

**PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR DE UNA MEMBRANA DE
POLICAPROLACTONA (PCL) E HIDROXIAPATITA (HA) SOBRE
FIBROBLASTOS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL: REVISIÓN DE ALCANCE**

Camargo Rojas Kamila María*; Colmenares Castillo Walter*; Puerto Viajan Zulma*.

*Estudiantes Posgrado de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad Antonio Nariño. Bogotá, Colombia.

Alfonso Rodríguez Camilo Andrés*; Garzón Hernán Santiago*.

*Docentes posgrado de Periodoncia, facultad de Odontología, Universidad Antonio Nariño. Bogotá Colombia

Número de palabras (sin citas): 6560

Tablas y figuras: 1 tablas y 1 figura

Título corriente: Proliferación y viabilidad celular de una membrana de Policaprolactona (PCL) e Hidroxiapatita (HA) sobre fibroblastos del ligamento periodontal: Revisión de alcance.

Resumen en una oración: Esta revisión destaca la evidencia sobre la proliferación y viabilidad celular empleando policaprolactona e hidroxiapatita por sí solas y en combinación principalmente en fibroblastos del ligamento periodontal.

Palabras clave: regeneración periodontal, hidroxiapatita, policaprolactona, proliferación celular, viabilidad celular, fibroblastos, ligamento periodontal.

Conflicto de interés y fuente de financiación: Los autores no tienen ningún interés económico, ni directo ni indirecto, en los productos o la información adjunta al artículo. Contribución del autor K. Camargo: Diseño del artículo, preparación del manuscrito y borrador inicial, contribución con casos clínicos, revisión final del trabajo; responsable de todos los aspectos del trabajo; W. Colmenares: diseño del artículo, adquisición e interpretación de datos de la literatura, preparación del manuscrito y borrador inicial, revisión final del trabajo; responsable de todos los aspectos del trabajo; Z. Puerto: diseño del artículo, adquisición e interpretación de datos de la literatura, preparación del manuscrito y borrador inicial, revisión final del trabajo; responsable de todos los aspectos del trabajo; H. S. Garzón y C. Alfonso: revisión crítica del borrador y contribución a la redacción del manuscrito; aprobación final de la versión a publicar y responsable de la exactitud o integridad del trabajo.

Abstract:

Introduction: Periodontal ligament is a not mineralized connective tissue, it contains a stem cells population. Its regeneration can be achieved thanks to the cell proliferation and viability. Although there is evidence about the use of biomaterials in periodontal regeneration they propose the PCL(polycaprolactone) and Hydroxyapatite (HA) as the aim of this review, in as much as they have proved having meaning advantages overall, becoming them into investigation target toward future biomaterials elaboration which only dont have mechanical and rheological properties according to oral environment but also regenerative and immunomodulatory properties. The aim of this review was summarizing the current knowledge found in the literature about the cytotoxic effects of polycaprolactone and hydroxyapatite on fibroblasts of the periodontal ligament.

Materials and methods: Scoping review, bibliographic search since 1997 to 2020 published on Medline-PubMed, Web of Science and Cochrane databases, during february and march oh 2021. Inclusion criteria: 1). Experimental studies *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, 2) Studies which evaluated cell proliferation and viability in PCL and HA membranas 3). Preclinical trials 4). Reviews 5). Articles publishes in spanish and english, 6). Documents published between 1997 and 2020. They made a thematic analysis for topics in each membrane: Celular types, celular assays, evaluation times of prolifertion and cell viability.

Results: 40 articles were found, 29 were in vitro studies, 5 in vivo studies, 3 in vitro/ in vivo studies, 3 ex vivo studies and 1 review. Th estudies which analized proliferation and/or cell viability were 18, in hydroxyapatite were 10 and both 12. The MTT assay was the most common for cell viability value, as well as most of the studies reported cualitative results. There is a directly proportional relationship between hydroxyapatite - polycaprolactone concentration and cell proliferation as well as nanostructuring of hydroxyapatite which showed improving significantly the cell proliferation. Although mostly of studies employed the PCL in conjuction with another biomaterials, it showed this one improves the cell viability and proliferation by itself and in conjuction; both biomaterials HA and PCL performed positive effects in cell viability and proliferation even in unión with another biomaterials and some modifications of their physical and mechanical properties such as roughness and concentration.

Conclusion: The collected scientific evidence in this review lets concluding that polycaprolactone and hydroxyapatite are two biomaterials which have shown improving or increasing the cell viability and proliferation even at a specifical level of fibroblasts, including gingival fibroblasts; thanks to physical, chemical and biological properties of them

along with mesenchymal cells of periodontal ligament (fibroblasts), which can be useful in periodontal regeneration for patients who show or have shown periodontal disease like tisular regeneration therapy.

Resumen:

Introducción: El ligamento periodontal (PDL) es un tipo de tejido conectivo no mineralizado, el cual contiene una población de células progenitoras. Su regeneración puede lograrse gracias a la proliferación y viabilidad celular. Aunque existe evidencia del uso de los biomateriales en la regeneración periodontal, se plantean la policaprolactona (PCL) y la hidroxiapatita (HA) como el objeto de estudio de esta revisión, puesto que han demostrado tener ventajas significativas en conjunto, convirtiéndolas en blanco de investigación hacia la futura elaboración de biomateriales que no sólo tengan propiedades mecánicas y reológicas acordes al medio ambiente oral, sino además propiedades regenerativas e inmunomoduladores. El objetivo de esta revisión fue resumir el conocimiento actual sobre los efectos citotóxicos de la policaprolactona e hidroxiapatita en fibroblastos del ligamento periodontal encontradas en la literatura.

Materiales y métodos: Revisión de alcance, búsqueda bibliográfica de 1997 a 2020 publicada en Medline-PubMed, Web of Science y Cochrane, durante el periodo de febrero y marzo de 2021. Criterios de inclusión :1). Estudios experimentales *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, 2) Estudios que evaluaran la proliferación y viabilidad celular en membranas de Policaprolactona (PCL), e Hidroxiapatita (HA), 3). Ensayos preclínicos, 4). Revisiones bibliográficas, 5). Artículos publicados en inglés y español, 6). Documentos publicados entre 1997 y 2020. Se realizó análisis temático por tópicos en cada membrana: Tipos celulares,

tipos de ensayos de proliferación celular, tiempos de evaluación de la proliferación y viabilidad celular.

Resultados: Se encontraron 40 artículos, 29 fueron estudios in vitro, 5 estudios in vivo, 3 estudios in vitro/in vivo, 3 estudios ex vivo, y 1 revisión de la literatura. Los estudios que analizaron proliferación y/o viabilidad celular en policaprolactona fueron 18, en hidroxiapatita 10 y combinados 12. El ensayo de MTT fue el más usado para evaluar la viabilidad celular, así como la mayoría de los estudios reportaron resultados cualitativos. Existe una relación directamente proporcional entre la concentración de la hidroxiapatita y la policaprolactona, con la proliferación celular, así como la nanoestructuración de la hidroxiapatita mostró mejorar significativamente la proliferación celular. Aunque la mayoría de estudios emplearon la PCL en combinación con otros biomateriales, se demostró que esta mejora la viabilidad y proliferación celular por sí sola y en combinación; ambos biomateriales HA y PCL ejercieron efectos positivos en la viabilidad y proliferación celular, incluso en conjunto con otros biomateriales y algunas modificaciones de sus propiedades físicas y mecánicas como la rugosidad y concentración.

Conclusión: La evidencia científica recolectada en esta revisión permite concluir que la policaprolactona e hidroxiapatita son biomateriales que han demostrado mejorar y/o aumentar la proliferación y viabilidad celular incluso a nivel específico de los fibroblastos, incluyendo los gingivales; gracias a las propiedades físicas, químicas y biológicas de estos junto con células mesenquimales del ligamento periodontal (fibroblastos), las cuales pueden ser muy útiles en la terapia periodontal y regeneración tisular guiada en pacientes que presentan o han presentado enfermedad periodontal.

Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica con alta prevalencia dentro de la población mundial. Según el Global Burden of Disease Study (2017), la enfermedad periodontal grave fue la undécima afección más prevalente en el mundo¹. Además, se informó que la prevalencia de la enfermedad periodontal oscila entre el 20% y el 50% en todo el mundo². Dicha enfermedad resulta en la pérdida de tejido conectivo y soporte óseo y es una de las principales causas de pérdida de dientes en adultos³. En Colombia, de acuerdo con el IV Estudio Nacional de Salud Bucal, el 50.2% de la población presentó pérdida de inserción periodontal, siendo mayor en hombres (52.6%) que en mujeres (47.6%) y el 32.8% de las personas entre los 15 y 19 años ya presentaban pérdida en el nivel de inserción⁴. Esta enfermedad se caracteriza por el daño irreversible en los tejidos de soporte dental (que incluyen el hueso alveolar, el ligamento periodontal (LP) y el cemento), ocasionando problemas funcionales y estéticos para los pacientes⁵. Para contrarrestar dichos efectos es necesaria la restauración del aparato de soporte dental dañado, lo cual es un proceso extremadamente complejo debido a la regeneración del cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar⁶. Aunque si bien, el tratamiento convencional periodontal busca controlar y detener la enfermedad, se generan procesos reparativos mas no regenerativos. Así, la regeneración tisular guiada (RTG) es un procedimiento quirúrgico que busca dar solución a este dilema, regenerando los tejidos periodontales cuando la enfermedad está avanzada y podría superar ciertas limitaciones de la terapia periodontal convencional⁷.

Dicha regeneración puede lograrse en grados variables empleando diversos métodos y materiales como lo son: biomateriales orgánicos dentro de los cuales se encuentra el Fosfato tricálcico (TCP), el Fosfato cálcico bifásico (BCP), con una composición química similar a

la fase inorgánica del hueso, es un material bioabsorbible de capacidad osteoconductor; el vidrio bioactivo (VB), que posee iones disueltos de VB, los cuales promueven la angiogénesis, la osteogénesis y la actividad antibacteriana, también son empleados polímeros naturales como el Colágeno hidrolizado, siendo la proteína más abundante en la matriz extracelular del hueso alveolar, PDL y cemento; gelatin PDL, producto de hidrólisis del colágeno, la segunda a diferencia de la primera no presenta como riesgo la transmisión de patógenos y/o alguna reacción inmune⁸. Así, existen también Polímeros sintéticos, como el Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que resulta factible para inducir la regeneración de tejidos dentales al promover la formación de dentina, cemento e incluso pulpa, ya que las BMP, inducen el crecimiento y regeneración de tales tejidos⁹. En esta revisión se considerará la hidroxiapatita (HA) como biomaterial orgánico y la policaprolactona (PCL) como polímero sintético y cuyas características serán detalladas a continuación, especialmente referentes a sus efectos citotóxicos o de viabilidad celular en los fibroblastos del ligamento periodontal.

La hidroxiapatita es una cerámica sintética de fosfato cálcico, que desde los años 70's se ha estudiado como un material osteoinductor, y ha sido empleado en la preservación de reborde alveolar, fracturas mandibulares, reconstrucción de huesos faciales, prótesis ortopédicas, artrodesis, implantes dentales, en la reconstrucción de oído medio con prótesis¹⁰. Hay que poner otros usos, no sólo este. Esto es gracias a que tiene efectos osteoconductores y puede promover la proliferación y la diferenciación osteogénica de las células del ligamento periodontal y, además, que puede usarse como agente bio-reabsorbible¹¹. Se ha demostrado que la hidroxiapatita ha ayudado a establecer epitelio largo de unión e incluso la formación de hueso periférico en pacientes con enfermedad periodontal¹².

Por otra parte, la policaprolactona, es un poliéster alifático semicristalino cuya estructura comprende una unidad repetida de un grupo éster y cinco grupos metileno¹³. Posee además biocompatibilidad y una tasa de degradación lenta, además de no presentar evidencia de efectos citotóxicos, presenta resistencia mecánica adecuada, biodegradabilidad y facilidad de fabricación. Se ha demostrado también en estudios sobre su eficacia una mejora de la formación ósea en presencia de una notable unión y proliferación de células óseas¹³.

El ligamento periodontal (PDL) es un tipo de tejido conectivo no mineralizado, el cual contiene una población de células progenitoras¹⁴. Dichas células madre, han demostrado contribuir a una proliferación celular exitosa, lo cual implica que en dientes que han sido afectados por periodontitis y tratados bajo terapia convencional, podría lograrse la regeneración de las estructuras de soporte dental que se habían perdido¹⁴. Dicha capacidad de viabilidad celular de los fibroblastos del ligamento periodontal entendida como la cantidad de células sanas en una muestra, es fundamental en el proceso de regeneración periodontal, puede ayudar a determinar el éxito o fracaso del tratamiento regenerativo¹⁵.

Esta regeneración puede lograrse gracias a la proliferación y viabilidad celular; la primera se relaciona con el aumento en el número de células resultante de la división celular, este es un proceso complejo, estrictamente controlado y bien definido¹⁶; mientras que la viabilidad celular hace referencia a la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular, ésta es un marcador predictivo para un buen funcionamiento de los futuros tejidos¹⁷.

Por consiguiente, existen diversas técnicas que permiten medir la citotoxicidad (proliferación y viabilidad celular) como el MTT o la citometría con yoduro de propidio. La primera, es un método simple que emplea el MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-

difeniltetrazólico) para determinar la viabilidad celular mediante un compuesto coloreado que mide número de células presentes en un cultivo, gracias a una reacción en las mitocondrias de dichas células quienes captan el compuesto y se reduce por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble llamada formazan¹⁸. Así, la cantidad de MTT puede ser cuantificada con el cambio de coloración (de amarillo a azul) y es un indicador de la actividad funcional mitocondrial, es decir de la viabilidad celular¹⁸. La segunda, es un método rápido y confiable para cuantificar células viables; el cual distingue las células muertas en una suspensión celular, estas se reconocen mediante la tinción de anticuerpos no específicos o mediante la captación de sondas fluorescentes, como lo es el yoduro de propidio (PI), el cual es un colorante impermeable a la membrana celular que generalmente se excluye de las células viables y se excita a 488 nm, emitiendo una longitud de onda máxima de 617 nm, por lo que se puede usar en combinación con otros fluorocromos excitados a 488 nm como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la ficoeritrina (PE) y además se une al ADN bicatenario intercalando entre pares de bases¹⁹.

De acuerdo a lo anterior, aunque existe evidencia del uso de los materiales mencionados anteriormente en la regeneración periodontal, se plantean la PCL y la HA como el objeto de estudio de esta revisión, puesto que han demostrado tener ventajas significativas en conjunto, convirtiéndolas en blanco de investigación hacia la futura elaboración de biomateriales que no sólo tengan propiedades mecánicas y reológicas acordes al medio ambiente oral, sino además propiedades regenerativas e inmunomoduladoras. Por lo tanto, el objetivo de esta revisión de alcance, es realizar una síntesis de los estudios publicados desde 1997 hasta 2020 sobre las propiedades de viabilidad celular de la policaprolactona e hidroxiapatita en fibroblastos del ligamento periodontal encontradas en la literatura.

Materiales y métodos

Se realizó una revisión de alcance internacional de la literatura publicada, abarcando todos los estudios encontrados sin límite de tiempo, desde el primero reportado en 1997 hasta 2020, durante el periodo de febrero y marzo de 2021 para la elaboración de esta revisión narrativa. Las bases de datos incluidas en la estrategia de búsqueda de la información fueron: Medline-PubMed, Science Direct y Cochrane

Los criterios de inclusión para el análisis de los documentos fueron los siguientes: 1). Estudios experimentales in vitro, in vivo, ex vivo, 2) Estudios que evaluaran la proliferación y/o viabilidad celular de los fibroblastos gingivales de la hidroxiapatita y la policaprolactona, 3). Ensayos preclínicos, 4). Revisiones bibliográficas, 5). Artículos publicados en inglés y español, 6). Documentos publicados entre 1997 y 2020 (tomando en cuenta la fecha más antigua en la que se encontraron resultados publicados y la última fecha de búsqueda previa a la elaboración de la revisión)

Las palabras claves se basaron en los términos: “cell viability”, “cell proliferation”, “fibroblast”, “hydroxyapatite”, “polycaprolactone”. Todos los términos incluidos en la revisión se encuentran dentro de la búsqueda Mesh. Se emplearon como algoritmos de búsqueda: (“cell proliferation” AND “fibroblast” AND “polycaprolactone”), (“cell proliferation” AND “fibroblast” AND “hydroxyapatite”), (“cell proliferation” AND “fibroblast” AND “hydroxyapatite” AND “polycaprolactone”), (“cell viability” AND “fibroblast” AND “polycaprolactone”), (“cell viability” AND “fibroblast” AND

“hydroxyapatite”) y (“cell viability” AND “fibroblast” AND “hydroxyapatite” AND polycaprolactone”). Los resultados de la estrategia de búsqueda se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de algoritmos de búsqueda.

ALGORITMO	RESULTADOS	RESULTADOS	RESULTADOS
	PubMed	Science Direct (medicine and dentistry)	Cochrane
“cell proliferation” AND “fibroblast” AND “polycaprolactone”	97	40	1
“cell proliferation” AND “fibroblast” AND “hydroxyapatite”	80	61	1
“cell proliferation” AND “fibroblast” AND “hydroxyapatite” AND “polycaprolactone”	20	10	0

“cell viability” AND	31	19	1
“fibroblast” AND			
“polycaprolactone”			
“cell viability” AND	27	25	0
“fibroblast” AND			
“hydroxyapatite”			
“cell viability” AND	15	12	0
“fibroblast” AND			
“hydroxyapatite”			
AND			
polycaprolactone”			
Total	270	167	3

La búsqueda bibliográfica se basó en la información existente sobre la proliferación celular y/o viabilidad celular de la hidroxiapatita y la policaprolactona en fibroblastos gingivales. En la búsqueda inicial se recopilaron 440 artículos potenciales para el análisis, posterior a la preselección por título y resumen, se eligieron aquellos relacionados con la temática de la revisión narrativa (se seleccionaron 96 artículos). El proceso de búsqueda fue realizado por dos investigadores, por separado, cada uno evaluó que los artículos seleccionados cumplieran los criterios de inclusión, las disparidades fueron evaluadas por un tercer investigador, quien

finalmente hizo la revisión de cada uno de los artículos por título y abstract para determinar la selección de los mismos. De estos artículos, bajo el cumplimiento de los criterios de inclusión, se excluyeron 56 artículos. Por lo cual, finalmente se seleccionaron 40 artículos que cumplieron con los criterios de inclusión para ser analizados. En la figura 1 se representa la estrategia de búsqueda y proceso de selección mediante el diagrama de flujo.

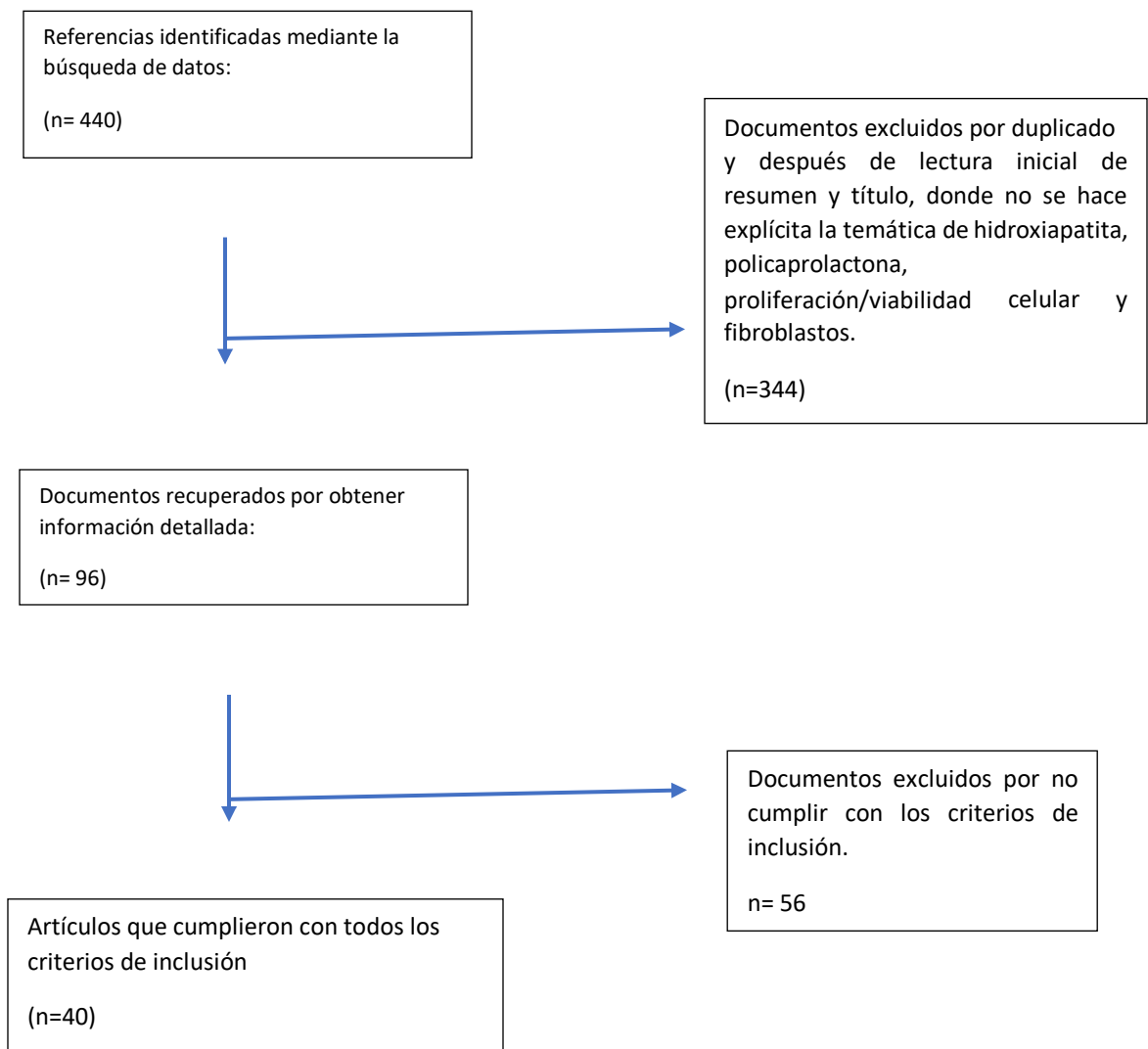


Figura 1. Diagrama de flujo del estudio. Proceso de selección de los documentos.

Extracción de datos: Se recopilaron los 40 artículos que cumplieron con los criterios de inclusión y se realizó la comprobación de los ítems para ser incluidos en la revisión de acuerdo con la declaración PRISMA, abarcando título, autores, fuente y año de publicación, resumen estructurado, introducción donde se incluye Objetivos y justificación, materiales y métodos, resultados y características de los estudios, en una matriz de Excel. Anexo 1 (Tabla Resumen Analítico Especializado según matriz PRISMA para inclusión de estudios)

Análisis de datos: Se realizó análisis temático y se agruparon los documentos por tópicos, los cuales fueron: Proliferación celular de fibroblastos en hidroxiapatita, proliferación celular de fibroblastos en policaprolactona, proliferación celular de fibroblastos en hidroxiapatita y policaprolactona combinados; viabilidad celular de fibroblastos en hidroxiapatita, viabilidad celular de fibroblastos en policaprolactona, viabilidad celular de fibroblastos en hidroxiapatita y policaprolactona combinados, tiempos de evaluación de la proliferación celular y resultados cuantitativos y cualitativos. Estas temáticas fueron abordadas para cada biomaterial individualmente y en combinación.

De acuerdo con la Resolución 8430 de 1993, esta investigación no fue realizada en seres humanos, por lo que se cataloga sin riesgo.

Resultados

De los 40 artículos, 29 fueron estudios in vitro^{21,24,26,27,29,30,31,32,33,34,38,40,42,43,44,45,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,59}, 5 estudios in vivo^{20,23,25,28,39}, tres estudios in vitro/in vivo^{22,35,46}, tres estudios ex vivo^{36,37,58}, y una revisión de la literatura⁴¹.

Los estudios que analizaron proliferación y/o viabilidad celular en policaprolactona fueron 18, en hidroxiapatita 10 y combinados 12.

Proliferación Celular: Hidroxiapatita

Ensayos de proliferación/ viabilidad celular:

El crecimiento y la proliferación de células de fibroblastos en Hidroxiapatita (HA) se analizó mediante varios ensayos, dentro de los cuales se encontraron dos estudios para la proliferación celular^{28,34}, un ensayo de viabilidad MTT T (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol2il] -2,5-difeniltetrazolio); y dos estudios en cuanto a viabilidad celular^{29,55}. La microscopía electrónica de barrido (SEM) fue útil en cinco de los ensayos incluidos para evaluar la proliferación,^{28,34,54} (9,15,35) y viabilidad celular^{27,56}. Un estudio incluyó la tinción de hematoxilina- eosina (HE), tinción de Masson y técnicas cuantitativas de reacción en cadena de la polimerasa para la proliferación celular⁵⁴. Un ensayo de microscopía confocal fue empleado en uno de los estudios²⁷, así como el ensayo de exclusión de colorante azul tripán en otro⁵⁶. También, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue usada para la evaluación de la proliferación celular en un estudio³⁴.

Tiempo de evaluación de proliferación celular

Para la evaluación de la proliferación celular fueron evaluados diferentes tiempos de cultivo. De un total de 9 estudios, un estudio la evaluaron en horas⁵⁵, cinco estudios evaluaron la proliferación en días ^{27,28,33,34,56}, un estudio la evaluaron en semanas⁵⁴, dos estudios la evaluaron en meses ^{37,58}. El tiempo de evaluación más común fue entre dos y seis días en

cuatro estudios^{27,33,34,56}, hasta 21 y 28 días en dos estudios^{27,28}. En dos estudios ex vivo el tiempo llegó a extenderse a 6 y 12 meses^{37,58}.

Resultados de proliferación celular

De acuerdo con la revisión de la literatura encontrada, seis estudios arrojaron resultados cuantitativos^{27,28,29,34,55,56} y cinco estudios arrojaron resultados cualitativos^{33,34,37,54,58}.

Dentro de los resultados cualitativos, la presencia de partículas de HA se relacionó significativamente con un aumento en la proliferación de fibroblastos del ligamento periodontal humano, además de promover la diferenciación osteogénica de las células del ligamento periodontal y funcionar como agente biorreabsorbible en la restauración ósea^{33,34}.

También se resalta que la hidroxiapatita en combinación con otros biomateriales como el gel de quitosano (GQS) pueden aumentar mejor la proliferación y diferenciación osteogénica de los fibroblastos⁵⁴. Así como también se ha descrito la combinación de hidroxiapatita con factor rico en plaquetas (FRP) y Combinación de células mononucleares autólogas de médula ósea (BMMNC) para promover la regeneración ósea en defectos de la hendidura alveolar⁵⁸.

Los resultados cuantitativos mostraron que la combinación de Hidroxiapatita con polilactida fotocurable (PLA) puede aumentar el número de células y la viabilidad proliferativa celular, lo que conlleva a la formación de hueso nuevo y osteoide²⁸. También existen diferencias en cuanto a la proliferación en hidroxiapatita densa y sus nanopartículas, además del aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina³⁴. La Hidroxiapatita en una matriz dérmica acelular porcina (HA-PADM), demostró que los fibroblastos del ligamento periodontal podían crecer, proliferar y mantener viabilidad después de un cultivo prolongado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los andamios de estructura PADM pura y andamios HAp-PADM después siembra durante un día. Sin embargo, después de 3, 5 y 7

días de cultivo, la viabilidad de las células en HAp-PADM fue significativamente mayor que los de PADM puro (P, 0.05, P, 0.01 y P, 0.01 respectivamente)²⁹. Se observó también en Hidroxiapatita de conchas de cangrejo su biocompaibilidad, mostrando un gran porcentaje de células vivas con un cultivo de fibroblastos gingivales⁵⁵. La hidroxiapatita cerámica también fue evaluada con respecto a la no cerámica, demostrando que la primera tuvo un retraso en el crecimiento celular durante los 5 primeros días del estudio y que la hidroxiapatita cerámica mostró porcentajes de viabilidad celular significativamente más bajos que los otros grupos entre el 60 y 100%. Así, se demostró que la hidroxiapatita favorece el crecimiento celular y el metabolismo de los fibroblastos, incluida la producción de colágeno, y por tanto es biocompatible⁵⁶.

Proliferación Celular: Policaprolactona

Ensayos de proliferación/ viabilidad celular

El crecimiento y la proliferación de células de fibroblastos en Policaprolactona (PCL) se analizaron mediante un ensayo de viabilidad MTT T (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol2il] - 2,5-difeniltetrazolio), en dos estudios para la proliferación celular ^{21, 57}, y en tres estudios en cuanto a viabilidad celular ^{22,26,46}, la microscopía electrónica de barrido (SEM) fue usada en uno de los ensayos⁵², dos estudios incluyeron la tinción de hematoxilina- eosina (HE)^{20,39}, dos estudios incluyeron tinción de Masson^{20,39}. El ensayo Alamar Blue fue usado en un estudio²⁴. Por otro lado, dos estudios emplearon la Electroscopía infrarroja Fourier (FTIR)^{31,52}. También, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue usada para la evaluación de la proliferación celular en un estudio⁵². Otros ensayos fueron empleados en

estos estudios para evaluar características diferentes a la viabilidad celular, como el estudio de liberación OTC (oxitetraciclina)⁵⁹ o análisis tomográfico (micro TC)³⁶.

Tiempo de evaluación de proliferación celular

Para la evaluación de la proliferación celular fueron evaluados diferentes tiempos de cultivo. De un total de 15 estudios, cuatro se evaluaron en horas^{21,24,25,26}, cinco se evaluaron en días^{20,31,52,53,38}, cuatro se evaluaron en semanas^{20,38,39,46} y dos se evaluaron en meses^{22,36}. El tiempo de evaluación más común fue entre uno y siete días en cinco estudios^{20,31,52,53,57}, hasta 14 días en un estudio⁵², y de 6 a 48 horas en dos estudios^{24,25}, por periodos de 24,78 y 72 horas en dos estudios^{21,26}, incluso semanas 8, 16,12 y 6 en cuatro estudios^{20,38,39,46}. En dos estudios ex vivo el tiempo llegó a extenderse entre dos y seis meses^{22,36}.

Resultados de proliferación celular

De acuerdo con la revisión de la literatura encontrada, 8 estudios arrojaron resultados cuantitativos^{20,21,22,26,36,37,52,57} y 11 cualitativos^{24,25,31,35,38,38,39,41,46,52,53,59}. En cuanto a los resultados cualitativos, se mostró el empleo de membranas de PCL funcionalizadas con Ácido poli-glutámico (PGA) con la hormona antiinflamatoria (melanocortina, α -MSH) incorporada (PGA- α -MSH), las cuales redujeron la proliferación de células epiteliales y Fibroblastos estimuladas con Lipopolisacáridos²⁴. También las membranas con PCL demostraron mejorar significativamente el nivel clínico de inserción y reducir la destrucción ósea inducida por la inflamación y migración gingival, en combinación con Ibuprofeno (IBU-PCL), influyendo en la proliferación de fibroblastos y células epiteliales²⁵. Otras observaciones demostraron que el andamio PCL sintetizado es adecuado para la unión y supervivencia de las células madre mesenquimales y puede adaptarse a la unión celular

cuando se prueba en células madre mesenquimales, las propiedades de electrohilado, le confieren también propiedades mecánicas de tensión y módulo elástico más débiles en comparación en tejido de ligamento cruzado anterior³¹. Las células madre mesenquimales (hMSC) proliferan bien en PCL junto con un recubrimiento de fibronectina, poli-l-lisina y fibronectina (FN + PLL + FN) (cPCL MC). Además de demostrar inducción osteogénica in vitro, mostrando un aumento en la deposición de Calcio³⁸. La PCL en combinación con policaprolactona-fosfato tricálcico (TCP) mostró además un aumento en el volumen óseo, así como en combinación con proteína morfogenética ósea humana recombinante-2 (BMP2) y con partículas óseas autógenas ABP³⁹. Además, se ha estudiado las propiedades de citotoxicidad de nanofibras PCL-OTC (oxitetraciclina), resultando ligeramente citotóxica para bacterias, encontrando un potencial como sistema de administración de fármacos para el tratamiento de la enfermedad periodontal⁵⁹. La capacidad de las células madre de diferenciarse y proliferar en una membrana de PCL, puede verse afectada; se demostró que células aisladas de encías sanas y enfermas pueden afectar la eficiencia de la unidad formadora de colonias, disminuir la actividad de la fosfatasa alcalina, generar una mineralización de osteoblastos más débil y una mayor propensión a diferenciarse en adipocitos que sus contrapartes sanas⁵³. Se demostró que en los andamios de PCL-TCP, la propagación y la viabilidad de las células mejoraron notablemente y que la adición de partículas de fosfato cálcico bifásico en los andamios de PCL no tiene un efecto fuerte sobre la formación de hueso nuevo, mientras que la PCL junto con la inmovilización de colágeno mejoró significativamente la regeneración ósea⁴⁶.

Los resultados cuantitativos, mostraron que tanto los andamios PCL como PCL-SIM (simvastatina) no tuvieron efectos sobre la proliferación de PDLSC ($P > 0,05$), los

fibroblastos del ligamento periodontal PDLSC fueron capaces de adherirse a los andamios y exhibieron una morfología de huso saludable, con un porcentaje de viabilidad del 400%²⁰. La modificación de la superficie de la PCL con plasma frío atmosférico mostró mejoría en el crecimiento y proliferación celular progresivos con valores estadísticamente significativos en comparación a la PCL sin plasma²¹. La PCL en combinación con PMMA (Polimetacrilato de metilo), estimó una viabilidad celular del 80% al 100% para la regeneración de tejido óseo²². En un andamio PCL-IBU, se demostró que esta combinación no mostró cambios significativos en la viabilidad celular y no causó ningún efecto de deterioro o inhibidor sobre el crecimiento celular²⁶. Se evaluó la PCL pura, PCL / polietileno glicol (PEG) y nanopulvos de vidrio bioactivo (VB), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el control (placa de cultivo estándar de poliestireno) y las membranas, incluida la membrana de PCL pura y sus combinaciones (valor de $P < 0,05$); ésta mostró una viabilidad y actividad de ADSC (células madre adiposas) significativamente mayor y capacidad de mineralización ósea⁵². La PCL también fue combinada con quitosano (PCL/QS), resultando en mayores tasas de crecimiento de fibroblastos humanos gingivales (FHG), las cuales fueron superadas significativamente por las nano-QS / PCL (95% o más; $P \setminus 0,001$), demostrando la mejora de la bioactividad de las mismas mediante el injerto de quitosano, además, se mostró que la alta nano-rugosidad de las películas nano-QS / PCL (entre 100 y 148 nm) puede acelerar aún más el crecimiento y proliferación de FHG (15% o más; $P \setminus 0,001$)⁵⁷. Otros estudios, muestran una reabsorción de la cresta vertical significativamente menor ($P = 0,008$) y la formación de hueso mineralizado³⁶. Así como también, un volumen óseo significativamente mayor en combinación PCL / TCP ($P < 0,05$), y resultados que carecen de significación estadística en la formación de hueso en combinación PCL / TCP / BMP2 y PCL / TCP / ABP ($P = 0,052$)³⁷.

Proliferación Celular: Hidroxiapatita y Policaprolactona (Combinados)

Ensayos de proliferación/ viabilidad celular:

La proliferación y viabilidad celular de los fibroblastos en combinación Hidroxiapatita (HA)/ Policaprolactona (PCL) fue analizada mediante un ensayo de viabilidad MTT T (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol2il] -2,5-difeniltetrazolio) en 4 estudios^{32,42,45,47}, para la proliferación celular y en 2 estudios^{44,50,51} para la viabilidad celular, la microscopía electrónica de barrido de emisión (FE-SEM) fue usada en uno de los ensayos⁴⁰ en proliferación celular y un ensayo para la viabilidad celular⁵¹. En un estudio también se empleó un ensayo con azul alamar junto con tinción viva/muerta⁴³.

Tiempo de evaluación de proliferación celular

Para la evaluación de la proliferación celular fueron evaluados diferentes tiempos de cultivo. De un total de 6 estudios, cuatro emplearon días^{30,32,40,51}, uno empleó meses⁴⁴, uno empleó horas⁴³. El tiempo de evaluación más común fue entre 3 y 7 días en cinco estudios^{30,32,40,43,51}, hasta tres meses en un estudio⁴⁴.

Resultados de proliferación celular

De acuerdo con la revisión de alcance encontrada, cinco estudios arrojaron resultados cuantitativos^{30,32,43,50,51} y seis cualitativos^{40,42,44,45,47,51}. Los resultados cualitativos, revelaron que CoHA (Cobalto-HA) se mezcla uniformemente en las membranas y ayuda a reducir la cristalinidad de PCL para obtener más cantidades de degradación que la membrana de PCL, lo cual aumenta significativamente la proliferación celular y la deposición de calcio en más del 90%, así como mejora la biodegradación y puede eliminar continuamente los radicales libres para reducir la respuesta inflamatoria⁴⁰. Las membranas de PCL recubiertas que

contienen alúmina / grafeno / hidroxiapatita carbonatada / titanio permiten una alta porosidad, por lo cual las hace más propicias para el crecimiento de fibroblastos humanos⁴². Se comparó la migración y proliferación de fibroblastos en membranas de PCL / HAp con vidrio de borosilicato con la película compuesta plana fomentando más actividad de migración celular que las películas que contienen características topográficas, las cuales procedieron más lentamente, lo que sugiere que los niveles más altos de simetría del orden topográfico imponen un estrés mecanoquímico moderado sobre las células adherentes y, por tanto, promueven una respuesta osteogénica más favorable⁴⁵. También se realizó una evaluación indirecta de la citotoxicidad de todos los armazones de lixiviación dual de PCL/HAp con células fibroblásticas de ratón y células preosteoblásticas derivadas de calvaria de ratón. Las células cultivadas en las superficies de los armazones de lixiviación dual de PCL / HA tratados con NaOH tuvieron la tasa más alta de deposición de minerales⁴⁷. En matrices electrohiladas basadas en policaprolactona cargadas con Plata (Ag) / hidroxiapatita (HA), se observó que las células podían crecer y extenderse no solo en la superficie de las fibras sino también, se extendían y adherían a través de los poros profundos de las mismas⁵¹. Finalmente, la mezcla de un electrohilado incorporado de nanohidroxiapatita Policaprolactona / Policaprolactona – Polietilenglicol–de mezcla de policaprolactona para tejido óseo mostró un rendimiento mejorado general en la viabilidad celular y la proliferación, como la presencia de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de conejo inducidas por osteogénicos (ADMSC)⁴⁴.

Los resultados cuantitativos, mostraron que la proliferación celular en andamios 3D de PCL compuestos con HA y NKB (hueso bovino Nukbone) se incrementó con respecto al tiempo, especialmente a los 7 y 14 días y en comparación con PCL sola³⁰. La combinación de

policaprolactona / gelatina / andamio electrohilado de nanohidroxiapatita, no mostró diferencias estadísticamente significativas en el día 1, al día 4, la proliferación celular aumentó hasta 0,196, 0,22, 0,24 y 0,3; la supervivencia y proliferación de las células al día 7 aumentó significativamente ($p < 0.05$) (13). La incorporación de vidrio bioactivo a nanoescala en Hidroxiapatita en PCL/quitosano, confirmó el comportamiento osteoblástico de los fibroblastos humanos del ligamento periodontal y mejoró la actividad de la fosfatasa alcalina⁴³. También la viabilidad celular de nanocompuestos PCL / HA (20%) fue estudiada en otros tipos celulares como líneas celulares de osteosarcoma humano, sugiriendo proliferación celular aumentada y mayor viabilidad de acuerdo con el tiempo de incubación⁵⁰. La plata (Ag) en adición a la PCL y HA mejoró la proporción de las células viables, con baja tasa de mortalidad sin interacción tóxica. La cual comenzó desde 97.1 al 4.6% sin contribución de Ag, luego alcanzó su nivel más bajo valor de 96,1 al 3,8%, y luego mejoró significativamente para alcanzar alrededor de 102,3 al 3,1% en el nivel más alto contribución de Ag⁵¹.

Discusión.

Esta revisión de alcance de la literatura analizó la evidencia científica disponible en sobre la viabilidad y/o proliferación celular de los fibroblastos del ligamento periodontal en hidroxiapatita y policaprolactona, por separado y combinados. La búsqueda bibliográfica inicial arrojó 440 documentos, la literatura basada en policaprolactona presentó el mayor número de resultados, seguida de la mezcla de hidroxiapatita y policaprolactonas, finalmente la basada en hidroxiapatita únicamente. Se excluyeron aquellos artículos que no incluían la hidroxiapatita y policaprolactona como biomateriales, aquellos que no analizaban la

viabilidad o proliferación celular de los fibroblastos. Finalmente se incluyeron 40 artículos para esta revisión de alcance.

Aunque se encontró una amplia variedad celular, se incluyeron únicamente los fibroblastos, principalmente los fibroblastos del ligamento periodontal. Los fibroblastos del tejido conectivo juegan un papel central en la formación de nuevos tejidos y en las fases de remodelación de la cicatrización de heridas⁶⁰. Estas células de origen mesenquimatoso, han exhibido una mayor esperanza de vida en comparación con los fibroblastos de la piel, por ejemplo, atribuida a la expresión de la telomerasa; esto permite desarrollar nuevas estrategias para controlar los procesos de cicatrización de heridas intraorales e implicarse en la regeneración tisular⁶¹. Además, se ha demostrado que las interacciones de los fibroblastos con su matriz extracelular pueden cambiar con la edad y la enfermedad, afectando así la cicatrización de las heridas orales⁶⁰. Estas células presentan interesantes propiedades de proliferación y viabilidad celular que pueden ser analizadas en aplicación clínica para la regeneración tisular guiada periodontal.

Esta revisión incluye dentro de los ensayos para la evaluación de la viabilidad y/o proliferación celular, el ensayo por reducción del compuesto MTT ^{21,22,26,28,29,32,34,42,45,46,47,55,57}, siendo el más común dentro de los estudios analizados. Dicho ensayo se prepara en una solución fisiológicamente equilibrada la cual añade a las células en cultivo, tiene carga positiva y penetra fácilmente en las células eucariotas viables; estas propiedades permiten que las células viables con metabolismo activo conviertan el MTT en un producto de formazán de color púrpura, lo cual permite discriminar la capacidad de convertir MTT en formazán en las células que presentan color⁶². Por otra parte, la tasa de reducción del MTT puede verse afectada por las condiciones de cultivo que a su vez alteran

el metabolismo de las células, por lo tanto, el ensayo MTT es una alternativa no radiactiva a la incorporación de timidina tritiada en el ADN para medir la proliferación celular⁶². Dentro de las ventajas del ensayo MTT se incluyen la facilidad y rapidez de ejecución, la reproducibilidad de los resultados y la correlación clínica observada entre las pruebas in vitro e in vivo⁶³. Alamar blue fue empleado también^{24,43}, este ensayo se basa en la conversión del tinte azul no fluorescente resazurina, que se convierte en resorufina fluorescente rosa por las enzimas mitocondriales y otras, como las diaforasas⁶³. Este compuesto es no tóxico y permeable a las células, de color azul y no es fluorescente, que, al entrar en contacto con las células, la resazurina se reduce a resorufina, de color rojo y altamente fluorescente, cambiando el color del medio de cultivo celular y relacionándose con el número de células viables⁶⁴. También, el ensayo de exclusión de colorante azul tripán⁵⁶ fue empleado para medir la viabilidad celular; con este es posible determinar el número de células viables y / o muertas en una suspensión celular. El azul tripán es una gran molécula cargada negativamente. Se basa en que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen el azul tripán, mientras que las células muertas no; así, las células viables tendrán un citoplasma claro, mientras que las células muertas tendrán un citoplasma azul⁶⁴. Dentro de sus ventajas se encuentra que el procedimiento de tinción es simple, pero se dificulta procesar un gran número de muestras al mismo tiempo. Además de impedir distinguir entre las células sanas y las células que están vivas pero que pierden funciones celulares, siendo poco sensible para su uso en pruebas in vitro⁶⁴. El ensayo CCK-8³⁰, emplea el tinte de WST-8 [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4- nitrofenil) -5- (2,4disulfofenil) -2H-tetrazolio, sal monosódica] el cual se reduce mediante la deshidrogenasa en las células para formar un producto de color naranja soluble en agua (formazán), exhibe una sensibilidad de detección superior que otros ensayos basados en sales de tetrazolio como MTT⁶⁸. También, el ensayo

de proliferación celular WST-1²⁷, el cual es un ensayo colorimétrico simple cuyo principio de este ensayo se basa en la conversión de la sal de tetrazolio WST-1 en un formazán altamente soluble en agua mediante enzimas deshidrogenasas mitocondriales en presencia de un aceptor de electrones intermedio⁶⁴, es fácil de usar, seguro, tiene una alta reproducibilidad y se usa ampliamente para determinar tanto la viabilidad celular como las pruebas de citotoxicidad⁶⁴. De acuerdo a la variedad de ensayos para la proliferación y viabilidad celular, es posible inducir que la selección de estos depende de las ventajas y desventajas que ofrecen el tipo de células y los objetivos de estudio de las investigaciones; así como la sensibilidad de los mismos.

Por otra parte, se presentaron variedad de tiempos de evaluación, de acuerdo con las necesidades y los objetivos de investigación de los diferentes estudios, fueron empleados horas, días, semanas, e incluso meses en algunos estudios ex vivo. Los días fue la medida de tiempo más empleada en la mayoría de los artículos ^{20,28,30,31,32,33,34,40,51,52,53,57}. Esto puede estar relacionado con el desarrollo de los cultivos celulares, puesto que, con el tiempo, las células pueden desarrollar la capacidad de modular su entorno⁶⁹. Además, es importante comprender el proceso de envejecimiento del fibroblasto, una vez diferenciados, estos poseen la capacidad de replicarse mediante divisiones mitóticas, experimentando aproximadamente 50 divisiones antes de adquirir una condición de senescencia y morir. Sin embargo, este número se reduce a 20 cuando los fibroblastos provienen de tejido adulto⁷⁰. Por esto es necesario conocer el tipo de células empleadas en los estudios, ya sean fibroblastos gingivales (FG) o fibroblastos del ligamento periodontal (FLP) para así mismo relacionarlos con aplicaciones clínicas ya sea en la regeneración de tejido conectivo blando en el caso de los

FG o del tejido de soporte dental radicular para los FLP⁷⁰. No se demostró diferencias específicas en cuanto al tipo de fibroblastos empleados en los artículos de la revisión.

El reporte de los resultados arrojó en 13 de tipo cuantitativo y en 27 cualitativo, de los segundos, no se presentaron resultados numéricos, relacionados con viabilidad o proliferación celular. Por lo anterior, es posible inferir que son pocos los estudios que incluyen estadísticas que soporten su validez y precisión en comparación a los que describen resultados cualitativos, tanto en hidroxiapatita como policaprolactona y estos dos combinados.

Los resultados de esta revisión muestran que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de la hidroxiapatita y la policaprolactona, con la proliferación celular^{20,34}. La tendencia a mayor tasa de proliferación celular junto con el aumento de la concentración de la hidroxiapatita, incluso el uso de nanopartículas de hidroxiapatita aumentó la actividad de proliferación celular y se asoció también a una mayor formación ósea^{28,34}. De la misma manera la policaprolactona, en la cual se demostró que el aumento de rugosidad en la superficie podría mejorar la tasa de crecimiento de los fibroblastos, en combinación con el chitosan⁵⁷.

Otro punto en discusión se relaciona con el uso de otros agentes que se han combinado con la hidroxiapatita y la policaprolactona. Si bien se encontraron varios estudios que los mencionan en conjunto^{30,32,38,40,42,44,45,47,49,50,51}. La combinación de únicamente PCL y HA se detalla en cuatro estudios^{24,45,47,50}, en comparación es mayor la cantidad de estudios en los que además de combinar estos dos biomateriales, de adiciona hueso bovino Nukbone (NKB)³⁰, Cobalto⁴⁰, Vidrio bioactivo a nanoescala (nVB) y quitosano (QS)⁴³, e incluso Plata (Ag)⁵¹. Esto podría significar que si bien la combinación de PCL y HA han demostrado

aumentar la proliferación celular, el uso de otros agentes puede potencializar estos efectos a nivel celular.

Así mismo, el uso de la nanoestructuración de la hidroxiapatita fue común en varios estudios^{32,44}, por lo cual podría discutirse el uso de esta técnica para mejorar algunas propiedades de los andamios, si bien es posible que empleando nanopartículas de hidroxiapatita y/o policaprolactona pueden mejorarse las fuerzas biomecánicas al existir un aumento en la densidad de las fibras, sería lógico entonces que esto resultara en un aumento de la proliferación celular. Esto puede explicarse porque a medida que aumenta el contenido de nHA, se activan más sitios de nucleación y se acelera la tasa de nucleación de apatita. De esta manera, el recubrimiento de nHA sobre matrices de andamio puede mejorar sus propiedades biomiméticas y aumentar la proliferación celular⁷¹. Estas propiedades de las nanofibras también podrían emplearse junto con agentes antimicrobianos o antiinflamatorios para prevenir infecciones, regeneración de defectos óseos en enfermedad periodontal⁷¹.

Conclusiones:

La evidencia científica recolectada en esta revisión permite concluir que la policaprolactona e hidroxiapatita son dos biomateriales que han demostrado mejorar y/o aumentar la proliferación y viabilidad celular incluso a nivel específico de los fibroblastos, incluyendo los gingivales; gracias a propiedades físicas, químicas y biológicas de estos junto con células mesenquimales del ligamento periodontal (fibroblastos), las cuales pueden ser muy útiles en la regeneración periodontal en pacientes que presentan o han presentado enfermedad periodontal como terapia de regeneración tisular guiada.

Mediante esta revisión se pudo determinar el ensayo de MTT como el principal para evaluar tanto la viabilidad como proliferación celular en PCL y HA, además de técnicas de microscopía como la electrónica de barrido, las cuales en conjunto permitieron observar el porcentaje de células vivas y muertas, así como el nivel de proliferación celular en los determinados tiempos de evaluación de los estudios aquí incluidos.

De acuerdo con lo anterior, esta revisión plantea que el incremento de la proliferación y viabilidad celular presentado en los estudios aquí incluidos se logró gracias a la integración entre los biomateriales (PCL y HA) con los fibroblastos del ligamento periodontal. Si bien no fue posible determinar exactamente alguna diferenciación entre fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales e incluso fibroblastos en general, puesto a que la información de la recolección de este grupo celular no fue claramente detallada, si fue posible reconocer que la concentración de estos biomateriales y su nanoestructuración pueden influir en mejores resultados a nivel in vitro.

Por esta razón, es posible concluir que son necesarios más estudios no solo a nivel invitro sino in vivo y ex vivo que permitan llevar estos resultados a la práctica clínica y utilizar estos biomateriales en la regeneración periodontal clínica; además de generar mayores aportes cuantitativos y unánimes en un mayor tiempo de estudio que no sólo se limite a horas o días, para conseguir resultados que puedan extrapolarse de manera más realista a la práctica clínica e incluso puedan ser replicados con mayor eficiencia.

Referencias

1. Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *TheScientificWorldJournal*, 2020, 2146160. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>
2. M. Sanz, "European workshop in periodontal health and cardiovascular disease," *European Heart Journal Supplements*, vol. 12, no. Suppl B, p. B2, 2010. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suq003>
3. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov 19;366(9499):1809-20. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8. PMID: 16298220. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16298220/>
4. ENSAB IV.
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Metodologia.pdf>
5. Liu, J., Ruan, J., Weir, M. D., Ren, K., Schneider, A., Wang, P., ... Xu, H. H. K. (2019). Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*, 8(6), 537. doi:10.3390/cells8060537. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31167434/>

6. Hernández-Monjaraz, B.; Santiago-Osorio, E.; Monroy-García, A.; Ledesma-Martínez, E.; Mendoza-Núñez, V.M. Mesenchymal stem cells of dental origin for inducing tissue regeneration in periodontitis: A mini-review. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 944 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5979585/>
7. Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Apr 19;(2):CD001724. doi: 10.1002/14651858.CD001724.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 May 29;5:CD001724. PMID: 16625546. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16625546/>
8. Liang Y, Luan X, Liu X. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioact Mater.* 2020 Feb 28;5(2):297-308. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.02.012. PMID: 32154444; PMCID: PMC7052441.
9. Microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) para liberación controlada de biomoléculas: Conceptos, aplicaciones y perspectivas en Estomatología. <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2013/od131c.pdf>
10. REVISTA MEXICANA DE FÍSICA"5 SUPLEMENTO 1,144-147 Hidroxiapatita y SUS aplicaciones Rommy Hernández T., Roberto Palma e, y ~la. Cristina Piña B. Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México Apartada P.O. Box 70.360. 04510 México. D.F. Mexico https://rmf.smf.mx/pdf/rmf-s/45/1/45_1_144.pdf

11. Sun W, Chu C, Wang J, Zhao H. Comparison of periodontal ligament cells responses to dense and nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 May;18(5):677-83. doi: 10.1007/s10856-006-0019-8. Epub 2006 Dec 2. PMID: 17143736.
12. Carranza FA Jr, Kenney EB, Lekovic V, Talamante E, Valencía J, Dimitrijevic B. Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxylapatite implants. *J Periodontol* 1987;58: 682–688.
13. Thanaphum Osathanon, Phunphimp Chanjavanakul, Pattanit Kongdech, Panipuk Clayhan and Nam Cong-Nhat Huynh. Polycaprolactone-Based Biomaterials for Guided Tissue Regeneration Membrane. Published: November 15th 2017. DOI: 10.5772/intechopen.69153
14. Sara Soheilifar, Iraj Amiri, [...], and Morad Hedayatpanah. Comparison of Periodontal Ligament Stem Cells Isolated from the Periodontium of Healthy Teeth and Periodontitis-Affected Teeth. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran* (2016; Vol.13, No. 4)
15. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1213-1221. doi: 10.2174/1389201017666160808160513. PMID: 27604355
16. Yang, N., Ray, S. D., & Krafts, K. (2014). Cell Proliferation. *Encyclopedia of Toxicology*, 761–765.
17. Martin Piedra M. Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería

Tisular [Tesis Doctoral]. Granada: Editorial de la Universidad de Granada, Universidad de Granada: 2014.

18. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Daniel Francisco Arencibia Arrebola 1*, Luis Alfredo Rosario Fernán https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Arencibia/publication/242644724_Principales_ensayos_para_determinar_la_citotoxicidad_de_una_sustancia_algunas_consideraciones_y_su_utilidad/links/0deec5385f44296f6b000000/Principales-ensayos-para-determinar-la-citotoxicidad-de-una-sustancia-algunas-consideraciones-y-su-utilidad.pdf

19. Propidium Iodide Cell Viability Flow Cytometry Protocol <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>

20. Zhao B, Chen J, Zhao L, Deng J, Li Q. A simvastatin-releasing scaffold with periodontal ligament stem cell sheets for periodontal regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2020 Jan-Dec;18:2280800019900094. doi: 10.1177/2280800019900094. PMID: 32931350.

21. Atyabi SM, Sharifi F, Irani S, Zandi M, Mivehchi H, Nagheh Z. Cell Attachment and Viability Study of PCL Nano-fiber Modified by Cold Atmospheric Plasma. *Cell Biochem Biophys*. 2016 Jun;74(2):181-90. doi: 10.1007/s12013-015-0718-1. PMID: 27286857.

22. Son SR, Linh NB, Yang HM, Lee BT. In vitro and in vivo evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration. *Sci Technol Adv Mater*. 2013 Mar

7;14(1):015009. doi: 10.1088/1468-6996/14/1/015009. PMID: 27877567; PMCID: PMC5090585.

23. Lam CX, Hutmacher DW, Schantz JT, Woodruff MA, Teoh SH. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Sep 1;90(3):906-19. doi: 10.1002/jbm.a.32052. PMID: 18646204.

24. Morand DN, Huck O, Keller L, Jessel N, Tenenbaum H, Davideau JL. Active Nanofibrous Membrane Effects on Gingival Cell Inflammatory Response. *Materials (Basel)*. 2015 Oct 27;8(10):7217-7229. doi: 10.3390/ma8105376. PMID: 28793632; PMCID: PMC5455376.

25. Batool F, Morand DN, Thomas L, Bugueno IM, Aragon J, Irusta S, Keller L, Benkirane-Jessel N, Tenenbaum H, Huck O. Synthesis of a Novel Electrospun Polycaprolactone Scaffold Functionalized with Ibuprofen for Periodontal Regeneration: An In Vitro and In Vivo Study. *Materials (Basel)*. 2018 Apr 10;11(4):580. doi: 10.3390/ma11040580. PMID: 29642582; PMCID: PMC5951464.

26. Safi IN, Al-Shammari AM, Ul-Jabbar MA, Hussein BMA. Preparing polycaprolactone scaffolds using electrospinning technique for construction of artificial periodontal ligament tissue. *J Taibah Univ Med Sci*. 2020 Aug 17;15(5):363-373. doi: 10.1016/j.jtumed.2020.07.007. PMID: 33132808; PMCID: PMC7565014.

27. Guo J, Wang Y, Cao C, Dziak R, Preston B, Guan G. Human periodontal ligament cells reaction on a novel hydroxyapatite-collagen scaffold. *Dent Traumatol*. 2013 Apr;29(2):103-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01152.x. Epub 2012 Jun 8. PMID: 22681634.

28. He H, Yu J, Cao J, E L, Wang D, Zhang H, Liu H. Biocompatibility and Osteogenic Capacity of Periodontal Ligament Stem Cells on nHAC/PLA and HA/TCP Scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(1-3):179-94. doi: 10.1163/092050609X12587018007767. PMID: 20557694.
29. Ge S, Zhao N, Wang L, Liu H, Yang P. Effects of hydroxyapatite nanostructure on channel surface of porcine acellular dermal matrix scaffold on cell viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:1887-95. doi: 10.2147/IJN.S44695. Epub 2013 May 10. PMID: 23690686; PMCID: PMC3656894.
30. Gómez-Lizárraga KK, Flores-Morales C, Del Prado-Audelo ML, Álvarez-Pérez MA, Piña-Barba MC, Escobedo C. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioploted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Oct 1;79:326-335. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.003. Epub 2017 May 4. PMID: 28629025.
31. Gurlek AC, Sevinc B, Bayrak E, Erisken C. Synthesis and characterization of polycaprolactone for anterior cruciate ligament regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Feb 1;71:820-826. doi: 10.1016/j.msec.2016.10.071. Epub 2016 Oct 29. PMID: 27987777.
32. Sattary M, Rafienia M, Khorasani MT, Salehi H. The effect of collector type on the physical, chemical, and biological properties of polycaprolactone/gelatin/nano-hydroxyapatite electrospun scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019 May;107(4):933-950. doi: 10.1002/jbm.b.34188. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30199600.

33. Alliot-Licht B, De Lange GL, Gregoire M. Effects of hydroxyapatite particles on periodontal ligament fibroblast-like cell behavior. *J Periodontol*. 1997 Feb;68(2):158-65. doi: 10.1902/jop.1997.68.2.158. PMID: 9058334.
34. Sun W, Chu C, Wang J, Zhao H. Comparison of periodontal ligament cells responses to dense and nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 May;18(5):677-83. doi: 10.1007/s10856-006-0019-8. Epub 2006 Dec 2. PMID: 17143736.
35. Yang, M., Gao, X., Shen, Z., Shi, X., & Lin, Z. Gelatin-assisted conglutination of aligned polycaprolactone nanofilms into a multilayered fibre-guiding scaffold for periodontal ligament regeneration. *RSC Advances*, 2019. 9(1), 507–518. doi:10.1039/c8ra09073d
36. Goh BT, Teh LY, Tan DB, Zhang Z, Teoh SH. Novel 3D polycaprolactone scaffold for ridge preservation--a pilot randomised controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Mar;26(3):271-7. doi: 10.1111/clr.12486. Epub 2014 Sep 27. PMID: 25263527.
37. Kaushal S, Kumar A, Khan MA, Lal N. Comparative study of nonabsorbable and absorbable barrier membranes in periodontal osseous defects by guided tissue regeneration. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016 May-Aug;6(2):111-7. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.001. Epub 2016 Jan 12. PMID: 27195208; PMCID: PMC4862101.
38. Lam, A., Reuveny, S., Li, J., Hui, J., Birch, W., & Oh, S. Human early mesenchymal stromal cells delivered on biodegradable polycaprolactone based microcarriers result in improved cartilage formation. *Cytherapy*, 2020. 22(5), S97.
39. Lee, S., Choi, D., Shim, JH. et al. Efficacy of three-dimensionally printed polycaprolactone/beta tricalcium phosphate scaffold on mandibular reconstruction. 2020. *Sci Rep* 10, 4979 . <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61944-w>.

40. Lin WC, Yao C, Huang TY, Cheng SJ, Tang CM. Long-term in vitro degradation behavior and biocompatibility of polycaprolactone/cobalt-substituted hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Dent Mater.* 2019 May;35(5):751-762. doi: 10.1016/j.dental.2019.02.023. Epub 2019 Mar 8. PMID: 30857736.
41. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, Mehrotra D. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Jan-Mar;10(1):381-388. doi: 10.1016/j.jobcr.2019.10.003. Epub 2019 Nov 5. PMID: 31754598; PMCID: PMC6854079.
42. Afifi M, Ahmed MK, Fathi AM, Uskoković V. Physical, electrochemical and biological evaluations of spin-coated ϵ -polycaprolactone thin films containing alumina/graphene/carbonated hydroxyapatite/titania for tissue engineering applications. *Int J Pharm.* 2020 Jul 30;585:119502. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119502. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32505577.
43. Shalumon KT, Sowmya S, Sathish D, Chennazhi KP, Nair SV, Jayakumar R. Effect of incorporation of nanoscale bioactive glass and hydroxyapatite in PCL/chitosan nanofibers for bone and periodontal tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol.* 2013 Mar;9(3):430-40. doi: 10.1166/jbn.2013.1559. PMID: 23620999.
44. Remya KR, Joseph J, Mani S, John A, Varma HK, Ramesh P. Nanohydroxyapatite incorporated electrospun polycaprolactone/polycaprolactone-polyethyleneglycol-polycaprolactone blend scaffold for bone tissue engineering applications. *J Biomed Nanotechnol.* 2013 Sep;9(9):1483-94. doi: 10.1166/jbn.2013.1640. PMID: 23980497.

45. Uskoković V, Desai TA. Does translational symmetry matter on the micro scale? Fibroblastic and osteoblastic interactions with the topographically distinct poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite thin films. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Aug 13;6(15):13209-20. doi: 10.1021/am503043t. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25014232; PMCID: PMC4134142.
46. Kim JH, Linh NT, Min YK, Lee BT. Surface modification of porous polycaprolactone/biphasic calcium phosphate scaffolds for bone regeneration in rat calvaria defect. *J Biomater Appl*. 2014 Oct;29(4):624-35. doi: 10.1177/0885328214539822. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24939961.
47. Thadavirul N, Pavasant P, Supaphol P. Improvement of dual-leached polycaprolactone porous scaffolds by incorporating with hydroxyapatite for bone tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014;25(17):1986-2008. doi: 10.1080/09205063.2014.966800. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25291106.
48. Keivani F, Shokrollahi P, Zandi M, Irani S, F Shokrolahi, Khorasani SC. Engineered electrospun poly(caprolactone)/polycaprolactone-g-hydroxyapatite nano-fibrous scaffold promotes human fibroblasts adhesion and proliferation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Nov 1;68:78-88. doi: 10.1016/j.msec.2016.05.098. Epub 2016 May 24. PMID: 27523999.
49. Chuenjitkuntaworn B, Osathanon T, Nowwarote N, Supaphol P, Pavasant P. The efficacy of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Jan;104(1):264-71. doi: 10.1002/jbm.a.35558. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26362586.

50. Moeini, S., Mohammadi, M. R., & Simchi, A. In-situ solvothermal processing of polycaprolactone/hydroxyapatite nanocomposites with enhanced mechanical and biological performance for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 2017. 2(3), 146–155. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.04.004
51. Hassan, A. A., Radwan, H. A., Abdelaal, S. A., Al-Radadi, N. S., Ahmed, M. K., Shoueir, K., & Abdel Hady, M. (2020). Polycaprolactone based electrospun matrices loaded with Ag/hydroxyapatite as wound dressings: Morphology, cell adhesion and antibacterial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120143
52. Soltani Dehnavi, S., Mehdikhani, M., Rafienia, M., & Bonakdar, S. Preparation and in vitro evaluation of polycaprolactone/PEG/bioactive glass nanopowders nanocomposite membranes for GTR/GBR applications. *Materials Science and Engineering*. 2018. C, 90, 236–247. doi:10.1016/j.msec.2018.04.065
53. Jauregui C, Yoganarasimha S, Madurantakam P. Mesenchymal Stem Cells Derived from Healthy and Diseased Human Gingiva Support Osteogenesis on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. *Bioengineering (Basel)*. 2018 Jan 23;5(1):8. doi: 10.3390/bioengineering5010008. PMID: 29360752; PMCID: PMC5874874.
54. Ji J, Tong X, Huang X, Wang T, Lin Z, Cao Y, Zhang J, Dong L, Qin H, Hu Q. Sphere-shaped nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin 3D porous scaffolds increase proliferation and osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts. *Biomed Mater*. 2015 Jul 8;10(4):045005. doi: 10.1088/1748-6041/10/4/045005. PMID: 26154827.

55. Kamadjaja MJK, Abraham JF, Laksono H. Biocompatibility of *Portunus Pelagicus* Hydroxyapatite Graft on Human Gingival Fibroblast Cell Culture. *Med Arch*. 2019 Oct;73(5):303-306. doi: 10.5455/medarh.2019.73.303-306. PMID: 31819301; PMCID: PMC6885209.
56. Ruano R, Jaeger RG, Jaeger MM. Effect of a ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2000 Apr;71(4):540-5. doi: 10.1902/jop.2000.71.4.540. PMID: 10807115.
57. Chung TW, Wang SS, Wang YZ, Hsieh CH, Fu E. Enhancing growth and proliferation of human gingival fibroblasts on chitosan grafted poly (epsilon-caprolactone) films is influenced by nano-roughness chitosan surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Jan;20(1):397-404. doi: 10.1007/s10856-008-3586-z. Epub 2008 Sep 25. PMID: 18815730.
58. Al-Ahmady HH, Abd Elazeem AF, Bellah Ahmed NE, Shawkat WM, Elmasry M, Abdelrahman MA, Abderazik MA. Combining autologous bone marrow mononuclear cells seeded on collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin: Reporting a novel strategy for alveolar cleft bone regeneration. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018 Sep;46(9):1593-1600. doi: 10.1016/j.jcms.2018.05.049. Epub 2018 Jun 2. PMID: 30196860.
59. Dias, A. M., da Silva, F. G., Monteiro, A. P. de F., Pinzón-García, A. D., Sinisterra, R. D., & Cortés, M. E. Polycaprolactone nanofibers loaded oxytetracycline hydrochloride and zinc oxide for treatment of periodontal disease. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109798. 2019. doi:10.1016/j.msec.2019.109798

60. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling. *Frontiers in physiology*. 2019 Apr 24;10:270. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6491628/>
61. Chiquet M, Katsaros C, Kleetsas D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontology 2000*. 2015 Jun;68(1):21-40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867977/>
62. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [Internet]. 2016 Jul 1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
63. Hadeer M. Abdelaziz, May S. Freag, Ahmed O. Elzoghby, Chapter 5 - Solid Lipid Nanoparticle-Based Drug Delivery for Lung Cancer, Prashant Kesharwani, Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer, Academic Press, 2019, Pages 95-121, ISBN 9780128157206, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815720-6.00005-8>.
64. 45: Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. 2018. doi:10.5772/intechopen.71923
65. Wst-1 : Aslantürk ÖS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *InTech*; 2018 Jul 11.
66. Alamar blue: O'Brien J, Pognan F. Investigation of the Alamar blue (Resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *InToxicology* 2001 Jul 8 (Vol. 164, No. 1-3, pp. 132-132). Customer Relations Manager, Bay 15, Shannon Industrial Estate Co, Clare, Ireland: Elsevier Sci Ireland Ltd.

67. Azul tripan: Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Appendix 3B in: Current Protocols in Immunology. JE Coligan, BE Bierer, DH Margulies, EM Shevach, and W. Strober, eds

68. Cai L, Qin X, Xu Z, Song Y, Jiang H, Wu Y, Ruan H, Chen J. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method. ACS omega. 2019 Jul 11;4(7):12036-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682106/>

69. Asthana A, Kisaalita WS. Is time an extra dimension in 3D cell culture?. Drug discovery today. 2016 Mar 1;21(3):395-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26482739/>

70. Gómez AA. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. Universitas Odontológica. 2006;25(57):26-33. <https://www.redalyc.org/pdf/2312/231220955005.pdf>

71. Lowe, B., Hardy, J. G., & Walsh, L. J. (2019). Optimizing nanohydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. ACS omega, 5(1), 1-9.

