.* 2013; 21(5): 648-60.

164. Glim J, Beelen R, Niessen F, Everts V, Ulrich M. The number of immune cells is lower in healthy oral mucosa compared to skin and does not increase after scarring. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(2): 272-81.
165. Wang Y, Tatakis D. Human gingiva transcriptome during wound healing. *J Clin Periodontol.* 2017;44(4): 394-402.
166. Nuutila K, Siltanen A, Peura M, Bizik J, Kaartinen I, Kuokkanen H, et al. Human skin transcriptome during superficial cutaneous wound healing. *Wound Repair and Reg.* 2012; 20(6): 830-39.
167. Tarzeman R, Jiang G, Jiang J, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart D, et al. Connexin 43 regulates the expression of wound healing-related genes in human gingival and skin fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2018; 367(2): 150-61.
168. Tarzeman R, Jiang G, Larjava H, Häkkinen L. Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts. *PLoS One.* 2015; 10(1): 1-31.
169. Cheng J, Jiang G, Tarzeman R, Larjava H, Häkkinen L. Regulation of connexin 43 expression in human gingival fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2018; 371(1): 238-49.
170. Tarzeman R, Jiang G, Jiang J, Larjava H, Häkkinen L. Connexin 43 hemichannels regulate the expression of wound healing-associated genes in human gingival fibroblasts. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1-15.
171. Larjava H, Wiebe C, Gallant-Behm C, Hart D, Heino J, Häkkinen L. Exploring scarless healing of oral soft tissues. *J Can Dent Assoc.* 2011; 77: b18.
172. Kural M, Billiar K. Myofibroblast persistence with real-time changes in boundary stiffness. *Acta Biom.* 2016; 32: 223-30.
173. Vescarelli E, Piloni A, Dominici F, Pontecorvi P, Angeloni A, Polimeni A, et al. Autophagy activation is required for myofibroblasts differentiation during healing of oral mucosa. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(10): 1039-50.
174. Lygoe K, Wall I, Stephens P, Lewis M. Role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation. *Biol Cell.* 2007; 99(11): 601-614.
175. Shannon D, McKeown S, Lundy F, Irwin C. Phenotypic differences between oral and skin fibroblasts in wound contraction and growth factor expression. *Wound Repair Reg.* 2016; 14(2): 172-178.
176. Turabelidze A, Guo S, Chung A, Chen L, Dai Y, Marucha P, DiPietro L. Intrinsic differences between oral and skin keratinocytes. *PLoS One.* 2014; 9(9):1-10.

177. Dally J, Khan J, Voisey A, Charalambous C, John H, Woods E, et al. Hepatocyte growth factor mediates enhanced wound healing responses and resistance to transforming growth factor- β 1-driven myofibroblast differentiation in oral mucosal fibroblasts. *Inter J Mol Sci.* 2017;18(9): 1-15.
178. Meran S, Thomas D, Stephens P, Enoch S, Martin J, Steadman R, Phillips A. Hyaluronan facilitates transforming growth factor- β 1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chemist.* 2018; 283(10): 6530-6545.
179. Kennedy C, Diegelmann R, Haynes J, Yager D. Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J Pediatr Surg.* 2000; 35(6): 874-879.
180. Mah W, Jiang G, Olver D, Cheung G, Kim B, Larjava H, Häkkinen L. Human gingival fibroblasts display a non-fibrotic phenotype distinct from skin fibroblasts in three-dimensional cultures. *PloS One.* 2014; 9(3): e90715.
181. Mah W, Jiang G, Olver D, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart D, et al. Elevated CD26 expression by skin fibroblasts distinguishes a profibrotic phenotype involved in scar formation compared to gingival fibroblasts. *Am J Pathol.* 2017; 187(8): 1717-1735.
182. Lappin M, Brown V, Zaric S, Lundy F, Coulter W, Irwin C. Interferon- γ stimulates CD14, TLR2 and TLR4 mRNA expression in gingival fibroblasts increasing responsiveness to bacterial challenge. *Arch of Oral Biol.* 2016; 61, 36–43.
183. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2007; 86(3): 249–254.
184. Linard C, Tissedre F, Busson E, Holler V, Leclerc T, Strup-perrot C, et al. Therapeutic potential of gingival fibroblasts for cutaneous radiation syndrome: comparison to bone marrow-mesenchymal stem cell grafts. *Stem Cells and Dev.* 2015; 24(10): 1182–1193.
185. Séguier S, Tartour C, Guérin C, Couty L, Lemitre M, Lallement L, et al. Inhibition of the differentiation of monocyte-derived dendritic cells by human gingival fibroblasts. *PloS One.* 2013; 8(8): 2-9.
186. Milinkovic I, Aleksic Z, Jankovic S, Popovic O, Bajic M, Cakic S, Lekovic V. Clinical application of autologous fibroblast cell culture in gingival recession treatment. *J Periodon Res.* 2015; 50(3): 363-370.
187. Boink MA, Roffel S, Breetveld M, Thon M, Haasjes M, Waaijman T, et al. Comparison of advanced therapy medicinal product gingiva and skin substitutes and their in vitro wound healing potentials. *J Tissue Eng Reg Med.* 2018; 12(2): 1088-1097.

188. Woloszyk A, Buschmann J, Waschkie C, Stadlinger B Mitsiadis T. Human dental pulp stem cells and gingival fibroblasts seeded into silk fibroin scaffolds have the same ability in attracting vessels. *Frontiers Physiol.* 2016; 7: 1-7.
189. Um Min Allah N, Berahim Z, Ahmad A, Kannan T. Biological interaction between human gingival fibroblasts and vascular endothelial cells for angiogenesis: a co-culture perspective. *Tissue Eng Reg Med.* 2017; 14(5): 495-505.
190. Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Chappuis V, Buser D, Schaller B, et al. Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral Health.* 2017; 17(1): 1-10.
191. Asparuhova M, Kiryak D, Eliezer M, Mihov D, Sculean A. Activity of two hyaluronan preparations on primary human oral fibroblasts. *J Periodon Res.* 2019; 54: 33-45.
192. Fu Y, Zheng L, Zhang C. The effects of genetic alteration on reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells. *Annals Stem Cells Reg Med.* 2018; 1(1): 1007.
193. Yin X, Li Y, Li J, Li P, Liu Y, Wen J, et al. Generation and periodontal differentiation of human gingival fibroblasts-derived integration-free induced pluripotent stem cells. *Bioch Biophys Res Comm.* 2016; 473(3): 726-732.
194. Declercq J, Sheshadri P, Verfaillie CM, Kumar A. Zic3 enhances the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Dev.* 2013;22(14):2017-2025.
195. Fishedick G, Klein D, Wu G, Esch D, Höing S, Han D, et al. Zfp296 is a novel, pluripotent-specific reprogramming factor. *Plos One.* 2012; 7(4): e34645.
196. Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, Shibukawa R, Kodanaka I, Ichisaka T, et al. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nat.* 2011; 474: 225-229.
197. Ji J, Tong X, Huang X, Zhang J, Qin H, Hu Q. Patient-derived human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts composited with defined nano hydroxyapatite /chitosan/gelatin porous scaffolds as potential bone graft substitutes. *Stem Cells Trans Med.* 2016; 5(1): 95-105.
198. Yu G, Okawa H, Okita K, Kamano Y, Wang F, Saeki M, et al. Gingival fibroblasts as autologous feeders for induced pluripotent stem cells. *J Dent Res.* 2016;95(1): 110-118.
199. Choi J, Hwang H, Jang Y. The efficiency of the in vitro osteo/dentinogenic differentiation of human dental pulp cells, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2015; 35(1): 161-168.

200. Ghuman M, Al-Masri M, Guilherme X, Cobourne M, McKay I, Hughes F. Gingival fibroblasts prevent BMP-mediated osteoblastic differentiation. *J Periodont Res*. 2019; 54(3): 300-309.
201. Chronopoulou L, Amalfitano A, Palocci C, Nocca G, Callá C, Arcovito A. Dexamethasone-loaded biopolymeric nanoparticles promote gingival fibroblasts differentiation. *Biotechnol Progress*. 2015; 31(5): 1381-1387.
202. Monterubbianes R, Bencun M, Pagella P, Woloszyk A, Orsini G, Mitsiadis T. A comparative in vitro study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 1-13.
203. Mostafa N, Uludag H, Varkey M, Dederich D, Doschak M, El-bialy T. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. *Open Dental J*. 2011; 5: 139-145.
204. Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Escareño C, Zeichner-D, Arzate H, Mercado-Celis G. CEMP1 induces transformation in human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2015;1: 1-20.
205. Cho Y, Kim B, Bae H, Kim W, Baek J, Woo K, et al. Direct gingival fibroblast/osteoblast transdifferentiation via epigenetics. *J Dent Res*. 2017; 96(5): 555-561.
206. Cho Y, Ryoo H. Trans-differentiation via Epigenetics: A new paradigm in the bone regeneration. *J B*. 2018; 25(1):9-13.
207. Wu M, Wang J, Zhang Y, Liu H, Dong F. Mineralization induction of gingival fibroblasts and construction of a sandwich tissue- engineered complex for repairing periodontal defects. *Medical Sci Monitor*. 2018; 24: 1112-1123.
208. Voisin V, Caballé-Serrano J, Sculean A, Gruber R. Palatal fibroblasts reduce osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *BMC Oral Health*. 2016;16(34): 1-5.
209. Almela T, Al-sahaf S, Bolt R, Brook I, Moharamzadeh K. Characterization of multi-layered tissue engineered human alveolar bone and gingival mucosa. *Tissue Eng Part C: Methods*. 2018; 24(2): 99-107.
210. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif*. 2017; 50(2): e12334.
211. Vining KH, Mooney DJ. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(12):728-742.

212. Xiong S, Gao H, Qin L, Jia Y, Gao M, Ren L. Microgrooved collagen-based corneal scaffold for promoting collective cell migration and antifibrosis. *RSC Adv.* 2019; 9(50): 29463-29473.
213. Dulgar-Tulloch AJ, Bizios R, Siegel RW. Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 90(2):586-94.
214. Efremov AK, Yao M, Sun Y, Tee YH, Sheetz MP, Bershadsky AD, Martinac B, Yan J. Application of piconewton forces to individual filopodia reveals mechanosensory role of L-type Ca²⁺ channels. *Biomaterials.* 2022; 284:121477.
215. D'Urso M, Kurniawan NA. Mechanical and physical regulation of fibroblast-myofibroblast transition: from cellular mechanoresponse to tissue pathology. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8:609653.
216. Nagayama K, Nishimiya K. Moderate substrate stiffness induces vascular smooth muscle cell differentiation through cellular morphological and tensional changes. *Biomed Mater Eng.* 2020;31(3):157-167.
217. Hayward MK, Muncie JM, Weaver VM. Tissue mechanics in stem cell fate, development, and cancer. *Dev Cell.* 2021; 12;56(13):1833-1847.
218. Kirby TJ, Lammerding J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat Cell Biol.* 2018;20(4):373-381.
219. Solovei I, Wang AS, Thanisch K, Schmidt CS, Krebs S, Zwerger M, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell.* 2013;152(3):584-98.
220. Maurer M, Lammerding J. The driving force: nuclear mechanotransduction in cellular function, fate, and disease. *Annu Rev Biomed Eng.* 2019; 21:443-468.
221. Bachir AI, Horwitz AR, Nelson WJ, Bianchini JM. Actin-based adhesion modules mediate cell interactions with the extracellular matrix and neighboring cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(7): a023234.
222. Xu R, Hu X, Yu X, Wan S, Wu F, Ouyang J, Deng F. Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13:5045-5057.

-
223. Nan L, Zheng Y, Liao N, Li S, Wang Y, Chen Z, Wei L, Zhao S, Mo S. Mechanical force promotes the proliferation and extracellular matrix synthesis of human gingival fibroblasts cultured on 3D PLGA scaffolds via TGF β expression. *Mol Med Rep.* 2019;19(3):2107-2114.
 224. Guo Y, Wang X, Wang C, Chen S. In vitro behaviour of human gingival fibroblasts cultured on 3D-printed titanium alloy with hydrogenated TiO₂ nanotubes. *J Mater Sci Mater Med.* 2022;33(3):27.
 225. Frank V, Kaufmann S, Wright R, Horn P, Yoshikawa HY, Wuchter P, et al. Frequent mechanical stress suppresses proliferation of mesenchymal stem cells from human bone marrow without loss of multipotency. *Sci Rep.* 2016; 6:24264.
 226. Caiazzo M, Okawa Y, Ranga A, Piersigilli A, Tabata Y, Lutolf MP. Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency. *Nat Mater.* 2016; (3):344-52.
 227. Gerardo H, Lima A, Carvalho J, Ramos JRD, Couceiro S, Travasso RDM, et al. Soft culture substrates favor stem-like cellular phenotype and facilitate reprogramming of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) through mechanotransduction. *Sci Rep.*; 2019(1):9086.
 228. Lo LM, Raghunath M, Lee KKH. Growing Human Dermal Fibroblasts as Spheroids Renders Them Susceptible for Early Expression of Pluripotency Genes. *Adv Biosyst.* 2019;3(10): e1900094.
 229. Dey K, Roca E, Ramorino G, Sartore L. Progress in the mechanical modulation of cell functions in tissue engineering. *Biomater Sci.* 2020; 8(24):7033-7081.
 230. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches, *Nature* 2010; 465(7299): 704-712.
 231. Graf T. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem. Cell.* 2011; 9(6):504-16.
 232. Ma X, Kong L, Zh S. Reprogramming cell fates by small molecules. *Protein Cell.* 2017; 8(5): 328-348.
 233. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
 234. Wong SY, Soto J, Li S. Biophysical regulation of cell reprogramming. *Curr Opin Chem Eng.* 2017; 15:95-101.

235. Han F, Li X, Song D, Jiang S, Xu Q, Zhang Y. SCNT versus iPSCs: proteins and small molecules in reprogramming. *Int J Dev Biol.* 2015;59(4-6):179-86.
236. Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic instability of iPSCs: challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(1):7-16.
237. Romanazzo S, Lin K, Srivastava P, Kilian KA. Targeting cell plasticity for regeneration: From in vitro to in vivo reprogramming. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;161-162:124-144.
238. Downing TL, Soto J, Morez C, Houssin T, Fritz A, Yuan F, Chu J, Patel S, Schaffer DV, Li S. Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat Mater.* 2013; 12(12):1154-62.
239. Liu X, Ouyang JF, Rossello FJ, Tan JP, Davidson KC, Polo JM et al. Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. *Nature.* 2020;586(7827):101-107.
240. Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, Huber W, Hochedlinger K, Krijgsveld J. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep.* 2012;2(6):1579-92.
241. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2010;7(1):64-77.
242. Hu X, Zhang L, Mao SQ, Li Z, Chen J, Zhang RR, Wu HP, Gao J, Guo F, Liu W, Xu GF, Dai HQ, Shi YG, Li X, Hu B, Tang F, Pei D, Xu GL. Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2014;14(4):512-22.
243. Wang K, Bruce A, Mezan R, Kadiyala A, Wang L, Dawson J, Rojanasakul Y, Yang Y. Nanotopographical modulation of cell function through nuclear deformation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(8):5082-92.
244. Kim YM, Kang YG, Park SH, Han MK, Kim JH, Shin JW, Shin JW. Effects of mechanical stimulation on the reprogramming of somatic cells into human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):139.
245. Song Y, Soto J, Chen B, Yang L, Li S. Cell engineering: Biophysical regulation of the nucleus. *Biomaterials.* 2020; 234:119743.
246. Li N, Li X, Chen K, Dong H, Kagami H. Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1): 184.

247. Roy B, Venkatachalapathy S, Ratna P, Wang Y, Jokhun DS, Nagarajan M, Shivashankar GV. Laterally confined growth of cells induces nuclear reprogramming in the absence of exogenous biochemical factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(21): E4741-E4750.
248. Roy B, Yuan L, Lee Y, Bharti A, Mitra A, Shivashankar GV. Fibroblast rejuvenation by mechanical reprogramming and redifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(19):10131-10141.
249. Yuan L, Roy B, Ratna P, Uhler C, Shivashankar GV. Lateral confined growth of cells activates Lef1 dependent pathways to regulate cell-state transitions. *Sci Rep*. 2022;12(1):17318.
250. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3): 5517-5527.
251. Gionet-Gonzales M, Leach J. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Mater*. 2018; 13(3): 034109.
252. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2d to 3d cell culture? *Front Mol Biosci*. 2020; 7: 33.
253. Zurina I, Shpichka A, Saburina I, Kosheleva N, Gorkun A, Grebenik E, et al. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro. *Biom Mater*. 2018; 13(5): 054104.
254. Kim M, Yun H, Park D, Choi B, Min B. Three-dimensional spheroid culture increases exosome secretion from mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2018; 15(4): 427–436.
255. Kim H, Sung I, Cho Y, Kang M, Rho G, Byun J, et al. Three-dimensional spheroid formation of cryopreserved human dental follicle-derived stem cells enhances pluripotency and osteogenic induction properties. *Tissue Eng Regen Med*. 2019; 16(5): 513–523.
256. Decarli MC, Amaral R, Santos DPD, Tofani LB, Katayama E, Rezende RA, Silva JVLD, Swiech K, Suazo CAT, Mota C, Moroni L, Moraes ÂM. Cell spheroids as a versatile research platform: formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. *Biofabrication*. 2021;13(3),10.1088/1758-5090/abe6f2.
257. Langhans S. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol*. 2018; 9:6.

258. Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, Cain S, Allan S, Pinteaux E. Generation of human mesenchymal stem cell 3d spheroids using low-binding plates. *Bio Protocol*. 2018; 8(16): e2968.
259. Nikolova M, Chavali M. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: a review. *Bioact Mater*. 2019; 4: 271-292.
260. Desai K, Salve P, Sapkal N, Dave J, Tomar G. Scaffold-free spheroids derived from stem cells for tissue-engineering applications. *Crit Rev Biomed Eng*. 2018; 46(5): 469–493.
261. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*. 2019 8(12): 1620.
262. Costa E, de Melo-Diogo D, Moreira A, Carvalho M, Correia I. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: considerations and practical approaches. *Biotechnol J*. 2018; 13(1): 10.
263. Slawny N, Labant M. Physiologically relevant spheroid models for three-dimensional cell culture. In *Technology Platforms for 3D Cell Culture*. 2018. S. Ed Przyborski.
264. Squier C, Brogden K. The functions of oral mucosa. En: Squier C, Brogden K. *Human oral mucosa*. Ed 2. New York, NY: Wiley; 2013. p 1-7.
265. Evans E. Treating scars on the oral mucosa. *Facial Plast Sur Clin North Am*. 2017; 25: 89-97.
266. Thier K, Petermann P, Rahn E, Rothamel D, Bloch W, Knebel-Mörsdorf D. Mechanical barriers restrict invasion of herpes simplex virus 1 into human oral mucosa. *J Virol*. 2017; 91(22): e01295-17.
267. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo D, Egeblad M, Evans R, Fearon D, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20(3), 174-186.
268. Jiang D, Rinkevich Y. Scars or regeneration? -dermal fibroblasts as drivers of diverse skin wound responses. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (2): 617.
269. Smane-Filipova L, Pilmane M, Akota I. MMPs and TIMPs expression in facial tissue of children with cleft lip and palate. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2016; 160(4): 538-542.
270. Smane-Filipova L, Pilmane M, Akota I. Immunohistochemical analysis of nestin, CD34 and TGFβ3 in facial tissue of children with complete unilateral and bilateral cleft lip and palate. *Stomatologija*. 2016; 18(3): 98-104.

-
271. Krivicka B, Pilmane M, Akota I. Expression of growth factors and growth factor receptors in human cleft-affected tissue. *Stomatologija*. 2013; 15(4):111-118.
 272. Schoen C, Glennon JC, Abghari S, Bloemen M, Aschrafi A, Carels CEL, Von den Hoff JW. Differential microRNA expression in cultured palatal fibroblasts from infants with cleft palate and controls. *Eur J Orthod*. 2018; 23; 40(1): 90-96.
 273. Gomes RN, Manuel F, Nascimento DS. The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. *NPJ Regen Med*. 2021; 6:43.
 274. Simancas-Escorcía V, Vergara Hernández C, Díaz-Caballero A. Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. *Av. Odontostomatol [Internet]*. 2018 dic [citado 2022 mayo 22]; 34(6): 299-309. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021312852018000600004&lng=es.
 275. Smirani R, Rémy M, Devillard R, Naveau A. Use of human gingival fibroblasts for pre-vascularization strategies in oral tissue engineering. *Tissue Eng Regen Med*. 2022; doi: 10.1007/s13770-021-00415-3.
 276. Saeed N. In vitro characterisation of human cleft fibroblasts isolated from patients with differing cleft manifestations. [Tesis doctoral en philosophy] Birmingham: University of Birmingham. School of Dentistry; 2019.
 277. Nguyen PA, Pham TAV. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. *J Appl Oral Sci*. 2018;26: e20180077.
 278. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):377–383.
 279. LeBleu VS., Neilson EG. Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. *Faseb J*. 2020; 34(3): 3519-3536.
 280. Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J, Coller HA, et al. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56: 347-58.
 281. Ostrowska-Podhorodecka Z, Ding I, Norouzi M, McCulloch CA. Impact of vimentin on regulation of cell signaling and matrix remodeling. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 869069.

-
282. Van Beurden HE, Snoek PA, Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. In vitro migration and adhesion of fibroblasts from different phases of palatal wound healing. *Wound Repair Regen.* 2006;14(1): 66-71.
 283. Ong HL, Subedi KP, Son GY, Liu X, Ambudkar IS. Tuning store-operated calcium entry to modulate Ca²⁺ dependent physiological processes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019; 1866(7): 1037-1045.
 284. Ranga Rao S, Subbarayan R. Passage-dependent expression of STRO-1 in human gingival mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2019; 120(3): 2810-2815.
 285. Yang YK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 131.
 286. Yoshioka H, Mikami Y, Ramakrishnan SS, Suzuki A, Iwata J. MicroRNA-124-3p plays a crucial role in cleft palate induced by retinoic acid. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:621045.
 287. Reynolds K, Zhang S, Sun B, Garland MA, Ji Y, Zhou CJ. Genetics and signaling mechanisms of orofacial clefts. *Birth Defects Res.* 2020;112(19):1588-1634.
 288. Shen H, Cai S, Wu C, Yang W, Yu H, Liu L. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture and future development. *Micromachines (Basel).* 2021; 12(1):96.
 289. Smyrek I, Mathew B, Fischer SC, Lissek SM, Becker S, Stelzer E. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biology Open.* 2019; 8(1): bio037051.
 290. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface.* 2017; 14(127): 20160877.
 291. Sarem M, Otto O, Tanaka S, Shastri V. Cell number in mesenchymal stem cell aggregates dictates cell stiffness and chondrogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):10.
 292. Torizal F, Kimura K, Horiguchi I, Sakai Y. Size-dependent hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells spheroid in suspension culture. *Regen Ther.* 2019; 12: 66-73.
 293. Langan L, Dodd N, Owen S, Purcell W, Jackson S, Jha A. Direct measurements of oxygen gradients in spheroid culture system using electron parametric resonance oximetry. *PloS one.* 2016; 11(2): e0149492.

294. Costa E, Gaspar V, Coutinho P, Correia I. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol Bioeng*, 2014; 111(8):1672-1685.
295. Chen LC, Wang HW, Huang CC. Modulation of Inherent Niches in 3D Multicellular MSC Spheroids Reconfigures Metabolism and Enhances Therapeutic Potential. *Cells*. 2021;10(10):2747.
296. Tatapudy S, Aloisio F, Barber D, Nystul T. Cell fate decisions: emerging roles for metabolic signals and cell morphology. *EMBO Rep*. 2017;18(12):2105-2118.
297. Gioacchini G, Notarstefano V, Sereni E, Zacà C, Coticchio G, Giorgini E, Vaccari L, Carnevali O, Borini A. Does the molecular and metabolic profile of human granulosa cells correlate with oocyte fate? New insights by Fourier transform infrared microspectroscopy analysis. *Mol Hum Reprod*. 2018; 24(11):521-532.
298. Querido W, Kandel S, Pleshko N. Applications of Vibrational Spectroscopy for Analysis of Connective Tissues. *Molecules*. 2021;26(4):922.
299. Querido W, Falcon JM, Kandel S, Pleshko N. Vibrational spectroscopy and imaging: applications for tissue engineering. *Analyst*. 2017;142(21):4005-4017.
300. Taylor EA, Donnelly E. Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties. *Bone*. 2020; 139:115490.
301. Berzina-Cimdina, L., Borodajenko, N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Theophanides, T., editor. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology* [Internet]. London: IntechOpen; 2012 [citado 2022 Mar 12]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/36171>.
302. Shaban NZ, Kenawy MY, Taha NA, Abd El-Latif MM, Ghareeb DA. Synthesized nanorods hydroxyapatite by microwave-assisted technology for in vitro osteoporotic bone regeneration through Wnt/ β -catenin pathway. *Materials (Basel)*. 2021; 5;14(19):5823.
303. Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for craniofacial bone regeneration. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(4):835-856.
304. Oliver JD, Jia S, Halpern LR, et al. Innovative molecular and cellular therapeutics in cleft palate tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2021;27(3): 215-237.
305. Mirab F, Kang YJ, Majd S. Preparation and characterization of size-controlled glioma spheroids using agarose hydrogel microwells. *PLoS One*. 2019;14(1): e0211078.

306. Li M, Fu T, Yang S, et al. Agarose-based spheroid culture enhanced stemness and promoted odontogenic differentiation potential of human dental follicle cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2021;57(6):620-630.
307. Nath SC, Horie M, Nagamori E, Kino-Oka M. Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate. *J Biosci Bioeng.* 2017; 124(4): 469-475.
308. Koudan EV, Gryadunova AA, Karalkin PA, et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol J.* 2020; 15(5): e1900217.
309. Deynoux M, Sunter N, Ducrocq E, et al. A comparative study of the capacity of mesenchymal stromal cell lines to form spheroids. *PLoS One.* 2020; 15 (6): e0225485.
310. Chung YC, Chiang HC, Chang H, et al. Longan flower proanthocyanidins induce apoptosis in HT-29 colorectal carcinoma spheroids. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(Supplement): S388-S393.
311. Eilenberger C, Rothbauer M, Ehmoser EK, Ertl P, Küpcü S. Effect of spheroidal age on sorafenib diffusivity and toxicity in a 3D HepG2 spheroid model. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 4863.
312. Ospina-Muñoz N, Vernot JP. Partial acquisition of stemness properties in tumor spheres obtained from interleukin-8-treated MCF-7 cells. *Tumour Biol.* 2020;42(12): 1010428320979438.
313. Park Y, Hwang J, Jun Y, et al. Scaffold-free parathyroid tissue engineering using tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 2016; 35: 215-227.
314. Zhang K, Song L, Wang J, Yan S, Li G, Cui L., Yin J. Strategy for constructing vascularized adipose units in poly (l-glutamic acid) hydrogel porous scaffold through inducing in-situ formation of ASCs spheroids. *Acta Biomater.* 2017; 51: 246-257.
315. Lee JH, Han YS, Lee S. Long-duration three-dimensional spheroid culture promotes angiogenic activities of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomol Ther.* 2016; 24(3): 260-267.
316. Feng J, Mineda K, Wu SH, et al. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1548.
317. Ong C, Fukunishi T, Zhang H, et al. Biomaterial-free three-dimensional bioprinting of cardiac tissue using human Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 4566.

318. Chukkapalli SS, Lele TP. Periodontal cell mechanotransduction. *Open Biol.* 2018; 8(9):180053.
319. Hu J, Li Y, Hao Y, Zheng T, et al. High stretchability, strength, and toughness of living cells enabled by hyperelastic vimentin intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(35): 17175-17180.
320. Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39(3): 783-803.
321. Morimoto K., Kunni S. Latent nature of collagen in promoting three-dimensional adherent spheroid formation of fibroblasts. *Materialia.* 2019; 8:100450.
322. Gupta RK, Johansson S. β 1 Integrins restrict the growth of foci and spheroids. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(6):881-94.
333. Forte E, Chimenti I, Rosa P, et al. EMT/MET at the crossroad of stemness, regeneration and oncogenesis: The ying-yang equilibrium recapitulated in cell spheroids. *Cancers.* 2017;9(8):98.
334. Lin RZ, Chou LF, Chien CC, Chang HY. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res.* 2006; 324(3):411-22.
335. Gammons J, Halpage J, Mancarella S. Mapping the proximity interaction network of STIM1 reveals new mechanisms of cytoskeletal regulation. *Cells.* 2021; 10(10): 2701.
336. Niethammer P. Components and mechanisms of nuclear mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2021; 37:233-256.
337. Chen Y, Koshy R, Guirado E, George A. STIM1 a calcium sensor promotes the assembly of an ECM that contains extracellular vesicles and factors that modulate mineralization. *Acta Biomater.* 2021;120: 224-239.
338. Hara ES, Okada M, Nagaoka N, Nakano T, Matsumoto T. Re-evaluation of initial bone mineralization from an engineering perspective. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022; 28(1): 246 -255.
339. Kim J, Adachi T. Cell Condensation triggers the differentiation of osteoblast precursor cells to osteocyte-like cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7:288.
340. Kim J, Adachi T. Cell-fate decision of mesenchymal stem cells toward osteocyte differentiation is committed by spheroid culture. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 13204.

341. Gaitán-Salvatella I, López-Villegas EO, González-Alva P, Susate-Olmos F, Álvarez-Pérez MA. Case Report: formation of 3D osteoblast spheroid under magnetic levitation for bone tissue engineering. *Front Mol Biosci.* 2021; 8:672518.
342. Logan SM, Ruest LB, Benson MD, Svoboda KKH. Extracellular matrix in secondary palate development. *Anat Rec (Hoboken).* 2020; 303(6):1543-1556.
343. Chiquet M, Blumer S, Angelini M, Mitsiadis TA, Katsaros C. Mesenchymal remodeling during palatal shelf elevation revealed by extracellular matrix and F-Actin expression patterns. *Front Physiol.* 2016;7: 392.
344. Wang XM, Liu WL, Chen Y, et al. Lithium-induced overexpression of β -catenin delays murine palatal shelf elevation by Cdc-42 mediated F-actin remodeling in mesenchymal cells. *Birth Defects Res.* 2021;113(5):427-438.
345. Pang X, Wang X, Wang Y, et al. Sox9CreER-mediated deletion of β -catenin in palatal mesenchyme results in delayed palatal elevation accompanied with repressed canonical Wnt signaling and reduced actin polymerization. *Genesis.* 2021;59(9): e23441.
346. Chen H, Seaman L, Liu S, Ried T, Rajapakse I. Chromosome conformation and gene expression patterns differ profoundly in human fibroblasts grown in spheroids versus monolayers. *Nucleus.* 2017; 8(4):383-391.
347. Bidarra SJ, Oliveira P, Rocha S, Saraiva DP, Oliveira C, Barrias CC. A 3D in vitro model to explore the inter-conversion between epithelial and mesenchymal states during EMT and its reversion. *Sci Rep.* 2016; 6:27072.
348. Pieters T, van Roy F. Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 12):2603-261.
349. Pesqueira T, Costa-Almeida R, Gomes ME. Uncovering the effect of low-frequency static magnetic field on tendon-derived cells: from mechanosensing to tenogenesis. *Sci Rep.* 2017;7(1):10948.
350. Zhou Q, Lyu S, Bertrand AA, Hu AC, Chan CH, Ren X, Dewey MJ, Tiffany AS, Harley BAC, Lee JC. Stiffness of Nanoparticulate mineralized collagen scaffolds triggers osteogenesis via mechanotransduction and canonical Wnt signaling. *Macromol Biosci.* 2021; (3): e2000370.
351. Guillem-Martí J, Delgado L, Godoy-Gallardo M, Pegueroles M, Herrero M, Gil FJ. Fibroblast adhesion and activation onto micro-machined titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(7):770-80.

352. Algaber A, Al-Haidari A, Madhi R, Rahman M, Syk I, Thorlacius H. MicroRNA-340-5p inhibits colon cancer cell migration via targeting of RhoA. *Sci Rep.* 2020; 10(1):16934.
353. Ali M, Shahin SM, Sabri NA, Al-Hendy A, Yang Q. Activation of β -catenin signaling and its crosstalk with estrogen and histone deacetylases in human uterine fibroids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(4): e1517–35.
354. Ma D, Wang X, Guo J, Zhang J, Cai T. Identification of a novel mutation of RUNX2 in a family with supernumerary teeth and craniofacial dysplasia by whole-exome sequencing: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(32): e11328.
355. Chen YY, Chen Y, Wang WC, Tang Q, Wu R, Zhu WH, Li D, Liao LL. Cyclin D1 regulates osteoarthritis chondrocyte apoptosis via WNT3/ β -catenin signalling. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):1971-1977.
356. Miao TW, Xiao W, Du LY, Mao B, Huang W, Chen XM, Li C, Wang Y, Fu JJ. High expression of SPP1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is correlated with increased risk of lung cancer. *FEBS Open Bio.* 2021;11(4):1237-1249.
357. Zhang Y, Roos M, Himburg H, Termini CM, Quarmyne M, Li M, Zhao L, Kan J, Fang T, Yan X, Pohl K, Diers E, Jin Gim H, Damoiseaux R, Whitelegge J, McBride W, Jung ME, Chute JP. PTP σ inhibitors promote hematopoietic stem cell regeneration. *Nat Commun.* 2019;10(1):3667.
358. Stuermer EK, Lipenksy A, Thamm O, Neugebauer E, Schaefer N, Fuchs P, Bouillon B, Koenen P. The role of SDF-1 in homing of human adipose-derived stem cells. *Wound Repair Regen.* 2015; 23(1):82-9.
359. Hartmann ES, Schluessel S, Köhler MI, et al. Fibroblast-like cells change gene expression of bone remodelling markers in transwell cultures. *Eur J Med Res.* 2020; 25(1):52
360. Midwood KS, Chiquet M, Tucker RP, Orend G. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci.* 2016;129(23):4321-4327.
361. Lutz, R., Sakai, T. and Chiquet, M. Pericellular fibronectin is required for RhoA-dependent responses to cyclic strain in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 210; 123, 1511-1521.
362. Albacete-Albacete L, Sánchez-Álvarez M, Del Pozo MA. Extracellular vesicles: an emerging mechanism governing the secretion and biological roles of tenascin-C. *Front Immunol.* 2021; 12:671485.

-
363. Li C, Cui Y, Luan J, et al. Tenascin C affects mineralization of SaOS2 osteoblast-like cells through matrix vesicles. *Drug Discov Ther.* 2016;10(2):82-87.
 364. Isomursu A, Lerche M, Taskinen ME, Ivaska J, Peuhu E. Integrin signaling and mechanotransduction in regulation of somatic stem cells. *Exp Cell Res.* 2019; 378(2):217-225.
 365. Becchetti A, Petroni G, Arcangeli A. Ion channel conformations regulate integrin-dependent signaling. *Trends Cell Biol.* 2019;29(4):298-307.
 366. Zhou Y, Chen H, Li H, Wu Y. 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(6): 1073-1084
 367. Närvä E, Stubb A, Guzmán C, et al. A strong contractile actin fence and large adhesions direct human pluripotent colony morphology and adhesion. *Stem Cell Reports.* 2017; 9(1): 67-76.
 368. Yu L, Li J, Hong J, et al. Low cell-matrix adhesion reveals two subtypes of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2018; 11(1): 142-156
 369. Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, et al. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 2014;59(3):310-317.
 370. Živicová V, Lacina L, Mateu R, et al. Analysis of dermal fibroblasts isolated from neonatal and child cleft lip and adult skin: Developmental implications on reconstructive surgery. *Int J Mol Med.* 2017; 40(5): 1323-1334.
 372. Parisi L, Knapp PO, Girousi E, et al. A Living Cell Repository of the Cranio-/Orofacial Region to Advance Research and Promote Personalized Medicine. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:682944.

Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
FUNDACIÓN CLINICA NOEL



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PADRES DE LOS NIÑOS QUE DESEEN PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN: DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE FIBROBLASTOS AISLADOS DE DEFECTOS DE LABIO Y/O PALADAR HENDIDO (CL+P) NO SINDROMICO EN CULTIVOS 3D.

Investigadores Responsables

Dr. David Arboleda Toro. Profesor Universidad de Antioquia – Facultad de odontología.
Dra. Mónica Tatiana Parada Sánchez. Profesora Universidad de Antioquia - Facultad odontología.
Dra. Sandra L. Alfonso G. Estudiante Doctorado en ciencias odontológicas-Universidad de Antioquia.

El presente documento busca tener su declaración voluntaria de participación en el presente proyecto de investigación.

¿Cuál es el objetivo de la investigación?

El objetivo es estudiar el comportamiento en el laboratorio de las células de la encía del paladar hendido, para que en un futuro se pueda construir en el laboratorio el tejido blando (encía) y duro (hueso) faltante en el paladar de un niño(a) que presente labio y/o paladar hendido, empleando su propio tejido.

¿Cómo es el procedimiento para participar en el estudio?

Si usted decide participar en la investigación, necesitaremos obtener una muestra de encía del paladar duro de su hijo(a) en el momento que la clínica le programe el cierre quirúrgico del labio o el paladar. Esto quiere decir que el niño(a) no tiene que asistir a la Clínica en otra visita para poder participar en el estudio y los procedimientos de análisis de las muestras no tendrán ningún costo para usted.

¿Cuáles son los riesgos de la toma de la muestra?

De acuerdo con las consideraciones éticas de la resolución 8430 de 1993 dictadas por el Ministerio de Salud, participar en este estudio tiene un riesgo mínimo ya que se tomarán 2mm de la encía del paladar y se colocara un punto de sutura reabsorbible en el sitio, el niño (a) no va a necesitar de preparación especial o adicional a las recomendaciones del cirujano para realizar la cirugía del labio o del paladar.

Los riesgos de la biopsia pueden ser sangrado proveniente del sitio de la biopsia, infección y dolor en el sitio de la biopsia, para minimizar cada uno de estos potenciales riesgos identificados para los participantes:

- Se tendrá en cuenta la historia clínica del niño(a)
- Se utilizar sutura reabsorbible para no tener que retirarla y así evitar un procedimiento más.
- En el control posquirúrgico de rutina del procedimiento principal (cierre de labio o de paladar), el cirujano tratante revisara la zona donde se tomó la biopsia.
- El niño(a) contara con servicio de consulta prioritaria en caso de que se presente una complicación posquirúrgica inmediata o mediata del procedimiento quirúrgico principal y/o al de la toma de la biopsia.

¿En qué me beneficio por participar en la investigación?

El niño(a) que participe, al donar la muestra durante su cirugía no se beneficiará directamente, pero más adelante el beneficiado será el grupo poblacional, es decir otros niños que presenten labio y paladar hendido, ya que se espera dar continuidad a la investigación a partir de este estudio. En el futuro, va a ser posible emplear la encía de cada paciente para diseñar en el laboratorio osteo mucosa, con el fin que esta pueda ser usada en su cirugía para reconstruir el paladar. De esa forma se beneficiarán otros pacientes con la misma condición de labio y/o paladar hendido, y se podrá contar con una alternativa de tratamiento diferente al que se brinda actualmente, para poder disminuir el número de cirugías, mejorar la cicatrización y así mismo mejorar la calidad de vida de los niños (as) afectados.

¿Estoy obligado a participar en el estudio?

Su participación es completamente voluntaria. Si usted decide no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, aun cuando haya iniciado su participación puede hacerlo sin que esto signifique un perjuicio o sanción para usted y la clínica seguirá brindándole la atención que su hijo(a) requiere.

¿Cómo se manejarán mis datos personales?

Todos los datos obtenidos son estrictamente confidenciales y con fines académicos. Garantizamos que toda la información suministrada será custodiada por el investigador principal y sus datos personales no será publicados ni revelados. Los resultados de la investigación se compartirán con el grupo médico-odontológico de la Clínica, siguiendo normas estrictas de publicación en revistas, conferencias, congresos etc., y su información personal permanecerá completamente confidencial.

Previamente le hemos brindado información acerca de la investigación que vamos a realizar para invitarlo a participar en esta de forma voluntaria. No tiene que decidir hoy si va a participar o no. Antes de decidir, puede hablar con alguien idóneo, con quien sienta confianza, sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda, usted me puede interrumpir y yo le explicaré o ampliaré la información si lo desea. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarme a mí, o a miembros del equipo de investigación.

Yo _____, identificado(a)

con cédula de ciudadanía N° _____, por medio de este documento y teniendo el derecho legal de consentimiento para la participación de mi hijo(a) _____ manifiesto que:

1. He sido invitado(a) a participar voluntariamente en esta investigación aportando información y donando las muestras de tejido de paladar duro, dado que mi hijo/a debe ser sometido a un procedimiento de cierre del labio o del paladar por indicación explícita del médico tratante
2. He sido informado(a) acerca del proyecto, y que la toma de esta muestra implicará un riesgo mínimo para la salud de mí hijo(a).
3. Acepto que no recibiré compensación alguna y que libero a los investigadores e institución participante de toda obligación económica para conmigo o mí hijo(a).
4. Se me ha explicado que los procedimientos de análisis a los que se sometan las muestras no tendrán ningún costo para mí.
5. Se me ha asegurado que los resultados obtenidos a partir de las muestras de mi hijo/a se manejarán de manera responsable y sólo con fines académicos y científicos. En efecto, se me ha informado que participar en la investigación no tendrá un beneficio directo para mí hijo (a), pero en un futuro podrían verse beneficiados aquellos niños que presenten labio y/o paladar hendido.
6. Se me ha informado que se protegerá mi privacidad y la de mi hijo (a), a través de la reserva de mi identidad, omitiendo cualquier dato que permita identificar a mí hijo(a) en el momento de la divulgación de los resultados de la investigación.
7. Se me ha explicado que, en cualquier momento, en caso de alguna duda, inconveniente o consulta de los resultados de la investigación relacionados con mi hijo(a), podré contactar a la Doctora Mónica Tatiana Parada Sánchez, o a la Doctora Sandra Liliana Alfonso García integrantes del Grupo de Investigación Sinergia Odontológica al teléfono 2196772 o al celular 3103296947, igualmente puedo contactar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia al teléfono 2196740 o ubicar a los investigadores y al Comité de Ética en la Calle 64 No 52-59 - Bloque 31, área de la salud en la ciudad de Medellín.
8. Autorizo a los investigadores para utilizar los datos o muestras en futuras investigaciones.
9. Entiendo que la participación de mi hijo/a en esta investigación puede terminar en el momento en que yo lo decida y lo exprese a los investigadores responsables sin que perjudique la futura atención de mi hijo(a).
10. Mi firma en este documento manifiesta mi participación voluntaria y la de mi hijo(a) en este proyecto de investigación.

Con la suscripción del presente documento, autorizo de manera voluntaria, previa, explícita, informada e inequívoca a las Instituciones participantes en esta investigación, para tratar mis datos personales y los de mi hijo(a), de acuerdo con la política de tratamiento de datos personales y para los fines relacionados con el objeto de la misma, en especial para fines legales, descritos en la política de tratamiento de datos personales de cada una de las instituciones. La información

obtenida para el Tratamiento de mis datos personales la he suministrado de forma voluntaria y es verídica.

CERTIFICACIÓN DE CONSENTIMIENTO DE LOS PADRES PARA MENORES DE EDAD

Declaro que he entendido la información contenida en el presente documento relacionada con el procedimiento y el objetivo de la investigación a desarrollar, y que igualmente, he tenido la oportunidad de hacer las preguntas o inquietudes que me han surgido.

En consecuencia, en uso de todas mis facultades legales y mentales, y libre de cualquier presión, con mi firma autorizo para que se tome la muestra de encía de paladar durante la cirugía de cierre de labio o paladar de mi hijo(a) y para que se trabaje y se estudie esta muestra en el laboratorio. Además, autorizo que los resultados de dicho estudio puedan ser incluidos, analizados y publicados en la investigación mencionada.

Firma y C.C. del representante legal

Firma y C.C. del Investigador

Dirección y teléfono de contacto:

Dirección y teléfono de contacto:

Firma - C.C. y parentesco de testigo (1)

Firma - C.C. y parentesco de testigo (2)

Dirección y teléfono de contacto:

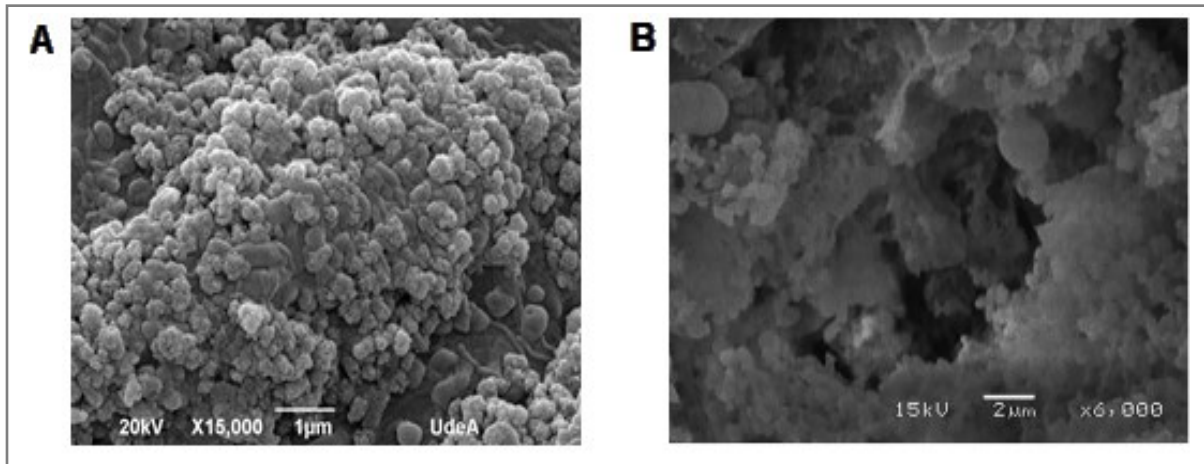
Dirección y teléfono de contacto:

El presente consentimiento se firma en Medellín a los ____ días del mes _____
del año_____.

Anexo 2. Condiciones de los primers de la qRT-PCR

Nombre del gen	Temperatura melting teórica (°C)	Temperatura melting reacción (°C)	Threshold	Eficiencia de amplificación (%)
Colágeno 1A1 (<i>COL1A1</i>)	85	86	0.05	100
Alfa actina de músculo liso (<i>ACTA2</i>)	78	82.5	0.06	98
Integrina alfa5 (<i>ITGA5</i>)	83	84.5	0.05	96
Integrina beta 1 (<i>ITGB1</i>)	77	78.6	0.13	96
Tenascina C (<i>TNC</i>)	78	79.679	0.05	98
Receptor tipo 2 de BMP2 (<i>BMPR2</i>)	79	80.8	0.05	95
Fosfatasa alcalina (<i>ALPL</i>)	82	84.4	0.05	99
Vinculina (<i>VCL</i>)	82	83.3	0.05	96
Rho A (<i>RHOA</i>)	80	81.2	0.05	97
Beta-catenina (<i>CTNNB1</i>)	78	80	0.05	98
Factor de transcripción relacionado con el factor 2 de transcripción runt del homo sapiens (<i>RUNX2</i>).	86	85.2	0.05	100
Homo sapiens familia Wnt miembro 3a (<i>WNT3a</i>)	88	89	0.09	99
Fosfoproteína 1 secretada homo sapiens (<i>SPP1</i>)	79	80.3	0.05	99
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>GAPDH</i>)	82	82	0.01	98
Proteína ribosómica L27 (<i>RPL27</i>)	84	85	0.05	97

Anexo 3. Nanopartículas secretadas por esferas derivadas de hGF CL \pm P NS y una línea de osteoblastos humanos



Nota. Imagen comparativa de la superficie de dos esferoides donde se observan nanopartículas con morfología y tamaño similares. (A). Esferoide hGF CL \pm P NS de 21 días de cultivo formado espontáneamente, por medio de la técnica de superposición de líquidos sin adición de factores exógenos. (B). Esferoide de una línea de osteoblastos humanos en cultivo formado por medio de levitación magnética, e incubado en medio osteogénico durante 14 días. Imagen tomada de Gaitán-Salvatella et al. (341)