



Potencial de proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta a base de celulosa nanofibrilar

Héctor Fabio Tejedor Manjarrez, 13272013738;

Andrés Horacio Muñoz Rodríguez, 13272013945;

Ayda Rivera Alfonso, 13272017623;

Karen Andrea Jiménez Romero, 12271928200.

Universidad Antonio Nariño

Especialización en Periodoncia

Facultad de Odontología

Bogotá D.C., Colombia

2022

Potencial de proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta a base de celulosa nanofibrilar

Héctor Fabio Tejedor Manjarrez;

Andrés Horacio Muñoz Rodríguez;

Ayda Rivera Alfonso;

Karen Andrea Jiménez Romero.

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Especialista en periodoncia

Director (a):

PhD Biomedicina-Ingeniería Tisular, Camilo Andrés Alfonso Rodríguez

Codirector (a):

Dr. Hernán Santiago Garzón; Dra. Zulma Moreno

Línea de Investigación:

Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa

Grupo de Investigación:

Salud Oral

Universidad Antonio Nariño

Especialización en Periodoncia

Facultad de Odontología

Bogotá D.C., Colombia

2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado potencial de proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta a base de celulosa nanofibrilar.

Elaborado por: Héctor Tejedor, Andrés Muñoz,

Ayda Rivera y Karen Jiménez.

El cual cumple con los requisitos para optar al título de especialista en periodoncia.

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

Tabla de contenido

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
<u>1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</u>	21
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. OBJETIVOS	24
<u>3.1. GENERAL</u>	24
<u>3.2. ESPECÍFICOS</u>	24
4. MARCO TEÓRICO	25
<u>4.1. RECESIONES GINGIVALES</u>	25
<u>4.1.1. Definición</u>	25
<u>4.1.2. Prevalencia</u>	26
<u>4.1.3. Factores asociados</u>	27
4.1.3.1. Factores predisponentes	28
<u>4.1.3.2. Factores precipitantes</u>	29
<u>4.1.3.3. Otras condiciones modificables</u>	30
<u>4.1.4. Clasificación</u>	30
4.1.4.1. Clasificación de Miller	31
4.1.4.2. Clasificación Cairo	32
4.1.4.3. Clasificación Pini-Prato	33
<u>4.1.5. Tratamiento</u>	36
<u>4.1.5.1. Tratamiento no quirúrgico</u>	36
<u>4.1.5.2. Tratamiento quirúrgico</u>	37
<u>4.1.5.2.1. Indicaciones</u>	37
<u>4.1.5.2.2. Tratamiento restaurador -quirúrgico</u>	38
<u>4.1.5.2.3. Colgajo desplazado coronalmente</u>	41

4.1.5.2.4.	<u>Colgajo reposicionado lateralmente</u>	42
4.1.5.2.5.	<u>Técnica de túnel</u>	45
4.1.5.2.6.	<u>Técnica VISTA</u>	47
4.1.5.2.7.	<u>Injertos blandos</u>	49
4.1.5.2.7.1.	<u>Injerto gingival libre</u>	49
4.1.5.2.7.2.	<u>Injerto de tejido conectivo</u>	51
4.2.	<u>MUCOSA ORAL NORMAL</u>	53
4.2.1.	<u>Características</u>	53
4.2.2.	<u>Estructura</u>	54
4.3.	<u>MUCOSAS ORALES ARTIFICIALES</u>	55
4.3.1.	<u>Tipos de células utilizadas</u>	57
4.3.1.1.	<u>Queratinocitos</u> 57	
4.3.1.2.	<u>Fibroblastos</u> 57	
4.3.1.3.	<u>Células madre mesenquimales del cordón umbilical</u> 57	
4.3.1.4.	<u>Células madre de la papila apical</u> 58	
4.3.2.	<u>Historia de la mucosa oral artificial</u>	59
4.4.	<u>BIOIMPRESIÓN 3D</u>	61
4.4.1.	<u>Biotintas o bioink</u>	62
4.4.2.	<u>Bioenlaces o biomateriales</u>	64
4.4.3.	<u>Bio-enlaces de apoyo</u>	64
4.4.3.1.	<u>Bio-enlaces fugitivos</u> 65	
4.4.3.2.	<u>Bio-enlaces estructurales</u> 65	
4.4.3.3.	<u>Bio-enlaces funcionales</u> 65	
4.4.3.4.	<u>Bio-enlaces a base de hidrogel</u> 66	
4.4.3.5.	<u>Bioenlaces a base de proteínas</u> 66	
4.4.3.6.	<u>Polisacáridos</u> 67	
4.4.3.7.	<u>Bioenlaces basados en dECM68</u>	
4.4.3.8.	<u>Bioenlaces de polímero sintético</u> 68	

4.4.3.9.	<u>Bioenlaces de biopolímero</u>	69
4.4.3.9.1.	<u>Biotinta nanocelulosa</u>	70
4.4.4.	<u>Métodos de bio-impresión</u>	71
4.4.4.1.	<u>Biopresión 3D de inyección de tinta</u>	72
4.4.4.2.	<u>Bioimpresión 3D por μ-extrusión</u>	72
4.4.4.3.	<u>Bioimpresión asistida por láser</u>	74
5.	<u>METODOLOGÍA</u>	75
5.1.	<u>OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES</u>	75
5.2.	<u>TIPO DE ESTUDIO: EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i></u>	76
5.3.	<u>OBTENCIÓN DE CÉLULAS</u>	76
5.3.1.	<u>Obtención de células de Papila Apical Humana</u>	76
5.3.2.	<u>Procedimiento cultivo celular de células madre de la papila apical</u>	79
5.3.3.	<u>Generación de scaffold mediante bioimpresión</u>	81
5.3.4.	<u>Ensayos de laboratorio</u>	83
5.3.4.1.	<u>Análisis histológico hematoxilina-eosina</u>	83
5.3.4.2.	<u>Técnica WST1</u>	83
5.3.4.3.	<u>Ensayo de viabilidad celular Live/Dead</u>	84
5.3.4.4.	<u>PCNA</u>	85
5.3.5.	<u>Análisis de los datos:</u>	86
5.4.	<u>ASPECTOS ÉTICOS</u>	86
6.	<u>RESULTADOS</u>	88
6.1.	<u>CARACTERIZACIÓN CELULAR</u>	88
6.2.	<u>ANÁLISIS CUALITATIVO</u>	89
6.3.	<u>VIABILIDAD CELULAR</u>	90
6.4.	<u>PROLIFERACIÓN CELULAR</u>	93
7.	<u>DISCUSIÓN</u>	97

8.	<u>CONCLUSIONES</u>	102
9.	<u>RECOMENDACIONES</u>	103
10.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	104

Listado de tablas

<i>Tabla 1. Operacionalización de variables</i>	75
<i>Tabla 2 Prueba de viabilidad de células madre de la papila apical</i>	92
<i>Tabla 3 Porcentaje de proliferación de los cultivos celulares para día 1, 7 y 14</i>	93
<i>Tabla 4. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk</i>	95
<i>Tabla 5 Valores para la prueba Post Hoc de Nemenyi</i>	96

Lista de figuras

<i>Figura 1. Recesión Miller Tipo I.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 2. Recesión Miller Tipo II.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 3. Recesión Miller Tipo III.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 4. Recesión Pini-Prato A (-).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5. Recesión Pini-Prato A (+).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 6. Recesión Pini-Prato B (-).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 7. Recesión Pini-Prato B (+).....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8. Mucosa oral normal.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 9. Distinción entre un bioenlace y biotinta.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 10. Representación esquemática de las principales tecnologías de bioimpresión 3D.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 11. Esquema de tecnologías basadas en inyección de tinta.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 12. Sistema de bio-impresión basadas en extrusión.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 13 Radiografía panorámica.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 14 Molar post-exodoncia con muestra de la papila apical.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 15 Trozos de papila apical.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 16 Cultivo de células madre de la papila apical.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 17 Bioimpresión de celulosa fibrilar con células de la papila apical.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 18 Esquema del ciclo celular.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 19 Caracterización de células madre de la papila apical.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 20 Ensayos cualitativos de células madre de la papila apical en celulosa nanofibrilar bioimpresa.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 21 Ensayo Live- Dead en células madre de la papila apical.....</i>	<i>95</i>

Lista de gráficos

<i>Grafico 1 Gráfico de viabilidad celular con la técnica Live-Dead</i>	<i>97</i>
<i>Grafico 2 Porcentaje de proliferación celular a los días 1, 7 y 14</i>	<i>98</i>
<i>Grafico 3 Diagrama de Box Plot.....</i>	<i>99</i>

Agradecimientos

A la Universidad Antonio Nariño por brindarnos la oportunidad de formarnos como especialistas y por suminístranos las instalaciones para cumplir con el objetivo de la tesis de grado.

Al Doctor Camilo Alfonso, nuestro director de tesis, que aportó sus conocimientos, su tiempo, dedicación y su persistencia, dirigiéndonos con éxito en este proyecto.

Al Doctor Santiago Garzón, nuestro codirector de tesis por aportar sus conocimientos, tiempo y profesionalismo en el desarrollo de esta tesis.

A la Doctora Zulma Moreno, por aportar su ayuda, conocimientos, tiempo y apoyo que hicieron posible este proyecto.

Por último, a todos los que hicieron parte en la elaboración del trabajo y nos transmitieron todos sus conocimientos y dedicación, para lograr la culminación de esta tesis de grado con éxito, cumpliendo su objetivo planteado.

Resumen

Objetivo: Evaluar el potencial de proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta de celulosa nanofibrilar.

Materiales y métodos: Estudio *In vitro*. Se obtuvieron células madre de papila apical de un paciente que dio su consentimiento informado, se realizó cultivo celular hasta el cuarto pase, se mezclaron con celulosa nanofibrilar de la casa comercial CELLINK Skin y se imprimieron 4 grupos con 3 constructos de 1x1 en una bioimpresora CELLINK Bio X. Se definieron los días 1, 7 y 14. Se realizó caracterización celular, ensayos cualitativos de Hematoxilina & Eosina, PCNA y DAPI, se realizaron pruebas de viabilidad y proliferación celular mediante Live-Dead y WST-1.

Resultados: Se pudo determinar que la viabilidad celular mediante la prueba Live-Dead, en el día 1 fue del 90.58%, en el día 7 fue de 97.91% y en el día 14 fue 82.16%, por otro lado la proliferación se evaluó mediante WST1, en donde el pico de proliferación se presentó en el día 7 con un 44.64%, el día 1 con un 29.62% y por último el día 14 con un 25.75%, finalmente en la tinción de hematoxilina & eosina se logra determinar la formación de cuerpo celulares distribuidos en la membrana de celulosa nanofibrilar, que mediante la caracterización celular corresponde a células madre de la papila apical.

Discusión: La creación de andamios tridimensionales se ha venido evaluando durante la última década en el campo de la proliferación celular. Seo et. al., 2020 midió la proliferación de fibroblastos en un scaffold de metacrilato de gelatina, donde observo proliferación por medio de WST-1 en el día 1 de 164,98 % y en el día 3 de 554,41 %. Beketov (2021), en donde uso biotinta a base de 4% de colágeno y condrocitos donde

determinaron presencia activa por medio de PCNA. Im et. al., 2022 evaluó viabilidad por medio del análisis Live-Dead donde se encontró en un >80% para las muestras el día 1 y el día 7, al igual que Zhang (2013) quien colocó mioblastos sobre gelatina/alginato con una viabilidad del 54.72% a las 2 horas después de la impresión.

Conclusión: En este estudio se pudo concluir que las células madre de la papila apical presentan alto potencial de proliferación después de mezcladas con la biotinta de celulosa nanofibrilar que solo disminuye hasta el día 14, lo que demuestra que la biotinta de nanocelulosa fibrilar no genera un ambiente citotóxico permitiendo la actividad y viabilidad celular, que tampoco se vio afectada por el proceso de bioimpresión.

Palabras claves: células madre de la papila apical, celulosa nanofibrilar, proliferación, viabilidad.

Summary

Objective: Evaluate the proliferation potential of apical papilla stem cells in a nanofibrillar cellulose bioink.

Materials and methods: In vitro study. The stem cells were obtained from a patient's apical papilla, who provided express consent. The cell culture was completed up to fourth passage, they were mixed with nanofibrillar cellulose from CELLINK Skin commercial enterprise and 4 groups with 3 1x1 constructs in a CELLINK Bio X Bioprinter. The days 1, 7 and 14 have been defined. Cellular characterization, Hematoxylin & eosin, PCNA and DAPI qualitative tests were conducted. Viability and cellular proliferation test were completed through Live-Dead and WSTI.

Results: Upon analysing the results we determined that cellular viability by means of Live-Dead test in day 1 it was 90.58%, in day 7 it was 97.91% and in day 14 it was 82.16%. On the other hand, the proliferation was evaluated through WSTI, where the proliferation peak was presented in day 7 with a 44.64%, in day 1 with 29.62% and in day 14 with 25.75%.

Last, on the Hematoxylin and eosin stain, we can determine the cell bodies moulding, distributed in the nanofibrillar cellulose membrane, which belongs to apical papilla stem cells through the cellular characterization.

Discussion: The creation of three-dimensional scaffolding has been evaluated in the last decade in the cellular proliferation field. Seo et. Al., 2020 measured the fibroblasts proliferation in a gelatin methacrylate scaffold, where proliferation was observed through WST-1 in the day 1, 164.98% and in day 3, 554, 41%. Beketov (2021) where collagen and chondrocytes based bioink was used, and where they determined active presence through the PCNA. Im et. al., 2022 evaluated the viability through the Live-Dead analysis where >80%

was found in samples for day 1 and day 7. Also Zhang (2013), who placed myoblasts over gelatine/alginate with a viability of 54.72%, two hours after printing.

Conclusion: After completing this study we were able to conclude that apical papilla stem cells represent a high proliferation potential after they have been mixed with nanofibrillar cellulose bioink, which decreases only until day 14, which shows that nanofibrillar cellulose bioink does not generate a cytotoxic environment, allowing the activity and cellular viability, which has not been affected by the bioprinting process.

Keywords: *apical papilla stem cells, nanofibrillar cellulose, proliferation, viability.*

1. Planteamiento del Problema

El injerto de tejido blando se ha utilizado cada vez más en la práctica clínica para aumentar el grosor del tejido, corregir las deformidades mucogingivales, mejorar la estética alrededor de dientes e implantes dentales y actualmente en el tratamiento de la hipersensibilidad dental, sin embargo la obtención del injerto de tejido blando autólogo presenta complicaciones como la morbilidad del paciente, hemorragias en el sitio donante, disfunción sensorial palatina, infección y/o aumento del tiempo quirúrgico, tamaño, forma y grosor no homogéneos. Con el fin de evitar estas complicaciones y reemplazar el injerto de tejido blando autógeno se ha dado paso a otras alternativas en cirugía plástica periodontal (Zucchelli, 2020; de Resende, 2019).

Dentro de estas alternativas se encuentra la matriz dérmica acelular, que muestra mejores resultados estéticos que el injerto gingival libre autólogo. El primero con un porcentaje de contracción del 49%, frente al 76% generado en la matriz dérmica (De Resende et al., 2019). Mientras tanto la matriz de colágeno xenogénica es capaz de lograr características histológicas y funcionales que han conducido a un aumento en el ancho y espesor del tejido queratinizado, requiriendo un tiempo en el procedimiento más corto y disminuyendo los tiempos de cicatrización en 1.8 días aproximadamente. Sin embargo, no logra suficiente estabilidad a largo plazo (Tonetti et al., 2018), lo que a su vez ha dado la oportunidad a nuevas tecnologías, como la bioimpresión.

Esta última ha surgido como una tecnología emergente con varias aplicaciones, en cuanto a la fabricación de tejidos funcionales con arquitectura jerárquica, nace como un nuevo método, superando las dificultades de la lixiviación de partículas, liofilización, electrohilado y

microingeniería en donde se observa una reproducibilidad y versatilidad limitadas en los procedimientos de fabricación (Gungor-Ozkerim et al., 2018), mientras que la bioimpresión 3D permite un control mejorado de la arquitectura del tejido fabricado gracias al proceso automatizado y preprogramado que se lleva a cabo y que por medio de biomateriales y/o células vivas, denominadas también biotintas, que permiten la sincronización y el monitoreo (Gungor-Ozkerim et al., 2018).

Dentro de esta bioimpresión 3D se han implementado diferentes modalidades, entre las que se encuentran bioimpresión asistida por láser (LaBP), bioimpresión por inyección de tinta / bioimpresión de gotitas, bioimpresión basada en extrusión y el sistema de deposición de múltiples cabezales (SDMC), que a su vez permite la impresión simultánea o posterior de múltiples materiales (Gungor-Ozkerim, 2018). Es así como la ingeniería tisular cumple con el objetivo de generar un tejido equivalente, capaz de reproducir tanto biológicamente como histológicamente las propiedades funcionales al tejido humano (Sánchez-Quevedo et al., 2015).

Otra de las funciones que un tejido de mucosa oral bio impresa debe cumplir, es lograr la estratificación, esta estratificación cumple la función de proteger y recubrir superficies que se encuentran en contacto directo con el exterior o con sustancias irritantes (Li, et al., 2016). En el desarrollo embrionario, los queratinocitos juegan un papel importante en la diferenciación epidérmica, específicamente en el día embrionario 8 donde salen de la capa basal y se dividen simétricamente con una orientación paralela a la membrana basal, luego en el día 12 se dividen asimétricamente perpendicular a la membrana basal hasta llegar al día 13 y 17 en donde inicia el proceso de estratificación (Xie & Zhou, 2017). De esta manera, se forma una arquitectura tisular adecuada, gracias a la división celular, que forma un tejido con

la superficie y el grosor adecuado. En la ingeniería tisular, se ha buscado la utilización de matrices que puedan cumplir con esta característica.

Dentro de esas matrices que se han empleado en la construcción de mucosas se encuentran la fibrina-agarosa, con una adecuada biocompatibilidad *in vivo* en modelos animales (Blanco-Elices et al., 2020), además presentan capacidad de infiltración fibroblástica y estabilidad morfológica (Viñuela-Prieto et al., 2015). Por otro lado, la matriz de colágeno-elastina presenta una notable biocompatibilidad con queratinocitos y fibroblastos (Golinski, 2011), estos últimos que a su vez permiten un acercamiento y crecimiento de queratinocitos, ya que son células difíciles de manipular en cultivo, proliferan lentamente y tienden a desdiferenciarse en el cultivo (Martin-Piedra et al., 2019), de allí la necesidad de considerar otras alternativas.

Entre estas alternativas, se encuentran las células madre de la papila apical resultando de fácil obtención, por encontrarse en dientes exfoliados o dientes permanentes inmaduros, lo que a su vez permite una flexibilidad activa de 48 horas posterior a la extracción de las células (Victor & Reiter, 2017). Además de su alto potencial de diferenciación ya que pueden diferenciarse a células osteogénicas, odontogénicas, neurogénicas, adipogénicas, condrogénicas y hematológicas, es así como estas células también cuentan con capacidad de autorregulación y baja inmunogenicidad (Victor et al. 2017; Casagrande et al. 2011; Kang et al. 2019).

Dada la necesidad de procedimientos en cirugía mucogingival, ya sea cubrimiento radicular o un mejoramiento de fenotipo periodontal, los cuales se realizan con injertos autólogos o sustitutos de este, como el mucoderm o el aloderm, se plantea la posibilidad gracias a la bioingeniería de tejidos de crear una mucosa oral artificial utilizando células

madres de la papila apical y la tecnica de bioimpresion 3D, con el fin de tener una alternativa, que nos ayude con los limitantes que presentan el autoinjerto y los sutitutos de tejido conectivo, como son la doble morbilidad y el cantidad limitada en el caso del autoinjerto y los altos costos que dificultan su adquisisci3n.

Por otro lado, la bioimpresion nos ofrecería ventajas, debido a que nos reduciría el tiempo en la fabricaci3n de sustitutos de tejido blando y nos permitiría tener mayor control con respecto al tamaño y la formaci3n de las capas del epitelio.

Por lo tanto, antes de pensar en la formaci3n de esta mucosa oral artificial creada por bioimpresión con células madres de la papila apical, debemos determinar si la biotinta que es utilizada para ese procedimiento nos brinda un ambiente adecuado para que las celulas puedan proliferar y diferenciarse, ya que de aqui depende que se pueda inicar el proceso de la formaci3n de la mucosa. En la literatura se reporta la creacion de una mucosa oral artificial de manera manual, utilizando celulas como los queratinocitos, concluyendo que son dificiles de cultivar y que requieren de mas tiempo para la proliferacion (Martin-Piedra et. al., 2019).

Con respecto a la proliferacion de esta células en la biotinta, la literatura es muy limitada, debido a que no se habia planteado la utilizacion de celulas de la papila apical para este procedimiento en una biotinta de nanocelulosa.

1.1. Pregunta de investigación

¿Cuál es el potencial de proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta a base de celulosa nanofibrilar?

2. Justificación

Este trabajo de investigación pertenece a la línea de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa, del grupo de investigación en Salud Oral de la facultad de odontología de la Universidad Antonio Nariño. Esta línea tiene como objetivo investigar en el desarrollo de sustitutos artificiales de órganos y tejidos para una posible aplicación clínica.

El uso de mucosas orales artificiales ha sido un tema relevante en estos últimos años, ya que los injertos autólogos presentan una problemática al ser limitados en tamaño; además, para el paciente se presenta una recuperación larga y dolorosa del sitio donde se extrae dicho injerto, que en la mayoría de los casos es el paladar. Sumado a estos inconvenientes, se encuentran los riesgos intraoperatorios a los que se enfrenta el profesional al retirar el tejido como lo son las hemorragias, que dificultan el proceso de la extracción del injerto y extienden el tiempo del mismo, por lo cual se han ideado propuestas de mucosas artificiales con diferentes tipos de biomateriales que puedan reemplazar el uso de estos injertos autólogos (Zucchelli et al., 2020; Zuchelli & Travelli, 2019; Reiser et al., 1996).

Así mismo, surge la idea de adherir células madre de la papila apical por su fácil obtención, cultivo y potencial de diferenciación. De manera similar, se han llevado a cabo estudios de este tipo usando inicialmente queratinocitos y fibroblastos que aunque presentaron resultados satisfactorios al evaluar la estatificación, presentan complicaciones y dificultades a la hora de llevar a cabo el cultivo. Con el uso de células madre de la papila apical y con los diferentes parámetros encontrados en varios estudios, se espera obtener proliferación celular, gracias a la capacidad y potencial que podemos observar en esta célula madre que podrá ser evaluada mediante diferentes técnicas como WST1, Hematoxilina & Eosina y Live-Dead (Sear et. al., 2016).

Además, se plantea la creación de la mucosa por medio de una impresora 3D, la cual nos dará mayor efectividad, exactitud y así mismo mejores resultados a la hora de adicionar las células madre de la papila apical. Debe aclararse que lo que se busca con esta etapa 1 del proyecto es observar la proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta a base de celulosa nanofibrilar, para dar paso a posteriores estudios que puedan evaluar la estratificación de estas células.

Además, una ventaja que ofrece la bioimpresión es ser más exacta al momento de crear la mucosa oral, esta no permitiría tener una cantidad ilimitada de tejido, que podría ser utilizado para los procedimientos de cirugía mucogingival, además de ofrecernos características similares a la que nos ofrece un injerto autólogo, con una ventaja sobre el costo siendo más asequible para el paciente.

3. Objetivos

3.1. General

Evaluar el potencial de proliferación de las células madre de la papila apical en una biotinta de celulosa nanofibrilar.

3.2. Específicos

- Analizar cualitativamente las células madre de la papila apical mediante Hematoxilina & Eosina y PCNA en una biotinta de celulosa nanofibrilar.
- Cuantificar la viabilidad de las células madre de la papila apical mediante la técnica en una biotinta de celulosa nanofibrilar.
- Evaluar la proliferación de las células madre de la papila apical a través de la técnica WST-1 en una biotinta de celulosa nanofibrilar.

4. Marco Teórico

4.1. Recesiones gingivales

Desde hace años, tanto investigadores como odontólogos han desarrollado una serie de técnicas y materiales encaminadas a resolver los problemas que pueden hallarse en cavidad oral relacionados con los tejidos blandos mucogingivales, todas estas se han agrupado en la cirugía mucogingival que son procedimientos quirúrgicos que tienen como objetivo corregir los defectos morfológicos y estructurales de tejidos blandos y duros, que puedan llegar a presentarse alrededor de dientes e implantes. Entre estas técnicas se han agrupado alargamientos de corona clínica, la eliminación de frenillos aberrantes, cobertura radicular y aumento de tejido queratinizado (Cairo, 2017).

Una de las principales alteraciones que requieren este tipo de cirugía son las recesiones gingivales, ya que suelen afectar tanto estéticamente como a nivel de sensibilidad, por lo que ha surgido la necesidad de tratar estos defectos y con ello la evolución de diferentes técnicas y materiales capaces de reemplazar el tejido perdido; varios autores han indagado sus factores predisponentes y desencadenantes, se han propuesto diferentes parámetros y tipos de clasificaciones, todo con el objetivo de unificar conceptos, tratamientos, su predictibilidad y estabilidad a largo tiempo (Cairo et al., 2011).

4.1.1. Definición

Según Cairo (2017), la recesión gingival se define como la “exposición de la superficie radicular causada por el desplazamiento apical del margen gingival más allá de la unión cemento-esmalte”.

Esta definición ha dado paso a una serie de investigaciones que han resultado en la prevalencia, los posibles factores asociados y una serie de clasificaciones, teniendo en cuenta los parámetros encontrados en la práctica clínica.

4.1.2. Prevalencia

Algunos de los estudios longitudinales que se realizaron para evaluar la prevalencia de esta lesión, se realizaron con la población en Noruega, Oslo, desde 1969 hasta 1988 y en Sri Lanka entre 1970 y 1990. En Oslo se seleccionaron 565 estudiantes de sexo masculino que cursaran estudios de secundaria, universitarios y profesores, todos entre 15 y 30 años o más. Mientras que el grupo de Sri Lanka estaba conformado por 480 trabajadores que cultivaban el té, que estaban en el rango de edad entre 15 y 30 años o más y desconocieron el cepillado dental o atención odontológica (Löe et al., 1992; Cairo, 2017).

Posterior a las valoraciones que se realizaron durante todo el estudio se encontró que, de los sujetos evaluados en Oslo, el 63% de entre 20 a 21 años, ya presentaban recesión gingival, generalmente en molares y premolares con recesiones no mayores a 3 mm. Cuando se hizo la evaluación de la población entre 30 y 31 años se encontró que el 75% de estos presentaban en 4 superficies dentales recesiones en su mayoría de 1-2mm sin llegar a interproximal. De los sujetos que estaban en el rango de 46 a 50 años, se logró observar que más del 90% tenían recesiones, en un 26% vestibulares y entre 3 y 4% en interproximal y aproximadamente un 4% no superan 5 mm en vestibular y 3mm en interproximal (Cairo et al., 2017)

El estudio que se realizó en Sri Lanka, arrojó un porcentaje de recesiones del 29% que corresponde al grupo de edad de 18 y 19 años, con recesiones no mayores a 4 mm. Un porcentaje mayor de 90% se encontró en los sujetos de 30 años con recesiones entre el 3 y 9 mm que corresponden al 4% de los mismos, que a su vez involucran recesiones interproximales entre 1 y 5 mm. Cuando la edad superó la cuarta década, el 100% de los trabajadores ya presentaban recesiones en al menos una o dos superficies que incluían mesial y distal y un 32% en lingual (Löe et al., 1992).

A los 50 años la prevalencia de las lesiones linguales se elevó a un 50% comparada con un 70% en las superficies vestibulares de los dientes evaluados a esta edad. A su vez el 100% de estas recesiones se presentaron en molares superiores y 80% en incisivos inferiores, de los cuales la mitad estaban entre 3 y 9 mm o más, estas comparadas con 1,4 mm que se pudieron observar en el grupo de 40 años en zonas vestibulares (Löe et al., 1992; Cairo, 2017).

Este estudio a pesar de arrojar importantes datos de la presencia de recesiones a lo largo de los años de los sujetos, da mínimas guías de las posibles causas y factores asociados a las recesiones gingivales, al igual que las formas de estas recesiones, por lo que se hace importante a si mismo analizar estos factores que se mantienen a lo largo de la vida.

4.1.3. Factores asociados

En busca de un adecuado y acertado tratamiento a cualquier patología, se debe establecer una etiología, que a su vez indique los posibles tratamientos, ocurre lo mismo con las recesiones gingivales que al ser una situación clínica presente con frecuencia en la población adulta, requiere de un acertado tratamiento, por lo cual, se ha determinado una

etiología multifactorial para esta patología. De igual manera, se han agrupado las variaciones morfológicas del desarrollo como factores predisponentes y unos factores precipitantes en donde se incluyen aquellos hábitos adquiridos o condiciones propias del paciente, con el fin de determinar un posible plan de tratamiento según su etiología (Chan, 2015).

4.1.3.1. Factores predisponentes

La presencia de hueso alveolar que sostiene el tejido blando, la posición del diente en el arco dentario o si las raíces de este son prominentes, se encuentran dentro de los factores predisponentes a las recesiones, esto debido a que la falta de hueso alveolar puede llegar a producir dehiscencias y fenestraciones que a su vez aumenta el riesgo. Aunque menos asociado, se encuentra la presencia de un frenillo sobre insertado o patológico junto con estiramiento repetitivo por los movimientos en la función, que pueden ser causantes en una recesión (Chan, 2015).

Por su parte, el fenotipo periodontal, también se ha definido como uno de los factores importantes predisponentes en las recesiones gingivales, se ha definido el biotipo periodontal como las características clínicas de la encía y a su vez se ha establecido los tipos de fenotipo periodontal en un tejido gingival delgado o fenotipo periodontal delgado de 2,75 mm a 5,55mm de ancho de tejido queratinizado es más susceptible a recesiones gingivales comparado con un biotipo periodontal grueso cuyo tejido queratinizado es mayor a 5.09 mm (Chan, 2015; Cortellini & Bissada, 2018).

En el momento de diagnosticar, se hace importante el valorar todas estas características clínicas propias del paciente y evaluar de manera individual cada caso, cada

situación clínica, cada diente y al mismo tiempo en conjunto, para llegar así a un diagnóstico acertado.

4.1.3.2. *Factores precipitantes*

Dentro de las posibles causas precipitantes a las que siempre han sido asociados a las recesiones gingivales, se incluye el cepillado, es decir, la duración, la fuerza con la que se realiza, la frecuencia del cepillado, o si las cerdas que se usan son demasiado duras y junto con una técnica inadecuada, llevan a desarrollar estas lesiones, que al tiempo que se presentan en pacientes con cepillado excesivo también se puede presentar en pacientes con cepillado deficiente al llevar a inflamación (Rajapakse et al., 2007).

Como ya se afirmó, una inadecuada higiene oral puede llevar a inflamación localizada o generalizada, está en su proceso de destruir tejido gracias a la proliferación de células epiteliales al tejido conectivo y acúmulos de placa bacteriana que si no son tratados, pueden llevar a bolsas periodontales y aparición de defectos óseos, que al ser tratadas eliminando la profundidad de la bolsa periodontal, se convierten en factores precipitantes de la exposición radicular más allá de la línea mucogingival (Cairo, 2017).

Posterior a la extracción de un molar o la enfermedad periodontal puede llevar a una remodelación del hueso alveolar generalmente en interproximal, además esta irritación también es causada por la masticación de tabaco, perforaciones en la boca, que puede provocar lesiones mecánicas en el 80% de los pacientes con perforaciones tanto en maxilar como mandibular, aumentando así en un 11% la posibilidad de tener una recesión (Chan, 2015).

4.1.3.3. Otras condiciones modificables

Por otra parte, se han mencionado, aunque menos, otras posibles causas de la aparición de las recesiones gingivales son las iatrogénicas, entre las que se encuentran los movimientos producidos por aparatología de ortodoncia que al sobrepasar el límite óseo puede influir en la progresión de la recesión, generalmente cuando el biotipo periodontal es delgado, aumentado en un 10 a 20% la incidencia de recesiones 5 años posterior al tratamiento. Así mismo, las restauraciones rugosas, con perfiles de emergencia deficientes y que invaden el espacio biológico, llegan a provocar una respuesta inflamatoria además de una deficiente higiene oral en la zona que lleva a la migración apical del margen gingival (Cairo, 2017; Chan, 2015; George, 2016).

No cabe duda, de la importancia que pueden llegar a tener estos conocimientos para el área clínica, ya que en busca de prevenir recesiones gingivales se puede empezar por indagar sobre estos hábitos y factores involucrados desde temprana edad y así mismo hacer seguimiento a las recesiones pre-existentes y evitar su evolución.

4.1.4. Clasificación

Los sistemas de clasificación, buscan facilitar la comprensión de diferentes conceptos y al mismo tiempo agrupar categorías; en el caso de las recesiones gingivales es necesaria para el diagnóstico, pronóstico y plan de tratamiento, además de lograr una unificación de conceptos entre los profesionales, No obstante, se han creado clasificaciones teniendo en cuenta características clínicas, que a su vez han presentado inconvenientes a la hora de llevarla a la práctica, por lo que otros autores han creado otras clasificaciones en busca de complementar las anteriores.

4.1.4.1. Clasificación de Miller

Miller en 1985 clasificó las recesiones gingivales basándose en el nivel del margen gingival con respecto a la línea mucogingival y el nivel del hueso alveolar subyacente, proponiendo 4 clases de recesión. Miller I donde clasificó la recesión que no se extiende a la línea mucogingival (Figura 1), Miller II cuando el margen gingival ya alcanza la unión mucogingival y en ninguna de las anteriores se puede evidenciar pérdida ósea interproximal (Figura 2). Miller clase III involucra pérdida de hueso interproximal, el margen está más allá de la unión mucogingival, en la clase IV existe pérdida ósea interproximal grave además de que se presenta mal posición dental. (Figura 3) (Cairo, 2017).

Figura 1. Recesión Miller Tipo I



Figura1: (A) Recesión bucal en el canino superior. (B) La pérdida clínica bucal de inserción es de 5 mm. (C) La unión cemento-esmalte interproximal no es detectable en los sitios mesial o distal. Tomado de (Cairo F. , 2017).

Figura 2. Recesión Miller Tipo II



Figura 4: (A) Recesión bucal en el primer premolar. (B) La pérdida clínica bucal de inserción es de 4 mm. (C) La pérdida interdental de la inserción clínica es de 3 mm en el sitio mesial. Tomado de (Cairo F. , 2017).

Figura 3. Recesión Miller Tipo III



Figura 3: (A) Recesión bucal en el incisivo central izquierdo. (B) La pérdida clínica bucal de inserción es de 6 mm. (C) La pérdida interdental de la inserción clínica es de 9 mm en el sitio distal. Tomado de (Cairo F. , 2017).

A pesar de ser una de las clasificaciones más usadas en la actualidad, no es exhaustiva ya que no considera todos los casos de recesión, como es el caso de aquellas que se encuentran en palatino, adicional presenta algunos inconvenientes entre los que se pueden citar, la dificultad para ubicar la unión mucogingival, lo que ocasiona similitud entre la clase I y la II; en clase III y IV se incluye la presencia de malposiciones dentales sin especificar tipo o grado, de manera similar pasa con las características de la pérdida ósea, es decir, cantidad y orientación de la pérdida ósea que no son mencionados en esta clasificación (Cairo et al., 2011; Pini-Prato , 2011).

4.1.4.2. Clasificación Cairo

Debido a estos inconvenientes se hizo necesario el desarrollo de otra clasificación que lograra cubrir estos aspectos clínicos que fuera útil, exhaustivo y al mismo tiempo simple de usar, por lo que Cairo et. al., en el 2011 desarrolló un sistema de clasificación basado en la

pérdida de inserción clínica en 4 superficies dentales, medidas desde la unión cemento-esmalte.

En la recesión tipo 1 o RT1 la recesión se presenta en vestibular o lingual sin que exista un compromiso interproximal, en RT2 se observa recesión interproximal, pero sigue siendo la recesión mayor en la superficie vestibular y finalmente, la RT3 en donde la recesión interproximal es mayor o más profunda que en las superficies vestibular o lingual (Cairo et. Al., 2011).

Esta clasificación, a pesar de tener en cuenta la línea amelo cementaria, es útil tanto para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos defectos. Sin embargo, no tiene en cuenta los casos en que la recesión se presenta por abrasión radicular y compromete toda o parte de esta estructura que separa la corona del complejo radicular; lo que hace difícil medir exactamente la profundidad y el ancho de las recesiones en el momento de un diagnóstico definitivo (Pini-Prato et al., 2010).

4.1.4.3. Clasificación Pini-Prato

En el 2010 Pini-Prato et.al., realizaron una evaluación clínica de los tejidos gingivales utilizando una sonda periodontal, un explorador y un lente con aumento de 4 para evaluar la unión amelo-cementaria y las posibles discrepancias que pudieran hallar. Se clasificó la presencia de la unión amelo-cementaria al ser identificable como clase A y clase B en los casos que se había perdido total o parcialmente (Pini-Prato et al., 2010).

Las discrepancias evaluadas por medio de una sonda periodontal, colocada perpendicular al eje largo del diente justo en el punto más profundo de la abrasión fue clasificada a su vez como positiva (+), cuando esta discrepancia cervical que puede involucrar

raíz y corona o raíz, superaba los 0.5mm, una clasificación negativa (-) fue asignada a la ausencia de discrepancias o escalones cervicales. Es así, como se consolidaron 4 condiciones clínicas diferentes: Clase A negativo (-): unión amelo-cementaria visible, superficie sin discrepancia cervical (Figura 4). Clase A positivo (+): unión amelo-cementaria visible, superficie con discrepancia cervical (Figura 5). Clase B negativo (-): unión amelo-cementaria no visible, superficie sin discrepancia cervical (Figura 6). Clase B positivo (+): unión amelo-cementaria no visible, superficie con discrepancia cervical (Figura 7) (Pini-Prato et al., 2010).

El diagnóstico de una recesión requiere además de hacer la evaluación de los tejidos blandos, una revisión completa de los tejidos duros del diente afectado, ya que es parte de un diagnóstico asertivo, un pronóstico y un tratamiento quirúrgico exitoso.

Figura 4. Recesión Pini-Prato A (-)

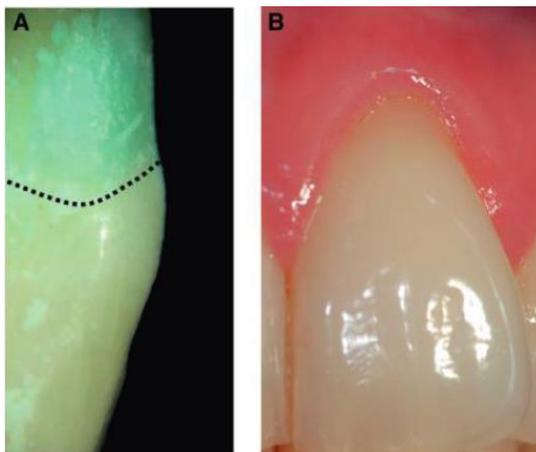


Figura 4: Vistas histológicas (A) y clínicas (B). Tomado de (Pini-Prato et al., 2010).

Figura 5. Recesión Pini-Prato A (+)

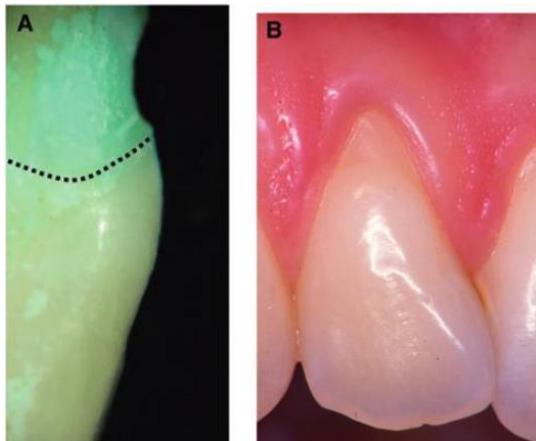


Figura 5: Vistas histológicas (A) y clínicas (B). Tomado de (Pini-Prato et al., 2010).

Figura 6. Recesión Pini-Prato B (-)

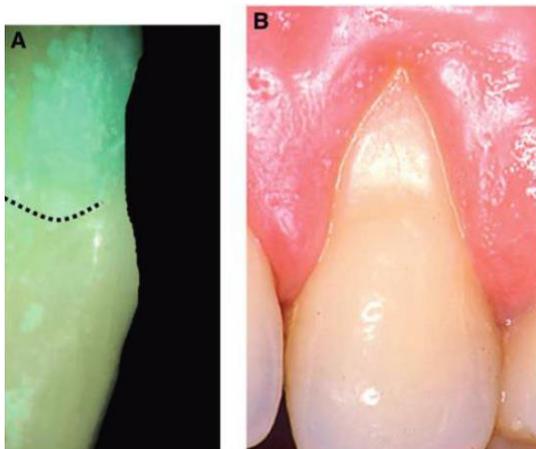


Figura 6: Vistas histológicas (A) y clínicas (B). Tomado de (Pini-Prato et al., 2010).

Figura 7. Recesión Pini-Prato B (+)

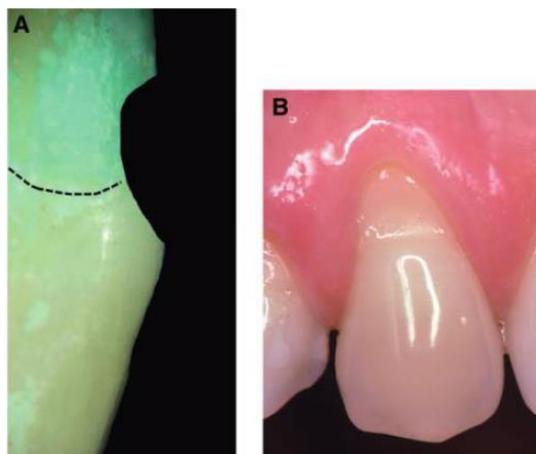


Figura 7: Vistas histológicas (A) y clínicas (B). Tomado de (Pini-Prato et al., 2010).

4.1.5. Tratamiento

La planeación de un tratamiento odontológico en estos casos que se presentan recesiones gingivales, debe evaluarse desde identificar el tipo de recesiones que el paciente presente, las condiciones que puedan llegar al aumento de las mismas y de esta manera desarrollar un enfoque individual para cada paciente, si existe la posibilidad de controlar la evolución de la recesión o si por el contrario debemos tener en cuenta un abordaje quirúrgico y al mismo tiempo y que el paciente sea capaz de seguir y lograr una adherencia exitosa a largo plazo (Merijohn, 2016).

4.1.5.1. Tratamiento no quirúrgico

Un caso candidato a seguimiento o monitoreo, debe cumplir con los siguientes criterios, no debe haber evidencia documentada de una recesión gingival progresiva, la pérdida de inserción clínica es menor o igual a 5mm, la recesión presente es menor a 2 mm, además estos casos no deberían tener restauraciones subgingivales, ni movimientos de

ortodoncia o aparatología que esté en contacto con el tejido. Por el contrario, si las condiciones presentes asociadas a las recesiones son otras, como una evidencia progresiva de la recesión, existe una inflamación persistente que lleva a pérdida de inserción mayor a 5 mm y recesión mayor o igual a 2mm se debe considerar para procedimiento quirúrgico, de igual manera si la higiene bucal se ve limitada por vestíbulo poco profundo, un frenillo sobre insertado o una hendidura o fisura en el tejido blando el paciente también debe incluirse en el planteamiento de un tratamiento quirúrgico (Merijohn, 2016).

4.1.5.2. Tratamiento quirúrgico

4.1.5.2.1. Indicaciones

La estética dental siempre ha jugado un papel importante para las personas dentro de una sociedad, es por esto que una de las principales indicaciones para realizar una cirugía de cubrimiento radicular es la demanda estética del paciente, ya que los dientes excesivamente largos o que se observe una desarmonía gingival por la morfología de la recesión, una hendidura de Stillman o recesiones que superen la línea mucogingival, se convierten en indicaciones quirúrgicas (Zucchelli & Mounssif, 2015).

Siendo la hipersensibilidad dental un dolor breve y agudo ocasionado por la exposición de la dentina como respuesta a estímulos externos, especialmente el frío, que ha sido tratada con la aplicación en la zona de agentes químicos capaces de disminuir tal sensibilidad que si no disminuye, el paso a seguir sería la colocación de restauraciones en resina sin que llegue a invadir el margen gingival, esto a veces resulta en tratamientos temporales que finalmente dan paso a una cirugía plástica periodontal, logrando al mismo tiempo restablecer tejido queratinizado perdido (Zucchelli & Mounssif, 2015).

Otra de las indicaciones para un procedimiento quirúrgico en el cubrimiento radicular, es la presencia de abrasiones y caries radiculares que además de ocasionar sensibilidad no permite la realización correcta del cepillado, en estos casos se requiere procedimientos que incluyan la parte restauradora con resina y la parte quirúrgica (Zucchelli & Mounssif, 2015).

4.1.5.2.2. *Tratamiento restaurador -quirúrgico*

Zucchelli et. al., (2011), clasificó las discrepancias presentes en raíz y corona, que suelen encontrarse en los dientes afectados por recesiones gingivales y las definió como lesiones cervicales descritas a su vez, como “el desgaste de la sustancia del diente a nivel del tercio gingival del diente debido a razones distintas a la caries dental” (Zucchelli et. al., 2011).

La etiología debida principalmente a las fuerzas mecánicas del cepillado, en donde también incluyen abfracción, indican tratamiento en los casos en que la estética se ve afectada por la pigmentación, cuando se presenta hipersensibilidad dentinal o en ocasiones que la lesión permite el acúmulo de placa bacteriana, cuyo tratamiento indicado es una cirugía mucogingival si la lesión se ubica en la raíz, si es coronal se trata con un tratamiento restaurador, mientras que si la lesión involucra tanto corona como raíz, el enfoque indicado va a ser un tratamiento combinado restaurador y quirúrgico periodontal (Zucchelli et. al., 2011).

El estudio que realizó Zucchelli et. al., (2011), cuyo objetivo principal fue sugerir un proceso de toma de decisiones para el tratamiento de lesiones cervicales no cariosas, en el que se incluyeron 94 pacientes entre 20 a 48 años, de los cuales 45 eran hombres y el restante mujeres, a su vez fueron seleccionados entre septiembre de 2007 y abril de 2008, que no estuvieran comprometidos sistémicamente, presentaran recesiones Clase I, II, III y IV de Miller y que no presentaran restauraciones en la raíz, un examinador fue el encargado de

categorizar estos defectos cervicales en cinco tipos en relación con la posición del nivel máximo de cobertura radicular con respecto a las lesiones cervicales no cariosas (Zucchelli et. al., 2011).

La categorización fue designada al tipo 1 si el cubrimiento radicular medio se ubicó > 1 mm coronal a la extensión más coronal de la lesión no cariosa, tipo 2; si el cubrimiento radicular medio se localizó ≤ 1 mm coronal a la extensión más coronal de la lesión no cariosa, el tipo 3 fue definido cuando el cubrimiento radicular medio se ubicaba en la parte más profunda de la lesión cervical no cariosa, el tipo 4 si el cubrimiento radicular se localizó apical a la porción más profunda de la lesión, en el tipo 5 el cubrimiento radicular medio obtenido tras el procedimiento quirúrgico se localizó al nivel o apical a la extensión más apical de la lesión cervical no cariosa (Zucchelli et. al., 2011).

Al mismo tiempo, se utilizaron cinco enfoques de tratamiento según el tipo de lesión cervical no cariosa, el tipo 1 que se asoció a una clase I de Miller, cuyo tratamiento fue netamente periodontal al utilizar un colgajo desplazado coronalmente junto con terapia mecánica con instrumental manual apoyado con instrumental rotatorio y aplicación de EDTA al 24% durante 2 minutos. El tratamiento utilizado para el tipo 2 consistió en adicionar a la cirugía periodontal utilizada en el tipo 1, un injerto de tejido conectivo extraído del paladar utilizando así una técnica bilaminar (Zucchelli et. al., 2011).

La asociación a la clasificación de Miller I, II y III se hizo para el tipo 3 del cubrimiento radicular medio, cuyo enfoque de tratamiento consistió en una odontoplastia coronal previo al procedimiento quirúrgico que se acompañó de una odontoplastia radicular, con el fin de reducir la profundidad de la lesión cariosa y así poderse restaurar con resina; al igual que en el tipo 4 en el que la porción más profunda del defecto no carioso se localizó al

nivel de la corona anatómica y solo la porción apical de esta involucró la raíz y el colgajo se ubicó 1 mm coronal a la resina, enfoque que se utilizó en clase 5 (Zucchelli et. al., 2011).

El tratamiento ideal de las lesiones no cariosas debe ser combinado, esto con el fin de disminuir la sensibilidad sino también de lograr una apropiada apariencia estética ante la evaluación del paciente y una cobertura radicular esperada para el profesional.

De igual manera, otros enfoques que se han utilizado en el tratamiento de las recesiones gingivales, en donde se incluyen, desde injertos autólogos extraídos generalmente del paladar, alogénicos de otros sujetos, xenogénicos obtenidos de otras especies como lo son porcinas, hasta matrices y mucosas realizadas manualmente, esto con el objetivo de abordar esta temática y esta problemática desde diferentes ámbitos, en la búsqueda del tratamiento que consiga los resultados esperados, tanto para el profesional como para el paciente. Entre estos tratamientos se encuentran también los colgajos que a lo largo de los años y al ser analizados por los investigadores y clínicos han planteado algunas modificaciones.

Dentro de los procedimientos de cirugía plástica periodontal que van encaminados al cubrimiento de recesiones gingivales, se encuentran las técnicas monolaminares y bilaminares. Las monolaminares, se describen como aquellas técnicas que reciben el injerto y la vascularización, el cual se va irrigar a partir de la base de donde se eleva el colgajo, es decir, el periostio o el hueso, como en un injerto gingival libre o en algunos casos el injerto de tejido conectivo. Las técnicas bilaminares alimentan al injerto desde la base y también desde el mismo colgajo ya que este se cubre cuando se posiciona y así este injerto va a quedar más protegido (Ozenci et. al., 2015).

4.1.5.2.3. *Colgajo desplazado coronalmente*

Es un procedimiento quirúrgico que implica un desplazamiento coronal del tejido blando ubicado apical a la recesión, cuyo objetivo es el cubrimiento de la raíz que está expuesta. Este procedimiento, actualmente el más usado para cubrir las recesiones gingivales, fue planteado en 1926 por Norberg. Sin embargo, no fue sino hasta 1989 que fue descrita la técnica por Allen y Miller, quienes propusieron un colgajo en recesiones únicas que no requerían un aumento gingival y que gracias a incisiones verticales que superen el límite de la línea mucogingival se podía hacer una separación de la mucosa (Cairo F. , 2017; Zucchelli & Mounssif, 2015).

No fue sino hasta el año de 1992, que Pini-Prato et al., combinó esta técnica con una membrana no reabsorbible y modifico el colgajo a uno trapecoidal con incisiones divergentes y una incisión intrasural. En el 2007 se hace un nuevo ajuste a esta técnica, al realizar incisiones biseladas horizontales en la base de la papila formando así lo que se denominó como papilas quirúrgicas, De Sanctis & Zucchelli también agregó a esta nueva modificación el tratamiento radicular por medio de curetas (Cairo F. , 2017).

En el mismo orden de ideas, el objetivo de las modificaciones a esta técnica es lograr un cubrimiento radicular del 100%, por lo que también se han agregado tejidos autólogos como injertos, para suplir en algunos casos la ausencia de tejido queratinizado, que disminuya la tasa del cumplimiento de este objetivo, así mismo, se han dado una serie de parámetros que se deben tener en cuenta en el momento de la obtención del tejido; entre estos parámetros se encuentra, que debe ser 3mm más grande al defecto que se va a tratar con un espesor que también supere 1 mm (Zucchelli et. al., 2019).

Siempre y cuando haya suficiente tejido queratinizado apical al defecto, este colgajo coronalmente avanzado, se convertirá en el tratamiento ideal a seguir, sea en un diente único o en múltiples recesiones contiguas, lo que al final del proceso de cicatrización va a permitir la obtención de una cobertura completa de la recesión, resultados estéticos favorables al mantenerse el color adecuado de la encía y recuperar la morfología gingival que se había perdido (Zucchelli & Cesari, 2004).

Ahora bien, no en todos los casos es posible realizar este procedimiento quirúrgico, ya que existen condiciones anatómicas, como un vestíbulo poco profundo, la inserción marginal de un frenillo, deficiencia de tejido queratinizado o una hendidura de Stillman, (Zucchelli & Cesari, 2004), estos escenarios clínicos pueden llegar a limitar los resultados favorables y satisfactorios tanto para el paciente como para el operador, por lo que cada paciente y caso debe tratarse de manera individual.

4.1.5.2.4. *Colgajo reposicionado lateralmente*

Otro de los colgajos pediculados rotados indicados para recesiones únicas es el colgajo desplazado lateralmente, descrito por primera vez en 1956 por Grupe y Warren, el cual consistía en mover un colgajo de espesor total hasta la unión mucogingival del diente adyacente, dado que se presentó recesión en el diente donador, Grupe en 1966, modificó la incisión surcular por una submarginal y autores como Rubens et al., en 1975, combinaron colgajo a espesor total y parcial, para cubrir superficie radicular y hueso expuesto respectivamente (Zucchelli & Cesari, 2004; Lindhe & Lang, 2017).

En el 2004, Zucchelli, describe la técnica dividiéndola en 2 zonas, una la zona receptora y otra la zona del colgajo, en la primera se realizan 3 incisiones.

Una horizontal 3 mm en sentido mesio-distal a nivel de la línea amelocementaria, una vertical biselada paralela al margen gingival mesial a la recesión hasta la mucosa alveolar y una intrasurcular biselada a lo largo del margen gingival distal del defecto de recesión que se extiende en la mucosa alveolar hasta cruzar la incisión vertical. Se realiza desepitelización con hoja de bisturí paralela a la superficie gingival (Zucchelli & Cesari, 2004).

En la zona del colgajo se adicionan 2 incisiones:

Una submarginal horizontal que se extiende en dirección mesio-distal 6 mm más que el ancho del defecto de recesión medido en la línea amelo-cementaria y otra incisión que es vertical oblicua biselada, que se extiende hacia la mucosa alveolar, paralela a la primera incisión intrasurcular (Zucchelli & Cesari, 2004).

Antagónicamente, el colgajo desplazado lateral está indicado en aquellos casos donde un colgajo desplazado coronal no obtendría resultados predecibles, como lo es el caso de deficiencia de tejido queratinizado apical al defecto de la recesión, inserción inadecuada de un frenillo y un vestíbulo poco profundo, mientras que a su vez las contradicciones son las recesiones Miller clase III y enfermedad periodontal en donde existan bolsas interproximales profundas (Zucchelli & Cesari, 2004).

Con el objetivo de analizar estas últimas técnicas, Santana publicó en el 2019, un ensayo clínico aleatorizado con seguimiento a 5 años en donde comparo la eficacia de las técnicas de colgajo posicionado lateralmente y colgajo avanzado coronal en el tratamiento de defectos localizados de recesión gingival, en donde se tuvieron en cuenta a 36 pacientes con defectos clase I de Miller, sin diferencias estadísticas en los parámetros clínicos evaluados, entre los que se encontraron el ancho del tejido queratinizado, la profundidad de sondaje y el nivel de inserción clínica vertical (Santana et. al., 2019).

Dentro de los resultados que este ensayo clínico arroja, se encuentra que:

La cobertura radicular completa se logró en 88,88% (15 de 18) de los casos tratados en el grupo de colgajo desplazado coronal después de 1 año y 56,25% (9 de 16) después de 5 años. En el grupo colgajo desplazado lateral, se observó cubrimiento radicular completo, en el 77,78% (14 de 18) de los casos después de 1 año y el 68,76% de los casos (11 de 16) después de 5 años. Los cambios en el grosor de tejido queratinizado favorecieron el procedimiento de colgajo desplazado lateral (2,1 frente a 0,4 mm después de 1 año; 2,4 frente a 0,2 mm después de 5 años) (Santana et. al., 2019).

De igual manera, lo documenta Zucchelli en 2004 después de tratar 120 recesiones Clase I y II de Miller con el colgajo pediculado lateral y hacer control clínico al año del procedimiento quirúrgico, donde el 97% de la superficie radicular estaba cubierta con tejido blando y el 80%, es decir, 96 de esos casos mostraron cobertura radicular completa, resultados que fueron directamente asociados con la ganancia de inserción clínica. Sin embargo, este tipo de técnica requiere unas condiciones que sean favorables para el éxito del procedimiento, entre los que se encuentra una dimensión mesio-distal mayor que permita el adecuado riego sanguíneo, dimensión apico-coronal del tejido gingival que corresponde al diente donador, esto para evitar recesión del mismo y garantizar la cobertura radicular (Zucchelli & Cesari, 2004).

En síntesis, estas dos técnicas quirúrgicas han demostrado ser efectivas y predecibles en el recubrimiento radicular. Ahora bien, es de vital importancia la eliminación de los factores predisponentes y precipitantes antes de cualquier tratamiento quirúrgico que busque el cubrimiento radicular de las recesiones de manera definitiva. Es decir, el éxito de este tipo de tratamientos depende tanto del operador al manejar las técnicas indicadas según el caso,

del paciente que este comprometido con su tratamiento y adicional logre seguir las indicaciones. A pesar de la predictibilidad de estas técnicas se han descrito otras que buscan resultados predecibles.

4.1.5.2.5. Técnica de túnel

La técnica de envoltura suprapariostica, técnica de túnel o en sobre, inicialmente fue descrita por Peter Raekte en 1985, donde estaba direccionada a tratar una sola recesión. Después en el año 1994, Andrew Allen le hace una modificación para el tratamiento de dos recesiones contiguas, y finalmente Zabalegui en 1999, la describe sin limitación alguna por el número de recesiones, agregando la colocación del injerto, el cual realiza con ayuda de una sutura desde la parte media de la recesión, y no desde distal o mesial como se describía anteriormente (Ozenci et. al., 2015).

La principal característica de esta, es conservar las papilas intactas, en el que también se incluye un injerto de tejido conectivo, obteniendo adecuados resultados estéticos, estos debidos al levantamiento del colgajo sin seccionar las papilas, ni realizar incisiones de liberación vertical, que comprometen la irrigación sanguínea permitiendo una cicatrización rápida, nutrición del injerto, permitiendo una mejor fijación del mismo y mayor irrigación, por ende, hay una mayor probabilidad de supervivencia y menor contracción del injerto, además de reducir la morbilidad del paciente y el riesgo mínimo de formación de tejido cicatrizal en el postoperatorio (Travelli et. al., 2018).

Dentro de las limitaciones, que se han encontrado en la práctica de esta técnica quirúrgica, se encuentran la destreza que tenga el operador sobre la técnica quirúrgica, la

aplicabilidad en una recesión única mayor a 5 mm y la morbilidad del paciente (Ozenci et. al., 2015).

Ilknur en el 2015, describe la técnica iniciando con el uso de una hoja de bisturí #15c para realizar una incisión surcular a nivel de la recesión y así realizar el levantamiento del colgajo a espesor parcial, este se puede hacer con ayuda de un periostotomo o el mismo bisturí, pero se requiere de habilidad, manejando un espesor uniforme, sin desgarrar el tejido blando ni las papilas, estas se deben ir separando de manera coronal hacia el límite amelocementario con la hoja del bisturí paralela al plano óseo, la disección se extiende más allá de la línea mucogingival (Ozenci et. al., 2015).

La disección parcial se extiende de 3 a 5 mm distal a la recesión de forma paralela, esto para reducir la tensión del colgajo y permitir la entrada del injerto. Una vez expuesta la zona radicular se procede a hacer el raspaje para eliminar restos de cálculos o biofilm y realizar un pulimento con fresas perio-Set, esto para disminuir la convexidad de la raíz, permitiendo que el bridging tenga una longitud menor durante la revascularización, a continuación la colocación del injerto en el área receptora, se realiza por medio de una sutura que incide en el injerto sujetándolo, teniendo en cuenta que esta ha sido introducida antes de tomar el injerto e introducirla en la zona más distal de la recesión para salir por la zona más apical de la misma (Ozenci et. al., 2015).

Se sujeta el injerto con un colchonero vertical y se realiza el mismo procedimiento en la parte mesial del colgajo, al tensionar, esto lo logrará posicionar dentro del lecho quirúrgico. Finalmente, se reposiciona el colgajo y se sutura con un colchonero simple, haciendo presión sobre el mismo con una gasa húmeda, impregnada de suero fisiológico preferiblemente para reducir el tamaño del coágulo. Seguido de esto se hace la fijación del colgajo coronal a la

recesión, mediante el uso de sutura suspensoria, que vaya anclada a la corona del diente por medio de resina de fotocurado. Esto realizando una variación con la técnica “Vista” (Ozenci et. al., 2015).

4.1.5.2.6. *Técnica VISTA*

Esta es una técnica que por sus siglas VISTA, (Vestibular Incision Subperiosteal Tunnel Access) traduce, acceso de túnel subperióstico de incisión vestibular, es una técnica quirúrgica de espesor total, con adecuado grosor del colgajo, cumpliendo así a uno de los factores predictores del recubrimiento radicular, además tiene menos tensión ya que se libera abundante tejido, lo que permite que se haga un posicionamiento del margen gingival menor a 2 mm de la línea amelocementaria, que se logra conservar durante el proceso de cicatrización, gracias a la colocación de resina compuesta en la parte coronal. Esta técnica está indicada en el recubrimiento radicular, en casos donde se requiere hacer un aumento de tejido blando alrededor de implantes dentales o cuando se desea aumentar el reborde alveolar (Zadeh & Homayoun, 2011).

Dentro de las ventajas que tiene esta técnica podemos encontrar que la integridad de las papilas se mantiene, se reduce la posibilidad de desgarro, la tensión del margen gingival se reduce y el acceso es más amplio que con otras técnicas. A pesar de esto, la estética y el no poder cepillarse durante el proceso de cicatrización son algunas de sus desventajas (Zadeh & Homayoun, 2011).

El Dr. Zadeh (2011), quien es el innovador en esta técnica VISTA, prepara inicialmente el diente receptor realizando odontoplastia en la zona cervical bien sea con ultrasonido, fresas de diamante y/o curetas, esto seguido de un acondicionamiento radicular,

realizado con EDTA al 24% durante 2 minutos en la superficie radicular y aclarar con suero fisiológico. La incisión se realiza a espesor total vertical por vestibular a la altura de la línea mucogingival 1 ó 2 dientes más allá del diente a tratar, si son varios dientes con recesión se realiza a la altura del frenillo en la línea media. Acto seguido, se inicia la tunelización en sentido horizontal desde la incisión hacia el margen gingival hasta apical, para liberar el periostio, que de acuerdo a la zona y a la angulación se realiza con un tunelizador diferente. (Zadeh & Homayoun, 2011).

El paso a seguir, es la reposición coronal y la sutura utilizando un punto colchonero horizontal, idealmente utilizando sutura de monofilamento 6-0 de polipropileno a 2 o 3 mm del margen gingival y se anuda. Sobre la superficie dental se aplica ácido ortofosfórico o ácido fluorhídrico en casos con coronas cerámicas, luego se deben traccionar los cabos de la sutura para fijarlos con resina compuesta fluida fotopolimerizable a la superficie dental, reposicionando así el colgajo 3 mm coronal del límite amelocementario. Para adicionar injerto de tejido conectivo del paladar, éste se introduce por el túnel que se creó y se fija con colchonero horizontales. Esta técnica también se ha descrito usando aloinjertos o xenoinjertos con o sin factores de crecimiento. Finalmente se sutura la incisión vertical y la de la toma del injerto con puntos simples (Zadeh & Homayoun, 2011).

Cabe resaltar, la importancia de los cuidados post-operatorios que debe seguir el paciente como lo son el no cepillarse la zona quirúrgica ni usar seda dental durante 3 semanas, por el contrario, se debe realizar enjuagues diarios con clorhexidina al 0,12% durante 21 días, momento en que retirará la sutura (Zadeh & Homayoun, 2011).

4.1.5.2.7. *Injertos blandos*

Se ha mencionado que el grosor del tejido queratinizado es un factor que influye en la decisión del protocolo quirúrgico para cada caso, ya que cuando este se encuentra reducido o es menor a 2 mm, se requiere realizar un aumento del tejido queratinizado previo a la cirugía plástica periodontal que restaure el margen gingival en un diente con recesión gingival y pueda garantizar realmente el cubrimiento radicular completo; buscando esto se ha implementado el injerto gingival libre, injertos autógenos, xenogénicos y aún se está comprobando los resultados del uso de plasma rico en fibrina como coadyuvante en la cirugía plástica periodontal.

4.1.5.2.7.1. *Injerto gingival libre*

El injerto gingival libre autólogo, es el que se ha utilizado con mayor frecuencia en el tratamiento quirúrgico periodontal, en la mayoría de los casos se extrae del paladar en su parte anterior o posterior, sin embargo, cuando no es posible por la poca profundidad del paladar, se puede tomar de la tuberosidad del maxilar o de la zona del vestíbulo inferior posterior, aunque es menos común. El posicionamiento es de vital importancia a la hora de obtener los resultados esperados, Cairo indica que el injerto se debe colocar apical a la unión cemento-esmalte, fijándolo con sutura de colchonero vertical (Cairo F. , 2017) y un espesor mayor a 1 mm (Zucchelli & Mounssif, 2015).

Así mismo, el injerto gingival libre se ha utilizado en una primera etapa quirúrgica para lograr un aumento de la altura del tejido queratinizado y que al finalizar el proceso de cicatrización permita una segunda fase quirúrgica con el objetivo del avance coronal que

cubra la superficie radicular y al mismo tiempo obtener resultados estéticos (Zucchelli & Mounssif, 2015).

En ese mismo concepto, se busca la migración coronal espontánea del tejido marginal gingival para cubrir y unirse a la superficie radicular previamente denudada parcial o completamente, sin que al sondaje se presente una bolsa periodontal, a esto se le denomina “creeping attachment”, es un concepto descrito en 1964 por Goldman y Cohen, este deslizamiento del margen gingival se da como reacción al trauma del procedimiento quirúrgico donde las células fibroblásticas del ligamento periodontal, el periostio y el tejido gingival proliferan para formar el nuevo tejido (Wan et. al., 2020).

No cabe duda, que lo que se busca con estos procedimientos quirúrgicos es mejorar los resultados estéticos y la condición periodontal, lo que se puede observar hasta 1 año después de la cirugía y desde el primer mes posterior a la cirugía, sin embargo el ancho de la recesión, la posición del injerto, la posición de los dientes y la higiene del paciente, son factores que influyen la inserción del tejido en la raíz expuesta, por lo que todos estos factores, deben ser tenidos en cuenta previamente a la realización del procedimiento y como parte de la planeación del tratamiento (Wan et. al., 2020).

En otro orden de ideas, el injerto gingival libre tiene ciertas desventajas o complicaciones entre las que podemos encontrar, el compromiso de dos zonas quirúrgicas, que causan una doble morbilidad al paciente, de igual manera el compromiso sanguíneo al que se está expuesto en el procedimiento de la toma del injerto, es una de las complicaciones que se deben tener en cuenta al momento de la planeación, ya que al realizar un abordaje demasiado profundo hay bastante probabilidad en cuanto a la perforación de la arteria palatina (Reiser et al., 1996).

Con respecto al resultado estético comprometido este se ve comprometido, ya que, al colocar este tipo de injerto, la mayoría de las veces presenta un color y un contorno diferente al lugar receptor por lo cual no se ve adecuadamente estético. También, exige un grado de experiencia clínica moderado y conocimiento de la anatomía de las zonas comprometidas por parte del operador, sin embargo, suele ser un procedimiento muy versátil, con un alto grado de previsibilidad y con un potencial ilimitado (Reiser et. al., 1996).

4.1.5.2.7.2. Injerto de tejido conectivo

Con el objetivo de proporcionar al injerto un mayor suministro de sangre se ha utilizado la técnica bilaminar, donde con un injerto de tejido conectivo se obtienen procedimientos de cobertura radicular más predecibles y que logren aumentar la supervivencia del injerto, al mismo tiempo que se va modificando la técnica en cuanto al tipo de injerto, el tipo de colgajo, si es reposicionado o desplazado coronal con o sin incisiones liberadoras, la razón, una apariencia estética aceptable tanto para el paciente como para el operador (Zucchelli & Mounssif, 2015).

En 1985, Langer y Langer fueron los primeros en describir el uso del injerto de tejido conectivo subepitelial, que consiste en obtener el tejido conectivo donante del interior de la fibromucosa palatina, (Langer & Langer, 1985), este colgajo inevitablemente va a causar morbilidad en el paciente, por lo que se ha buscado reducir la misma, mediante la extracción en diferentes formas que solo utilizan colgajos a espesor parcial que permita el retiro del tejido conectivo con el espesor adecuado y que a su vez permita una reposición del colgajo para que se dé un cierre primario y una cicatrización por primera intención (Zucchelli & Mounssif, 2015)

Es así como el injerto de tejido conectivo a pesar de ser considerado como el “estándar de oro”, se ha intentado reemplazar por sustitutos que sean capaces de cumplir con las mismas características, que al mismo tiempo eviten las cirugías extensas que se ocasionan al momento de tomar el injerto y así disminuir la morbilidad ocasionada por el mismo. Dentro de estas opciones se ha implementado la matriz dérmica acelular que permite un proceso de cicatrización al permitir la proliferación celular sobre esta matriz (Cairo F. , 2017).

La longitud del injerto será tomada en cuenta con respecto a la medida que con ayuda de la sonda periodontal se tomará. Se recomienda que el injerto sea de una longitud menor a la zona receptora, pero mínimamente, esto para que cuando se posicione el injerto de tejido conectivo, como se va a ejercer una pequeña tensión sobre el mismo para que este quede íntimamente relacionado con el periostio, y así disminuir el tamaño del coágulo.

Para la toma del injerto se tiene en cuenta la zona comprendida entre la zona comprendida del canino y la raíz palatina del primer molar superior, se deben tener varias consideraciones como el tipo del paladar del paciente. Cuando se va a realizar una técnica de túnel modificado descrita por Ion Zabalegui, se requiere un injerto de tejido conectivo de una mayor longitud, por ende, para su toma, el profesional debe tener previo conocimiento de la anatomía del maxilar, ya que reporta la literatura que el paquete vasculonervioso, se puede encontrar a 7, 12 o 17 mm de la línea amelocementaria en zona molar palatina. En algunos casos el injerto se toma de 16 a 26, porque se requiere de un tamaño mayor (Ozenci et. al., 2015).

La técnica para la toma del injerto se realiza una incisión a espesor total de 2 o 3 mm del límite amelo-cementario en el sector palatino y otra incisión paralela con una angulación del bisturí, a 135° aproximadamente, después, se unen estas dos incisiones y se procede a

tomar el injerto, esto con ayuda de un periostotomo o la misma hoja del bisturí. El grosor del injerto debe ser de aproximadamente 2mm o mínimo 1.5mm (Ozenci, 2015).

4.2. Mucosa oral normal

La mucosa oral es una estructura anatómica, que recubre tejidos blandos y tejidos duros funcionando como una especie de tapizado, el cual tendrá como función brindar protección mediada principalmente por la estructura física del epitelio. La presencia de células inmunocompetentes (células y linfocitos de Langerhans) dentro del epitelio, la lámina propia y las células epiteliales que contribuyen a la capacidad protectora de la mucosa oral. Esta ejercerá su función protectora frente a patógenos que se dará mediante la secreción de una variedad de sustancias antimicrobianas (Cruchley & Bergmeier, 2018).

Además de la protección, la mucosa oral también tiene importantes funciones sensoriales, las cuales incluyen: sensación al tacto, la temperatura exclusiva de la cavidad bucal y el gusto. Estos son realizados por una variedad de terminaciones nerviosas especializadas, células (células de Merkel) y estructuras celulares (papilas gustativas) que se encuentran en diferentes áreas de la mucosa oral (Cruchley & Bergmeier, 2018).

4.2.1. Características

La mucosa oral, como parte de la mucosa masticatoria de la cavidad oral, rodea la porción cervical de los dientes y la apófisis alveolar, está compuesta de una capa epitelial y un tejido conectivo subyacente o lámina propia que lo sostiene y lo nutre. Este epitelio bucal es de tipo plano estratificado principalmente paraqueratinizado y en la zona del surco pierde la cornificación convirtiéndose en un epitelio no queratinizado (Lindhe & Lang, 2017).

4.2.2. Estructura

Los 2 principales componentes de la mucosa oral son el epitelio y la lámina propia, estos están sostenidos por un tejido conectivo fibroso. Microscópicamente la diferencia y el cambio de epitelio a lámina propia son visiblemente notorios, mientras que la submucosa y la mucosa es un poco más difícil de diferenciar. En algunas áreas de la cavidad bucal hay una capa de tejido conectivo graso o glandular suelto que contiene tanto suministro de sangre como de nervios, esta área separa la mucosa del hueso o músculo que subyace a estas estructuras en las mejillas, los labios y partes del paladar duro, esta es la submucosa, mientras que, en la encía y algunas partes del paladar duro, la mucosa reviste el tejido óseo directamente (Figura 8) (Cruchley & Bergmeier, 2018).

Figura 8. Mucosa oral normal



Figura 8: (a) dibujo de los principales componentes tisulares, (b) Histología del paladar duro que muestra los componentes dibujados en (a). Panel derecho (A) Mucosa masticatoria (mucoperiostio). (B) Revestimiento de la mucosa. Tomado de (Cruchley & Bergmeier, 2018).

Además, de las células productoras de queratina, es decir queratinocitos, que migran hacia la superficie también es posible encontrar melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel, los hemidesmosomas son capaces de unir las capas basales a la lámina propia subyacente; por otro lado, la membrana basal, compuesta por células cilíndricas o cúbicas que

están en contacto con la membrana basal que separa el epitelio del conectivo, además contiene colágeno tipo IV, laminina y fibronectina. En este estrato, las células se renuevan lo que lleva a una descamación y a un equilibrio constante del espesor del epitelio (Lindhe & Lang, 2017).

El estrato espinoso, está compuesto por 10 a 20 capas de células relativamente grandes y poliédricas con prolongaciones citoplasmáticas cortas, en donde se ubican desmosomas y permiten la cohesión entre las células epiteliales (Lindhe & Lang, 2017). Las citoqueratinas que se encuentran en todos los tipos de epitelios, estos atraviesan la superficie epitelial, se diferencian y se especializan constantemente, estos son los marcadores fundamentales de diferenciación epitelial, reflejando el tipo de célula y el estado de diferenciación en diferentes tipos y diferentes capas de epitelio (Moharamzadeh et. al., 2007).

4.3. Mucosas orales artificiales

Con respecto al estudio de las mucosas orales artificiales, busca generar una nueva línea en la ingeniería tisular en la cual se logre la regeneración de tejidos orales, para ello se han utilizado diferentes estrategias para desarrollar un tejido biomimético utilizando células modificadas, andamios sintéticos, con medios de cultivo que sean biocompatibles, tengan bioestabilidad, porosidad, imitando la forma de la mucosa oral humana normal. Entre las células utilizadas se encuentran los queratinocitos y fibroblastos, como es el caso de un estudio en donde se comparó una membrana a base de colágeno y una de quitosano reticulado, las cuales mostraron estratificación epitelial e infiltración de fibroblastos. Algo semejante ocurrió con los queratinocitos que fueron sembrados en colágeno-laminina, donde se mejoró la unión y la migración de estos (Moharamzadeh et. al., 2012).

Moharamzadeh et.al., (2012) describió el uso de colágeno-glucosaminoglicano (GAG)-quitosano, junto con queratinocitos y fibroblastos orales normales, para reproducir una mucosa oral no queratinizada, en donde se observó expresión de citoqueratina 13 por las células epiteliales (2012). Con el fin de desarrollar un injerto de mucosa oral compatible, se utilizó fibrina con fibroblastos y queratinocitos del plasma del mismo paciente, logrando una adecuada manipulación y menos inmunorechazo (Moharamzadeh et. al., 2012).

Por otro lado, un estudio realizado por Golinski y col (2011), utilizó una matriz de colágeno-elastina (Matriderm), la cual es utilizada para tratar quemaduras profundas, ya que el fin de este tipo de matriz es la regeneración de tejidos como son dermis y epidermis, este estudio incorpora dicha matriz para uso gingival mediante la creación de un modelo de mucosa oral, esto con el objetivo de analizar la compatibilidad y la regeneración de tejidos a nivel de cavidad oral.(Golinski et al., 2011).

Se pudo evaluar en este estudio, empleando técnicas de ingeniería de tejidos con células dérmicas y epidérmicas de la encía, que se generó y caracterizó una mucosa oral multicapa con respecto a la biocompatibilidad para Matriderm. Los resultados indicaron que Matriderm fue adecuado para un crecimiento de las células del tejido gingival ex vivo y fue útil como matriz con posibles aplicaciones en la terapia periodontal (Golinski et al., 2011).

4.3.1. Tipos de células utilizadas

4.3.1.1. Queratinocitos

En la creación de mucosas orales artificiales se ha implementado la estratificación con diferentes células como son queratinocitos, se realizó un estudio con un modelo 3D realizado por Viñuela et al., en el 2015, en el cual se observó una estratificación de 7 capas de epitelio mediante estas células, por lo cual serían candidatas para su agregación a una mucosa oral bio impresa. Cabe resaltar que una de sus desventajas es su alto costo y su difícil cultivo ya que son células de baja proliferación (Viñuela et al.2015).

4.3.1.2. Fibroblastos

Por otro lado, los fibroblastos que son células fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas, presentes en todos los tejidos del cuerpo humano con una alta proliferación celular, que los convierten en el mejor candidato al momento de realizar un cultivo para algún tipo de injerto (Sears et. al., 2016).

4.3.1.3. Células madre mesenquimales del cordón umbilical

Asimismo, las células madre mesenquimales, son células con características importantes, como la alta capacidad de proliferación, diferenciación multilinaje, propiedades inmunomoduladora, capaces de diferenciarse a casi todos los tejidos del cuerpo humano, por lo que se les denomina pluripotentes, sin embargo, el proceso de aislar es complejo. Por lo que se han utilizado células obtenidas del líquido amniótico o del cordón umbilical, que a su

vez se obtienen del revestimiento del mismo, de la gelatina de Whartón o la región perivascular. (Ding et. al., 2015).

4.3.1.4. *Células madre de la papila apical*

Las células madre de la papila apical ubicadas en la papila apical de los dientes permanentes inmaduros posee propiedades de alto potencial proliferativo, capacidad de autorrenovación y baja inmunogenicidad (Kang et al., 2019).

Por otro lado, tenemos la implementación de células madre de la papila apical, se toma como un estudio de innovación por lo cual su información en los diferentes artículos y estudios revisados, tienen como fin describir la capacidad que puede tener una célula madre de la papila apical en diferentes ámbitos, se pudo observar que además de tener un alto potencial de diferenciación hacia diferentes tipos de linajes celulares (adipogénico, condrogénico, osteogénico, entre otros), tiene también un alto potencial de división celular, es gracias a sus características propias de ser de fácil cultivo, el cual podría ayudar en el proceso de acoplamiento con la membrana de mucosa oral bio impresa (Sear et. al., 2016)

Actualmente existen dos métodos para la cultivar las células madre de la papila apical, el primer método es la digestión enzimática, en donde el tejido de la papila apical se separa del ápice radicular, posteriormente se tritura en trozos y luego se digiere en una solución de colagenasa tipo I, en donde desecha por medio de una agitación suave. Después de la digestión, se recolectan grumos de tejido y se pasan a través de un colador de células para obtener una suspensión de células individuales de células de papila apical, que luego se siembra en placas de cultivo (Sonoyama et. al.,2006).

Asimismo, el otro método es por medio del cultivo por explante, en el que el tejido obtenido de la papila apical se corta en pequeñas muestras de aproximadamente 1 mm³ de tamaño y luego se colocan en placas de cultivo, para su posterior replicación y formación de colonias (Sonoyama et. al., 2006).

Figura 9 Células madre de la papila apical

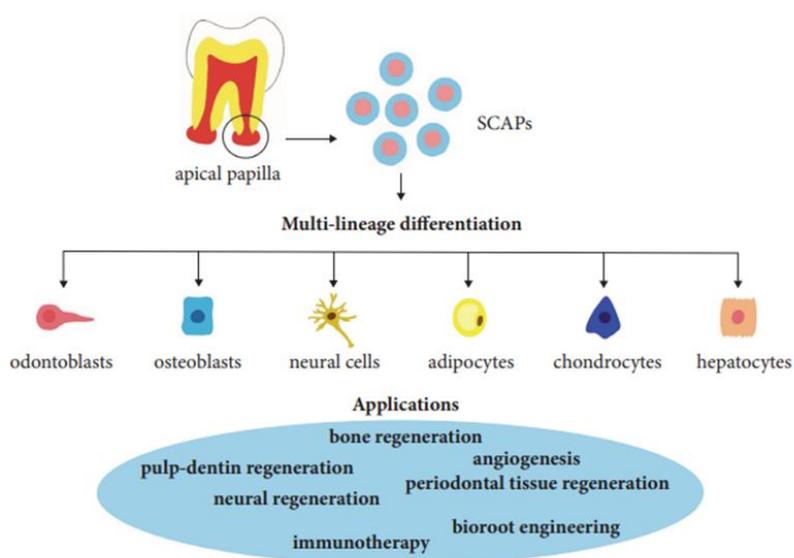


Figura 9: capacidad de diferenciación multilínea y aplicaciones potenciales de SCAP (Kang et. al., 2019)

4.3.2. Historia de la mucosa oral artificial

Inicialmente, el concepto de mucosa oral artificial tuvo sus inicios en el año 1975 cuando Rheinwald y Green describieron un método para cultivar láminas de tejido epitelial *in vitro* utilizando como células cebadas una capa de fibroblastos de ratón. Con un medio de cultivo que tenía suero fetal bovino y factores de crecimiento celular, consiguiendo así la primera línea de queratinocitos (Sears et. al., 2016). El epitelio humano autólogo obtenido mediante cultivo ha sido usado con éxito desde 1980 como cobertura permanente de grandes

defectos, años después en 1990, De Luca et. al., utilizaron mucosa oral, obtenida mediante cultivo de queratinocitos procedentes del paladar, para el tratamiento de defectos gingivales de origen periodontal (Sears et. al., 2016).

En cuanto a la replicación de una mucosa oral artificial es posible desarrollar un protocolo mediante la extracción de fibroblastos, obtenidos a partir de prepucios humanos. Estas muestras se fragmentan mecánicamente y posteriormente son sometidas a un proceso de digestión enzimática de T/E (Tripsina/EDTA) a baja agitación mecánica, cada 30 minutos se sustituyó la T/E utilizada por otra fresca y se centrifugaron durante 10 minutos a 1.400 rpm con el fin de recuperar las células obtenidas de la muestra. Se procede a la siembra celular a una densidad de 100.000 cel. /cm² en un medio de cultivo para fibroblastos. Cuando las células de este cultivo son confluentes se lava el frasco de cultivo 2 veces con T/E, tras lo cual se incuba a 37° C con T/E hasta que las células se despegaron del mismo. Se recuperan las células y se siembran en otros frascos de cultivo a una densidad de entre 5.000 y 10.000 células/cm² (Sears et. al., 2016).

Los fibroblastos se mantienen mediante cultivos sucesivos o bien se congelaron en medio de congelación de fibroblastos para posteriores usos. Para la preparación del gel de colágeno y fibroblastos se utilizan 0,8 ml de solución de colágeno con 0,1 ml de NaOH y 0,1 ml de Ham-F12 10X. A esta solución se añade los fibroblastos a una concentración aproximada de entre 30.000 a 50.000 celula/ml. Para una placa de 25 cm² se utilizaron 5 ml de gel. El material obtenido por cultivo según la técnica previamente descrita se estudia histológicamente mediante fijación en formol al 10% y tinción con hematoxilina- eosina (Sears et. al., 2016).

Para la obtención de queratinocitos, se obtienen muestras del paladar, el procesamiento de las muestras, se realiza en las 4 horas siguientes a su recogida. Se dividen mecánicamente hasta obtener fragmentos del menor tamaño posible. El material resultante se somete a un proceso de digestión enzimática en 4 ml de Tripsina/EDTA (T/E) durante 30 minutos a 37° C y bajo agitación suave. Se recoge el sobrenadante, que es centrifugado durante 10 minutos a 1400 rpm, de manera que las células suspendidas en el líquido se depositaran en el fondo del tubo de ensayo. El pellet resultante se diluye en 0,5 ml de medio de cultivo para contar las células obtenidas. Las células obtenidas se cultivan, a una densidad de entre 5.000 y 12.000 cel/cm² en placas de cultivo celular en presencia de fibroblastos de ratón, letalmente irradiados. Este medio se cambia cada 3 días. A partir del primer cambio, se le añaden al medio EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico). Los cultivos se mantienen en estufa con una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ a 37°C (Sears et al., 2016).

4.4. Bioimpresión 3D

La bioimpresión 3D fue introducida por primera vez por Thomas Boland en 2003; quien patentó el uso de la impresión 3D de inyección de tinta para células, es decir la bioimpresión permite la fabricación de construcciones de tejido en 3D, mediante un posicionamiento preciso capa por capa de materiales biológicos y células vivas, que se denominan a su vez biotinta, estas tecnologías pueden controlar el tamaño, la forma, la distribución y la interconectividad de los poros en la fabricación de estos andamios (Rodríguez-Salvador et. al., 2018).

Al momento de hablar de bio impresión, debemos tener claro ciertos términos los cuales no van a indicar el tipo de procedimiento a realizar, por lo tanto una de los primeros y

más importantes es el término bioenlace, que se refiere originalmente al componente celular que se colocaba en tres dimensiones (3D) sobre o dentro de los hidrogeles, en el método de extrusión, el desafío clave, es que la tinta debe dispensar a través de una boquilla estrecha, lo que a menudo se logra aprovechando el comportamiento después de la deposición, logrando que el objeto 3D impreso sea estable. Por lo tanto, la viscosidad del material debe aumentar rápidamente después de salir de la boquilla, que normalmente está soportada por reticulación posterior a la impresión (Groll et al., 2018).

4.4.1. Biotintas o bioink

El término “bioink” o Biotinta, fue descrito por primera vez en el 2003, con el fin de generar una impresión a la cual se pudieran incorporar células. Dentro de este concepto, es importante comprender y entender la diferencia además de las diferentes terminologías que se han abordado últimamente de los cuales podemos resaltar Bioenlace y Biomaterial (et. al., 2019).

Un Bioenlace es un tipo de material biológico, el cual tiene como función brindar apoyo al crecimiento de las poblaciones celulares, mediante la simulación de una matriz extracelular y factores de crecimiento. Además, brindar una función y estabilidad mecánica a la bio tinta, mediante señales bioquímicas y eléctricas, a diferencia de un biomaterial este puede contener un componente celular. Un Biomaterial será todo aquel que se encuentre dentro de la bio tinta, pero que no contenga ningún componente celular, ayudando a la incorporación de los diferentes materiales dentro de la bio tinta como complemento y en función de esta. Figura 10 (Groll et. al., 2019).

Figura 9. Distinción entre un bioenlace y biotinta

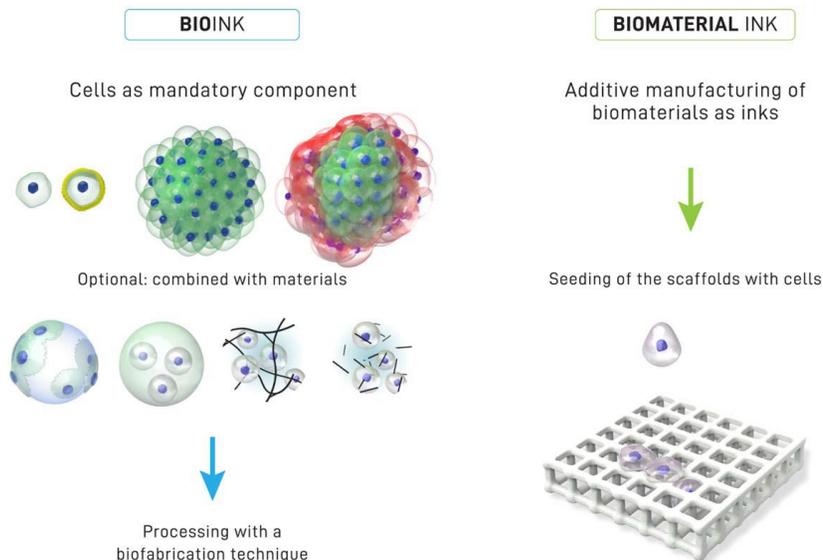


Figura 9: Distinción entre un bioenlace (lado izquierdo), donde las células son un componente obligatorio de la formulación de impresión en forma de células individuales, células recubiertas y agregados de células y una tinta de biomaterial (lado derecho), donde se usa un biomaterial para imprimir y el contacto celular ocurre después de la fabricación. Tomado de (Groll et. al., 2019).

Una biotinta ideal, debe permitir la generación de construcciones tisulares robustas que conserven la adaptación tisular sincronizada, la gelificación y estabilización para lograr una estructura con alta fidelidad, es importante que sea biocompatible y biodegradable, que tenga la idoneidad para realizarle modificaciones químicas específicas de los tejidos y por último, que tenga el potencial de producción a gran escala con variaciones mínimas de un lote a otro, esto gracias a que se conserven sus características mecánicas, reológicas, químicas y biológicas adecuadas (Gungor-Ozkerim et al., 2018).

Dentro de las propiedades que deben poseer estos materiales se encuentra el límite elástico y la respuesta de adelgazamiento que permiten que la biotinta pase a través de la boquilla con baja resistencia, otra de estas propiedades es la viscoelástica que le permita a la

biotinta fidelidad cuando se recupere la elasticidad y evitar el colapso de la impresión húmeda (Wang et. al., 2020).

4.4.2. Bioenlaces o biomateriales

Groll et al., (2018), los define como “una formulación de células aptas para el procesamiento por una tecnología de bio fabricación automatizada, que también puede contener componentes biológicamente activos y biomateriales”. Estos, pueden incluir células en diferentes entornos y formas, tales como: células individuales, células agregadas en esferoides, bastones celulares, células organizadas en minitejidos u organoides, células recubiertas por una capa delgada de material, células sembradas en microportadores o encapsuladas en coloidales a medida. Además, los bioenlaces pueden o no contener, moléculas bioactivas como factores de crecimiento, ADN, ARN, citocinas, exosomas o también biomateriales (Groll et al., 2018).

De igual manera, se proponen que los bioenlaces se definen como, una formulación de células aptas para ser procesadas por un sistema automatizado de tecnología de biofabricación, que también puede contener componentes biológicos activos, biomateriales y que al mismo tiempo se pueda dividir en 4 tipos, entre los cuales encontramos (Groll et al., 2018).

4.4.3. Bio-enlaces de apoyo

Son materiales diseñados para apoyar las poblaciones de células mientras se van multiplicando y actuar como una matriz extracelular artificial (Groll et. al., 2018).

4.4.3.1. *Bio-enlaces fugitivos*

Son de sacrificio o temporales y son materiales que se pueden quitar rápidamente para formar huecos o canales internos dentro de una construcción impresa (Groll et. al., 2018).

4.4.3.2. *Bio-enlaces estructurales*

Estos se utilizan para proporcionar integridad a las estructuras impresas y también puede ser fugitivo, pero en una escala de tiempo que puede llegar a extenderse, como es el caso de los termoplásticos como policaprolactona (Groll et. al., 2018).

4.4.3.3. *Bio-enlaces funcionales*

Cuando se requiere influir en el comportamiento celular, después de que se ha impreso la estructura se utilizan estos bioenlaces, los cuales proporcionan señales bioquímicas, mecánicas o eléctricas (Groll et. al., 2018).

Al igual que en otros artículos recientes, esta clasificación de cuatro clases de bio-enlace ha sido impulsada por el papel de los materiales constituyentes en la función final de una construcción impresa, más que por el procedimiento de fabricación en sí. A menudo, se afirma en la literatura que los hidrogeles son los bio-enlaces más utilizados, ejemplos de esto incluyen, híbridos de péptido-polímero diseñados e hidrogeles a base de proteínas de seda de araña (Groll et. al., 2018).

Los bio-enlaces, también pueden contener micro portadores que pueden ser sembrados con células nanopartículas, que a su vez son capaces de servir para la liberación de fármacos o

para mejorar las propiedades mecánicas, por otro lado, los materiales que pueden imprimirse y disolverse posteriormente de manera que no afecte la supervivencia de las células vivas no son bio-enlaces, sino tintas de biomateriales, entre las que se encuentran, los polímeros termoplásticos como policaprolactona degradable, o el polipropileno es no biodegradable al igual que las polioxazolinás, estas además son termo-sensibles, biopolímeros como gelatina, materiales inorgánicos como cementos, lechadas y metales (Groll et. al., 2018).

4.4.3.4. *Bio-enlaces a base de hidrogel*

Los hidrogeles tienen numerosas características atractivas para su uso como andamios de tejidos, son biocompatibles y biodegradables, Gungor-Ozkerin, (2018) enumera algunos bioenlaces, entre estos se encuentra el alginato, gelatina, colágeno, fibrina / fibrinógeno, goma gellan, ácido hialurónico (HA), agarosa, quitosano, seda, matriz extracelular descelularizada (dECM), poli (etilenglicol) (PEG) y Pluronic (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

4.4.3.5. *Bioenlaces a base de proteínas*

En el caso del colágeno, este posee propiedades fisicoquímicas que se adaptan al tejido y poseen biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*, este se ha usado con queratinocitos y fibroblastos en la construcción de tejido cutáneo 3D multicapa, de igual manera se ha mezclado con agarosa, donde apoyó la propagación de las células después de la impresión y con alginato para ser usado como un bioenlace compuesto, logrando mostrar que el potencial osteogénico del bioenlace colágeno-alginato era mayor al del alginato solo (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

Por otro lado, la gelatina derivada de huesos, tendones o pieles de animales por hidrólisis ácida o básica, siendo este un bioenlace biocompatible, biodegradable y con baja antigenicidad, mezclada con alginato, muestra menor resistencia mecánica, sin embargo ayuda a mantener las formas de las estructuras bioimpresas y se demostró que esta mezcla permite el crecimiento celular. El alginato también se ha mezclado con fibrina siendo un material biocompatible, biodegradable y no inmunogénicos, capaz de inducir la unión celular y una mejor respuesta celular, mientras que el alginato permite una bioimpresión perfecta (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

4.4.3.6. *Polisacáridos*

Entre estos, se encuentra el ácido algínico o alginato, similar a los glicosaminoglicanos, refinado a partir de algas marrones, cuya gelación rápida permite buena capacidad de impresión. Pero, si las concentraciones son superiores de 1 a 3% (p/v) pueden resultar en una menor viabilidad celular, algo que se ha podido mejorar al utilizar alginato de mayor viscosidad, capaz de generar gotas o esfenoides más pequeñas y así mejorar la estructura impresa, logrando una fórmula exacta entre la concentración de alginato y al mismo tiempo un aumento en la viabilidad celular (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

Por otro lado, puede incluirse, la goma gellan como un polisacárido aniónico hidrófilo producido por bacterias, que funciona como un agente gelificante y estabilizador, el cual ha sido combinado con gelatina de metacrililo (GelMA), mostrando mejoras en la viscosidad y así mismo en la imprimibilidad de la biotinta, sin que se llegue a afectar la supervivencia de las células. A su vez el ácido hialurónico, por sus propiedades reológicas y de alta viscosidad

se ha usado para construir tejido óseo y cartilaginoso, mezclado con hidrogel de colágeno tipo I, mostrando una viabilidad celular del 90% (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

4.4.3.7. *Bioenlaces basados en dECM*

Son bioenlaces de matriz extracelular descelularizada (dECM), en donde se eliminan los componentes celulares de los tejidos y órganos para imitar entornos naturales específicos de varios tipos de tejidos, logrando la supervivencia celular, la expresión genética de las células y la formación de la matriz extracelular utilizando estructuras de tejido adiposo, corazón y cartílago descelularizado bioimpresas. Entre estas, se ha utilizado en cultivos celulares y tejidos Matrigel, que se ha mezclado con alginato para mejorar la capacidad de impresión en estudios de vascularización o para crear una superficie en donde se logre la siembra de células posterior a la impresión (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

4.4.3.8. *Bioenlaces de polímero sintético*

El Polietilenglicol (PEG), es un polímero sintetizado por polimerización con óxido de etileno, facilita los procesos de bioimpresión. No obstante, las células no pueden adherirse fácilmente por lo que se combina con otros hidrogeles para optimizar las propiedades de la biotinta. Es así, como se describió la modificación de PEG con grupos reactivos (X), dando paso a procesos de bioimpresión de PEGX-PEG, PEGX con gelatina, con gelatina-fibrinógeno y con gelatina-atelocolágeno (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

Otros copolímeros sintéticos, son los poloxámeros de bloque de PEG y propilenglicol que posterior a evaluar sus propiedades reológicas, mostraron viabilidad celular entre las muestras de alto y bajo cizallamiento o tensión de corte durante la bioimpresión. Por otro

lado, el Pluronic genera estructuras de sacrificio o temporales con buena imprimibilidad y gelificación, que al combinarse con varios polímeros muestra aumento significativo en la viabilidad celular de los condrocitos (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

A nivel comercial, es posible encontrar algunos bioenlaces recientes como Dermamatrix®, un biomaterial natural derivado de la piel humana es decir dermis acelular, utilizado como papel biológico en bioimpresión. El NovoGel®, es un material inerte que funciona como barras de agarosa en el proceso de la impresión. El CELLINK®, compuesto por GelMA, alginato y nanofibrillas de celulosa altamente hidratadas, calcio y fósforo, que permite una alta tasa de viabilidad durante el período de cultivo (Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

4.4.3.9. *Bioenlaces de biopolímero*

La celulosa un homopolímero de cadena lineal compuesto de anhidro-anhidro repetido D-glucosa, definida por Wang et. al., en el 2020, como “el diámetro de los productos de fibrillas resultantes en una nanoescala de una dimensión”. Es un componente de la pared de los vegetales y puede ser derivada de bacterias. Por su parte, Teyeb et.al., clasifico la celulosa en tres tipos de nanomateriales: nanocristales de celulosa (CNC) que se obtiene seguida de un tratamiento de hidrolizado donde se obtienen las regiones cristalinas contenidas en las fibras y la nanocelulosa bacteriana (BNC), preparado por medio de la biosíntesis de celulosa en un cultivo microbiano con ayuda de una fermentación oxidativa y la nanofibrillas de celulosa (CNF), que contienen regiones cristalinas y no cristalinas (Tayeb et. al., 2018; Wang et. al., 2020).

La nula toxicidad y su alta biocompatibilidad son dos de las principales características de la nanocelulosa, que la hace útil en aplicaciones biomédicas, entre estas propiedades están las fuertes propiedades mecánicas, la naturaleza renovable, amplia capacidad de modificaciones químicas, excelentes propiedades de adhesión entre fibras de celulosa haciendo que el CNF sea un excelente material aglutinante para aplicaciones de nanocompuestos (Wang et. al., 2020).

4.4.3.9.1. *Biotinta nanocelulosa*

La nanocelulosa se ha surgido como una biotinta útil en la bioimpresión 3D, gracias a su similitud estructural con las matrices extracelulares, su excelente biocompatibilidad para apoyar actividades celulares cruciales por su nula citotoxicidad. La nanocelulosa se refiere a nanomateriales de tres tipos: nanocelulosa bacteriana (BNC), nanofibrillas de celulosa (CNF) y nanocristales de celulosa (CNC) (Wang et. al., 2020)

La nanocelulosa bacteriana fue descubierta por primera vez en 1886 por AJ Brown, es sintetizada en un cultivo de glucosa y xilosa por bacterias como *Acetobacter xylinum* y *Gluconacetabacter xylinus*, produciendo estructuras similares a la celulosa vegetal con una alta pureza, adecuadas propiedades mecánicas y de flexibilidad, que la convierten en un biomaterial exitoso en aplicaciones de ingeniería de tejidos en la fabricación de vendajes para heridas, piel, implantes vasculares y de cartílago. No obstante, el proceso, el alto costo de la glucosa y su cultivo dificultoso restringen la producción de este tipo de nanocelulosa (Wang et. al., 2020).

Las nanofibrillas de celulosa, biomaterial imprimible biomimético a base de agua, con fibrillas con diámetros de 5 a 60 nm y longitudes de aproximadamente hasta un

micrómetro que proporcionan la elasticidad y la fuerza necesarias para reemplazar el colágeno natural, esta nanocelulosa es producida a partir de biomásas como la pulpa de madera, con la adición preferible de un componente reticulante y ha tenido aplicaciones en cultivo celular, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa dispositivos cosméticos, farmacéuticos y biomédicos. Mientras que, los nanocristales de celulosa se preparan mediante la digestión de los materiales celulósicos en ácidos fuertes como el ácido sulfúrico, para hidrolizar la región amorfa de las microfibrillas de celulosa, estos tienen algunas aplicaciones médicas (Wang et. al., 2020).

4.4.4. Métodos de bio-impresión

Las principales tecnologías utilizadas para la bioimpresión 3D de materiales vivos y biológicos son la inyección de tinta, la impresión asistida por láser y la microextrusión, que se muestran en la figura 10. Se deben contemplar diferentes especificaciones y características de los mismos en función de los factores más importantes que afectan a la bioimpresión que son la resolución, la viabilidad celular y los materiales utilizados para la impresión (Gungor-Ozkerim, et. al., 2018).

Figura 10. Representación esquemática de las principales tecnologías de bioimpresión 3D

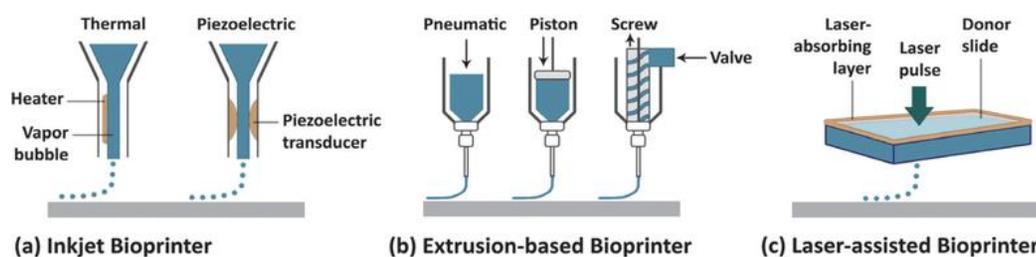


Figura 10: (a) Bioimpresión por inyección de tinta / gotitas. (b) Bioimpresión basada en extrusión. (c) Bioimpresión asistida por láser. Tomado de (Gungor-Ozkerim, et. al., 2018).

4.4.4.1. *Biompresión 3D de inyección de tinta*

Este método funciona mediante impresoras térmicas que calientan eléctricamente el cabezal de impresión entre 200°C y 300°C, para producir pulsos de presión de gotas de tinta entre 1 y 100 pico-litros en volumen sobre el sustrato con una alta resolución. Todas las gotas son esféricas y similares con un material o tinta líquida de baja viscosidad, generadas bien sea por mecanismos térmicos o piezoeléctrico (Bertan et. al., 2020).

En los mecanismos térmicos, se aumenta la temperatura hasta 300°C y se produce una burbuja que expulsa la gota o el método de piezoeléctricos que aplican un pulso mecánico entre 15-25 kHz, se expulsa la gota (Figura 12). Dentro de las ventajas de este método de impresión 3D incluye la alta velocidad de impresión, tiene la capacidad de controlar el tamaño uniforme de la gota y su adecuada disponibilidad. Además, las altas tensiones térmicas y mecánicas exponen la viabilidad celular. (Bertana et. al., 2020; Murphy et. al., 2014).

Figura 11. Esquema de tecnologías basadas en inyección de tinta

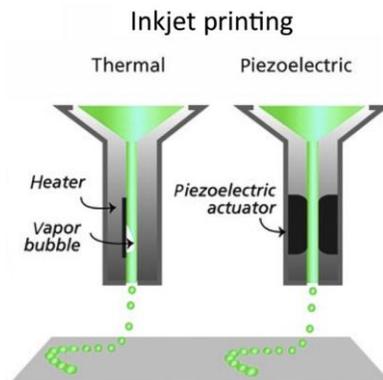


Figura 11: Mecanismo de inyección de tinta térmica y piezoeléctrica.

4.4.4.2. *Bioimpresión 3D por μ -extrusión*

Es un sistema de dispensación por presión de aire o desplazamiento del pistón de la jeringa que genera tensión dentro de la boquilla en el cabezal de la impresora donde esta

queda en contacto con el sustrato, aquí se ubican hebras continuas de hidrogel o polímero blando cargado de células a través de la microboquilla desde un cabezal móvil que se mueve en eje XY para dar la geometría 2D y en eje Z para definir la altura del objeto. A su vez, este método se puede emplear con diferentes sistemas: de base neumática, de base mecánica o de base magnética (Bertana et. al., 2020; Wang et. al., 2020).

En el caso de la base neumática, a la jeringa se le aplica presión de aire (Figura 11A), está cargada con el material a extruir a través de una micro-aguja, este sistema es útil para hidrogeles. La extrusión mecánica, usa un pistón o un tornillo para generar mayor presión a lo largo de la micro-aguja, expulsando materiales más viscosos (Figura 11B). El sistema de base magnética consiste en que un anillo magnético y un imán flotante se colocan en la jeringa que a su vez tiene envuelta una bobina, generando así una corriente que hace que el imán flote y se separe de la salida de la jeringa, lo que a su vez permite la salida del material con la ayuda de la presión (Figura 11C) (Bertana et. al., 2020; Murphy et. al., 2014).

Figura 12. Sistema de bio-impresión basadas en extrusión

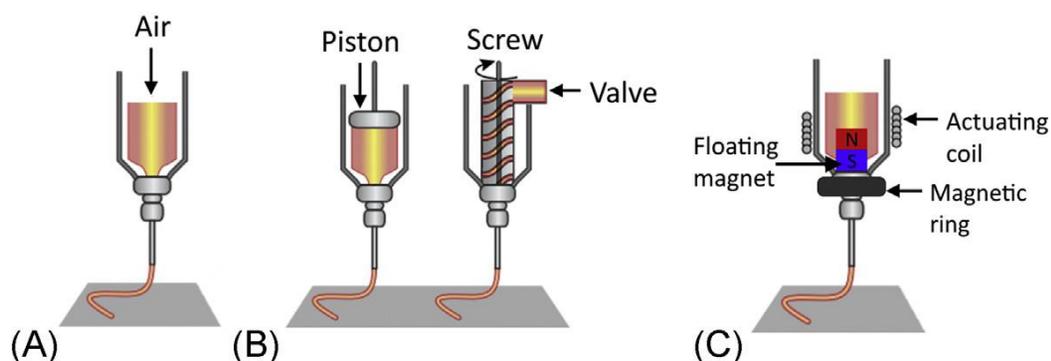


Figura 12: (A) μ -extrusión neumática (B) μ -extrusión mecánica y (C) μ -extrusión magnética. Tomado de (Bertana, y otros, 2020).

4.4.4.3. *Bioimpresión asistida por láser*

Este método descrito por Murphy et. al., en el 2014, “funciona utilizando pulsos de láser enfocados en la capa absorbente de la cinta para generar una burbuja de alta presión que impulsa los materiales que contienen células hacia el sustrato colector”, lo que permite la deposición precisa de materiales y altas densidades de células sin que se afecte la viabilidad de las mismas. La viscosidad puede variar entre 1–300 mPa / s (Centipoise por segundo), depositando hasta 108 células / ml con una repetición de pulso láser de 5kHz con velocidad de hasta 1.600mm / s (Murphy & Atala, 2014).

Las tintas utilizadas son una combinación de monómeros, oligómeros, foto-iniciadores y estabilizadores, en donde el foto-iniciador se rompe en radicales libres para iniciar el proceso de polimerización y los estabilizadores ayudan a limitar la polimerización, esto lo hacen por medio de foto-absorción reduciendo así la propagación de luz dentro de la tinta y mejorando la precisión en la impresión, sin que esto afecte la viabilidad celular. Los métodos de este mecanismo de bio-impresión son estereolitografía (SL), procesamiento de luz digital (DLP) que se basan en fuentes de luz UV (λ_{UV}) o visibles y el método de estereolitografía de dos fotones (2PP), que consiste en una fuente de luz, no es un láser sino una lámpara de vapor de mercurio (Bertana et. al., 2020).

5. Metodología

5.1. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

<i>Variable</i>	<i>Definición</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Como se analiza/mide</i>
<i>Proliferación celular</i>	Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular	Cuantitativa	Análisis WST-1, Live-Dead y PCNA
<i>Morfología celular</i>	Identifica la forma, estructura y tamaño de las células	Cualitativa	Hematoxilina & eosina
<i>Ensayo de viabilidad celular</i>	Proporción de células vivas luego del procedimiento.	Cuantitativa	WST1 y Live-Dead
<i>Tiempo</i>	Magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos, estableciendo un pasado, un presente y un futuro.	Cuantitativa	Días 1, 7 y 14
<i>Protocolo de bioimpresión</i>	Es una metodología que usa un software de diseño asistido por computadora para producir modelos físicos en 3D.	Cualitativa	Análisis de hematoxilina & eosina

5.2. Tipo de estudio: experimental *in vitro*

Descripción del procedimiento:

Se tomó la muestra de células madre de la papila apical de molares 18 y 28, que se extrajeron por motivos ortodóntico, y se procesó las muestras de papila apical para obtención de células madre, se cultivaron y se realizó bioimpresión en 3D de scaffold utilizando celulosa nanofibrilar en tamaños de 1cm x 1cm junto con las células madre de origen dental, y se evaluaron las muestras a los días 1, 7, 14, con el fin de evaluar el potencial de proliferación en la biotinta.

Se crearon diferentes grupos para el proceso de experimentación:

Grupo 1 control: Constructo de nanocelulosa impreso sin componente celular

Grupo 2: Constructo de nanocelulosa bioimpreso con células madre de la papila apical

A partir de este grupo separamos diferentes porciones del constructo para los diferentes análisis (hematoxilina.eosina, Live.Dead y WST-1).

5.3. Obtención de células

5.3.1. Obtención de células de Papila Apical Humana

- Población: Paciente de 14 años de edad de género masculino, sometido a exodoncias indicadas de terceros molares 18 y 28 por motivos ortodónticos, dientes en estadio Nolla 8 vistos radiográficamente (*Figura 13*) el procedimiento fue realizado el día 8 de febrero del 2022 en las clínicas odontológicas de la Universidad Antonio Nariño, y previamente tanto el paciente como su acudiente dieron su consentimiento informado por escrito para la realización del procedimiento y toma de muestras para el estudio.

Figura 13 Radiografía panorámica



Figura 13: Radiografía panorámica de paciente de donde se tomó las muestras de la papila apical dientes 18 y 28 Estadio de Nolla 8.

- Muestreo: no aplica
- Muestra: Células madre de la papila apical obtenidas de un paciente que se sometieron a exodoncia de terceros molares con previo consentimiento informado firmado por su acudiente.

La cirugía de exodoncia método abierto de diente 18 y 28, se realizó iniciando asepsia y antisepsia del paciente y del campo operatorio, se infiltró con lidocaína al 2% de forma infiltrativa nervio alveolares posteriores y se realizó refuerzo en palatino mayor, se procedió a realizar incisión crestal en diente 18 y 28 con su respectivas relajantes para levantar el colgajo a espesor total, se hizo osteotomía hasta que se ubicaron las coronas dentales, y se realizó luxación de los molares, una vez estaban luxados se alisto en un tubo

estéril de transporte. Posterior a esto se extrajeron los molares y se verificó la integridad de la papila apical, se tomaron los molares por parte de la corona y fueron almacenados en el medio de transporte Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Lonza) suplementado con 30 ml de antibiótico (Sigma), a continuación, se llevó al laboratorio en donde se realizó el cultivo celular por medio de técnica de explante, todos los procedimientos de laboratorio fueron realizados por un investigador calificado en cultivo celular (Al Habib & Huang, 2019).

Criterios de inclusión:

- Paciente mayor de 12 años de edad, sano sistémicamente, dientes permanentes, indicación de exodoncia de terceros molares o premolares por motivos ortodónticos, consentimiento informado y participación en el estudio
- Diente en estadio Nolla 7 u 8, que su indicación sea exodoncia por motivos ortodónticos, que no tenga selle apical, y no esté erupcionado.
- Células madre de la papila apical con viabilidad celular mayor al 70%, Células del cuarto pase.

Criterios de exclusión:

- Paciente menor de 12 años y mayor de 21 años, con compromiso sistémico de base (cáncer, diabetes, hipertensión arterial) que se encuentre tratamiento médico o tomando en algún medicamento, mujeres que se encuentren en estado de embarazo, que no desee participar en el estudio.
- Diente en estadio Nolla menor a 7, que tenga selle apical, que se encuentre erupcionado, presencia de caries o enfermedad periodontal, dientes temporales.

- Células madre que no sean de origen de la papila apical o células que estén contaminadas, y no presenten viabilidad celular significativa.

5.3.2. Procedimiento cultivo celular de células madre de la papila apical

Una vez realizado el procedimiento quirúrgico las muestras se almacenaron en medio enriquecido de transporte Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Lonza) suplementado con 30 ml de antibiótico (Sigma), y se procedió en el laboratorio hacer el cultivo celular por técnica de explante con el siguiente protocolo. Se depositaron las muestras en una caja Petri se lavaron las muestras de papila apical se lavaron con solución salina buffer fosfato (PBS) marca (BG&M) (*Figura 14*) se tomó cada molar de la corona y con ayuda de la hoja de bisturí se retiró toda la papila apical que se encontraba adherida a la parte apical de la raíz dental, y se colocó en la caja Petri desechando los molares.

Figura 14 Molar post-exodoncia con muestra de la papila apical

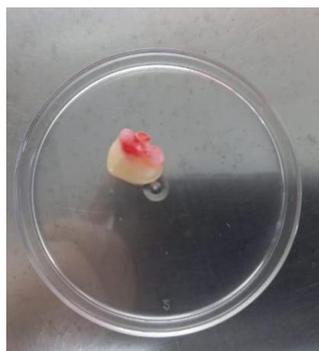


Figura 14: Molar con muestra de papila apical en la caja de cultivo Petri, posterior a ser lavado con solución salina buffer fosfato (PBS) marca (BG&M), listo para retirar la papila apical.

Las muestras de papila apical se lavaron con solución salina buffer fosfato (PBS) marca (BG&M), fueron cortadas en trozos de 1 mm aproximadamente con un bisturí (*Figura 15*) y posteriormente los trozos se ubicaron en el frasco de cultivo de 25 ml con una espátula para cultivo celular. Se esperó a que los trozos se adhirieran a la superficie del frasco aproximadamente de 2 a 4 minutos. Una vez verificada la adhesión de los trozos a la superficie se le agrego suavemente medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado (5ml de antibiótico, 50ml de suero bovino fetal y 5ml de glutamina), se esperó el crecimiento celular y se realizaron 4 pases, para tener el número deseado de células madre de la papila apical (*Figura 16*).

Figura 15 Trozos de papila apical

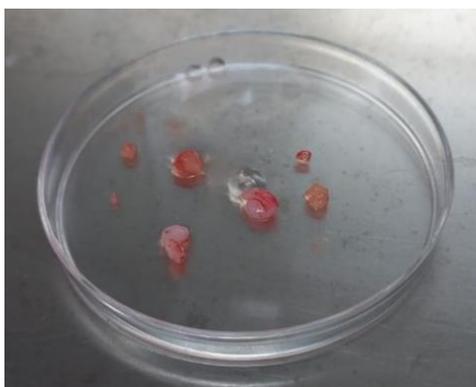


Figura 15. Muestra de papila apical en la caja de cultivo Petri troceadas en tamaños de 1mm, posterior a ser lavado con solución salina buffer fosfato (PBS) marca (BG&M), listo para iniciar cultivo celular.

Figura 16 Cultivo de células madre de la papila apical

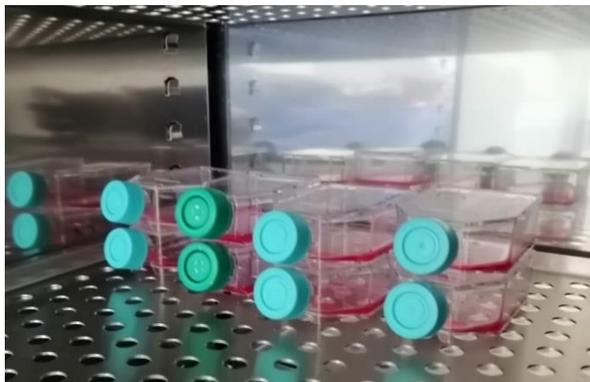


Figura 16: Cajas de cultivo celular de papila apical en caja de cultivo, posterior a realizar a 4 pases con medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado, listo para bioimpresión con celulosa nanocelular.

***PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN CELULAR MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA USANDO LOS ANTICUERPOS CD90 Y CD105***

5.3.3. Caracterización celular

Se realizó utilizando una prueba IHC Select® HRP/DAB (Chemicon, EE. UU.). Las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos a una densidad de siembra de 1×10^6 /ml. En los dos días siguientes, las células madre de la papila apical alcanzaron una confluencia del 80 % y se realizó la tinción. Las células se lavaron dos veces con DPBS y se fijaron con metanol frío durante 15 min a 4°C. Los sitios de unión no específicos de las células se bloquearon con suero de cabra durante 10 min. Se añadieron a las células anticuerpos primarios, con una relación de dilución optimizada de 1:500, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos principales que se usaron para teñir las células fueron anticuerpos monoclonales de inmunoglobulina CD105 (clon SN6, Abcam UK) y CD90 (Clon 5E10, BD Pharmingen, NJ). Se usaron fibroblastos como control negativo. Luego se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse al anticuerpo secundario

marcado con biotina durante 10 minutos de incubación adicional. Después de la adición de estreptavidina-HRP, las células se lavaron con tampón de lavado y se tiñeron con reactivo cromogénico para marcar las células que eran positivas para los marcadores mencionados anteriormente durante 10 min. Finalmente, las células se contratiñeron con solución de hematoxilina durante 1 min, se lavaron con tampón de lavado y se analizaron bajo un microscopio de contraste de fase invertido (Zeiss, Alemania). Todos los reactivos, excepto los anticuerpos primarios, se incluyeron en el kit (la prueba IHC Select® HRP/DAB).

5.3.4. Generación de scaffold mediante bioimpresión

Se realizó protocolo de modelo de tejido de bioimpresión usando una biotinta a base de nanocelulosa Cellink Skin® Suecia, realizando modificaciones al protocolo de la casa comercial. Se utilizó una impresora bioX (Cellink®), siguiendo los siguientes pasos:

Se seleccionó un diseño geométrico predeterminado incluido en la Bioimpresora ajustando los parámetros de corte al cabezal de impresión 1 con patrón de relleno rectilíneo, densidad de relleno 80%, 20 kPa (kilopascales) de presión en el extrusor, velocidad de impresión 10 mm/s y temperatura de 25 °C en la base de la cama. Se preparó la biotinta precalentando una jeringa de 3 ml con el contenido de nanocelulosa; posteriormente, se preparó la suspensión celular (previamente las células fueron despegadas de la superficie de cultivo celular mediante el proceso de tripsinización) mezclando 500.000 células por mililitro de biomaterial. Suavemente se agitó la suspensión de células madre de la papila apical con la nanocelulosa hasta lograr que los dos componentes se homogeneizaran. Posteriormente, se agregó la suspensión celular a las jeringas de 3ml y se mantuvo a 37°C. Una vez introducidas dentro de las jeringas se procedió a adicionarle 1 ml de medio de cultivo DMEM y nuevamente se mezcló suavemente hasta lograr una consistencia homogénea.

Luego se realizó el montaje de la bioimpresora confirmando los parámetros de bioimpresión: micro extrusión neumática y tipo y tamaño de la boquilla y cabezal de impresión. A continuación, se montó en el extrusor de la Bioimpresora la jeringa que contenía la nanocelulosa con células madre de la papila apical y medio de cultivo DMEM suplementado. Se inició la bioimpresión y se realizó la reticulación del constructo bioimpreso con trombina a una concentración de 100 U/ml, se sumergieron los constructos durante 5 minutos, se retiraron y se enjuagaron una vez con PBS. Finalmente, los constructos se llevaron a la incubadora a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Los análisis se realizaron en los días 1, 7 y 14, para identificar el potencial de proliferación celular.

Figura 17 Bioimpresión de celulosa fibrilar con células de la papila apical

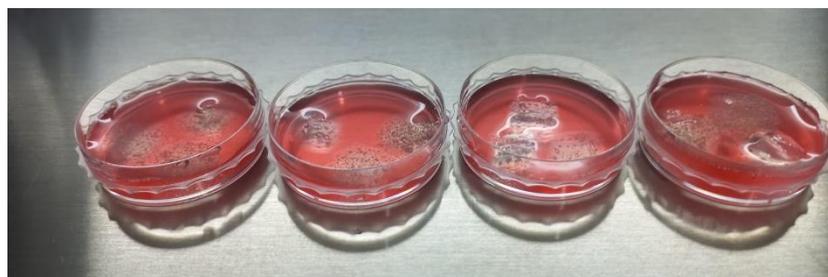


Figura 17: Cajas Petri con bioimpresión de celulosa nanofibrilar y células madre de origen de papila apical, con medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado, en día 0, para esperar proliferación celular. Se imprimieron 2 grupos de experimentación en cuatro cajas de Petri: Caja 1 constructo impreso sin células. Caja 2, 3 y 4 constructos impresos con células para ser analizados a 1, 7 y 14 días. para las diferentes pruebas de viabilidad y proliferación y grupos control.

5.3.5. *Ensayos de laboratorio*

Análisis histológico hematoxilina-eosina

Se sumergió el scaffold bio impreso en solución acuosa de formaldehído al 37% para lograr la fijación, luego se infiltró con parafina y se cortaron de 4 a 10 μ m, mediante el uso del micrótopo. A continuación, los cortes de la muestra se montaron en una lámina portaobjetos. Se realizó luego el proceso de desparafinado utilizando xileno y se realizó mediante dos inmersiones separadas de 5 minutos. La muestra se hidrató con alcohol y se sumergió en una solución de etanol y agua con un porcentaje decreciente de etanol (100%, 90% y 70%). A continuación, las secciones fueron lavadas en agua durante 1 min. Luego fueron teñidas con hematoxilina durante 5 minutos: fueron lavadas en agua de grifo para eliminar el exceso de tinte del portaobjetos. A continuación, fueron sumergidas en una solución de alcohol ácido (1% de ácido clorhídrico en etanol) para acentuar el contraste del colorante. Posteriormente, son enjuagadas en agua de grifo. A continuación, se hace la tinción eosina introduciendo las muestras en una solución de eosina durante 2 minutos, luego se enjuagaron con agua durante 30 segundos. Las secciones se sumergieron en una solución de etanol (70%, 90% y 100%) para eliminar el agua. Finalmente se aclararon las muestras en xileno 2 veces durante 10 minutos y se cubrieron con un cubreobjetos y un sellador. Los análisis fueron realizados en los días 1, 7 y 14, para identificar el potencial de proliferación celular y la disposición celular en el constructo

5.3.5.1. *Técnica WST1*

Es un ensayo colorimétrico, de viabilidad celular, el WST-1 se reduce únicamente fuera de la célula. Está basado en la reducción de la sal estable de tetrazolium, WST-1, (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) para formar una sal soluble de formazán. Este ensayo consistió en determinar la actividad metabólica mitocondrial y la proliferación celular, se utilizó este método durante 4 horas a 37 ° C. Cada muestra se analizó utilizando un lector de microplacas (Martin-Piedra, 2014).

En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad. Se homogenizó el medio celular de la placa con movimientos rotatorios suaves y se pudo obtener una mezcla regular en el medio de cultivo. Se incubó a 5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C durante 30 minutos. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad se aplicó 25 µl del reactivo WST-1 en cada uno de los pocillos. Se homogenizó el medio celular de la placa con movimientos rotatorios suaves a fin de que se pudo obtener una mezcla regular del reactivo WST-1 en el medio de cultivo. Se volvió a incubar a 5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C durante 3:30 horas. Se leyeron las muestras mediante un lector espectrofotométrico con filtro de 450 nm y se registraron los resultados de lectura obtenidos.

5.3.5.2. *Ensayo de viabilidad celular Live/Dead*

Este ensayo proporcionó la información sobre el estado funcional de la célula mediante la detección de la actividad de esterasa citoplasmática. El kit constó de dos colorantes fluorescentes. Calcein AM pasa a través de la membrana celular, cuando se hidroliza por esterasa citoplasmática (células vivas), la calceína AM mostró fluorescencia en una longitud de onda de emisión de 515 nm. El homodímero de etidio muestra fluorescencia

(longitud de onda de emisión de 617 nm) solo después de unirse al ADN. La fluorescencia roja apareció solo en las células en las que la membrana celular está alterada (células muertas). (Miguel Angel Martin-Piedra, 2014)

Después de que cultivadas las células se les aplicó trixina. Se hizo control positivo incubando las células a 56°C durante 45 minutos, luego deje que se enfríen a temperatura ambiente. Se centrifugaron las células a 350 xg durante cinco minutos y se eliminó suavemente el sobrenadante. Se lavaron dos veces las células con PBS a una concentración de 1×10^6 células/mL. Se agregó 1 uL de Fixable Dead Cell Stain a 1 mL de células y se mezcló. Se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Se lavaron una vez con 1 ml de PBS. Se agregaron los anticuerpos primarios a las células en PBS. Luego se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavó dos veces con 1 ml de PBS. Se fijaron las células en formaldehído al 2-4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron las células dos veces con 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS con albúmina de suero bovino al 1 %). Se suspendieron las células en 100 uL de PBS + Triton X-100 al 0,1 %. Se agregaron los anticuerpos primarios apropiados a las células en el tampón de permeabilización. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se analizó.

Las muestras se observaron mediante microscopía de barrido láser confocal (TCS SPE, CTR 6500, Leica, Wetzlar, Alemania). Se tomaron imágenes. El número de células vivas y muertas se contó a partir de tres imágenes por muestra. La viabilidad celular se informó como un porcentaje con la siguiente fórmula: $\# \text{ de células vivas} / \# \text{ total de células} \times 100$.

Las muestras se observaron mediante microscopía de barrido láser confocal (TCS SPE, CTR 6500, Leica, Wetzlar, Alemania). Se tomaron imágenes. El número de células vivas y muertas se contó a partir de tres imágenes por muestra. La viabilidad celular se informó como un porcentaje con la siguiente fórmula: el número de células vivas/número total de células.

5.3.5.3. PCNA

PCNA o ciclina es una proteína auxiliar de 36.000 de peso molecular de la ADN, una enzima vital para la replicación del ADN. La síntesis de esta proteína comienza en la última fase G1, que es el periodo del ciclo celular que iniciar desde que una célula nace hasta que comienza la fase S. Durante la fase G1 la célula comprueba las condiciones en las que se encuentra la célula y decide si continuar con el ciclo celular, detenerlo o abandonarlo. La síntesis de la PCNA alcanzó su punto máximo durante la fase S del ciclo celular, que es cuando la célula sintetizó una copia de todo su ADN (*Figura 18*), Foley et al., 1991.

Para la tinción positiva, las categorías de distribución celular fueron: tinción nuclear uniforme; tinción nuclear y citoplasmática difusa; tinción citoplasmática difusa. La intensidad de la tinción se calificó como 1+ (rosa claro), 2+ (rojo) o 3+ (rojo intenso a negro).

Figura 18 Esquema del ciclo celular

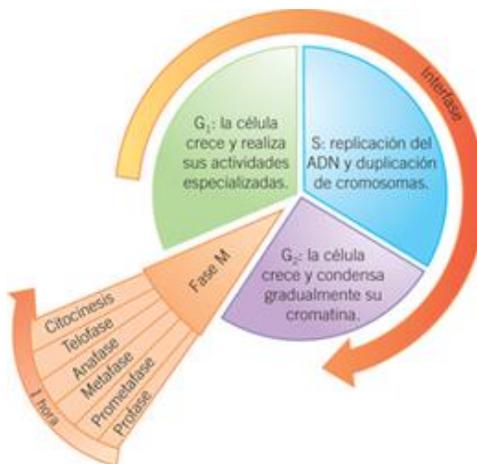


Figura 18: Esquema del ciclo celular. Tomado de Foley et al., 1991

Se verificó la confluencia y la morfología de las células, se enjuagan con PBS, se agregó 0,5 ml de formalina y se dejó reposar durante 10 min, luego se aspiró la formalina y se enjuagaron las células con 1 ml de PBS dos veces y luego se agregó 0,25 ml de metanol a las células, se dejó reposar durante 2 min y se aspiró el metanol para luego agregar 1 ml de PBS a las células y se dejó reposar durante 5 min. Se agregó 1 ml de H₂O₂ al 3 % a las células, se dejó reposar durante 5 min y se lavó el H₂O₂. Se agregó 125 ml Anti-PCNA/HRP ase. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 min y se agregó 1 ml de TBS a las células. Se dejó nuevamente reposar durante 5 min. Se agregaron 2-3 gotas de solución AEC a las células. Se dejó reposar durante 10 min. Se agregó 1 ml de NH₄OH 37 mM a las células. Se enjuagaron las células con 1 mL de agua 4-5 veces

5.3.6. Análisis de los datos:

Todo el análisis estadístico se realizó mediante el software de Real Statistics versión de R para Excel 2019. Para determinar las diferencias entre los tres tiempos valorados se

realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, luego de probar que no se cumplía con los parámetros de normalidad se aplica la prueba de Shapiro Wilks, y que los datos no tenían varianzas homogéneas mediante la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. Se analizó diagrama de Box Plot para distribución de los datos y la prueba Post Hoc de Nemenyi para observar diferencias entre los grupos.

5.4. Aspectos éticos

Según la resolución 8430 de 1993, en la cual se establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, el Artículo 11 clasifica la investigación como de riesgo mínimo, debido a que, en este estudio se utilizaron células de dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica (Resolución número 8430 de 1993, Ministerio de Salud, Colombia).

6. Resultados

6.1. Caracterización celular

Figura 19 Caracterización de células madre de la papila apical

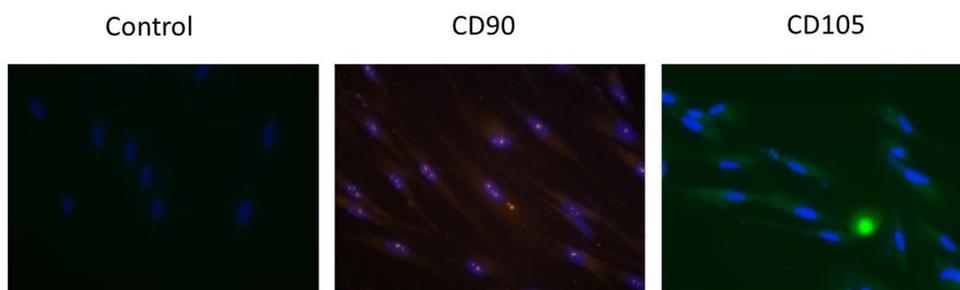


Figura 14: Caracterización de células madre de la papila apical mediante técnica DAPI. Se realizó prueba de control con fibroblastos que no tuvieron reacción positiva. Marcador CD90 positiva para células madre de la papila apical. Marcador CD105 positiva para células madre de la papila apical.

Se realizó la caracterización de células madre de la papila apical previo a la experimentación, para el control se utilizaron fibroblastos que no reaccionan a los anticuerpos, mientras que las células madre de la papila apical reaccionaron de forma positiva al CD90 y CD105, ya que se observa núcleos activos gracias a la tinción DAPI (Figura 14).

6.2. Análisis cualitativo

Figura 20 Ensayos cualitativos de células madre de la papila apical en celulosa nanofibrilar bioimpresa

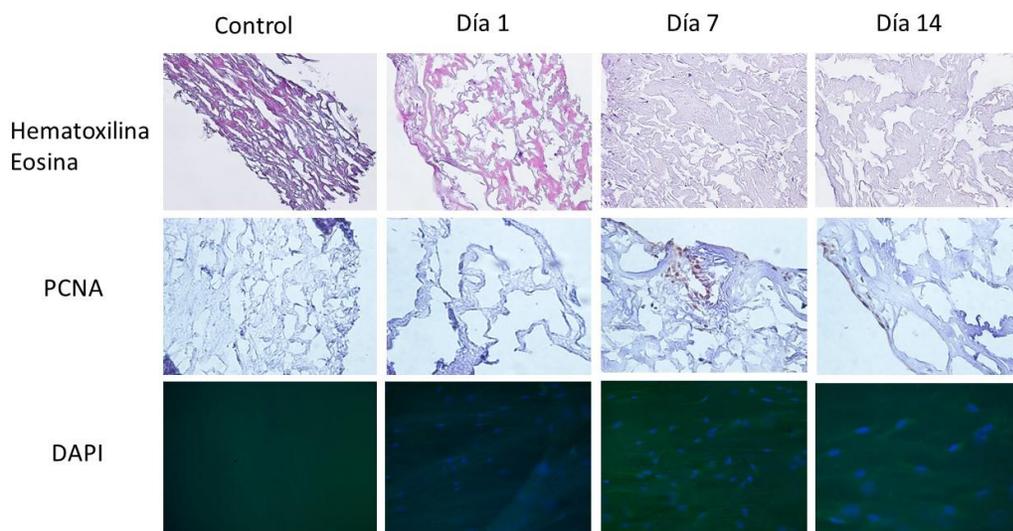


Figura 15: Ensayo cualitativo de células madre de la papila apical en celulosa nanofibrilar bioimpresa, Hematoxilina & eosina, PCNA y DAPI en el grupo control y en el día 1, 7 y 14. Hematoxilina & eosina, grupo control sin células se observa estructura organizada de la celulosa nanofibrilar. Día 1 Celulosa nanofibrilar desordenada y células distribuidas a través de la misma. Día 7, estructura homogénea de celulosa nanofibrilar y puntos violeta con morfología amorfa. Día 14, estructura fibrilar de la biotinta y células agrupadas. PCNA, estructura impresa. Día 1 celulosa nanofibrilar degradada por el proceso. Día 2 Adecuada bioimpresión y la celulosa nanofibrilar mantiene su estructura con aglomeración de células en proceso de división celular. Día 14 células en borde la de celulosa en actividad mitótica. DAPI, grupo control se observa nanocelulosa en verde. Día 1, día 7 y día 14 zonas azules alargadas que corresponden a células en estado mitótico.

Mediante análisis cualitativos la morfología de la estructura de la celulosa nanofibrilar posterior a la bioimpresión, se observó una estructura de la nanocelulosa organizada en la tinción de hematoxilina & eosina en el grupo de control sin adhesión de células. En el día 1 se observó leve alteración morfológica en la estructura y células

distribuidas a través de la misma como puntos de color violeta. En el día 7 se observó una estructura fibrilar organizada con una distribución de células activas mejor distribuidas a través del andamio celular. El día 14 con la membrana de celulosa nanofibrilar en proceso de descomposición se vio afectado la estructura fibrilar y se evidencia menor actividad celular. El ensayo PCNA que evaluó cualitativamente la proliferación se determinó el grupo control una estructura impresa de manera uniforme que no correspondió con el grupo del día 1 donde se evidencia destrucción en la estructura fibrilar. En el día 7 donde se observó impresión uniforme y estructurada de manera correcta se logró analizar células activas en proceso de mitosis o proliferación celular en un grupo de células madre de la papila apical que se encontraron aglomeradas. De igual manera, el día 14 donde se evidenció destrucción y una morfología sin definir de la estructura del bioenlace utilizado para la bioimpresión, con un grupo de células evidentemente más reducido pero con mitosis celular activa. El ensayo DAPI que busco definir si las células están el proliferación o no, mostro en el grupo control zona de color verde que corresponde a la celulosa nanofibrilar sin adición de células madre de la papila apical, en el día 1 se logró definir como las células identificadas por el color azul están en proceso de proliferación, al igual que en el día 7 y día 14 distribuidas por toda la estructura bioimpresa.

6.3. Viabilidad celular

La prueba de viabilidad celular fue realizada mediante la prueba de Live Dead en donde se realizaron cuatro conteos para cada uno de los días, en la tabla 2 se observa el promedio de los conteos y sus respectivas desviaciones estándar.

Figura 21 Ensayo Live- Dead en células madre de la papila apical

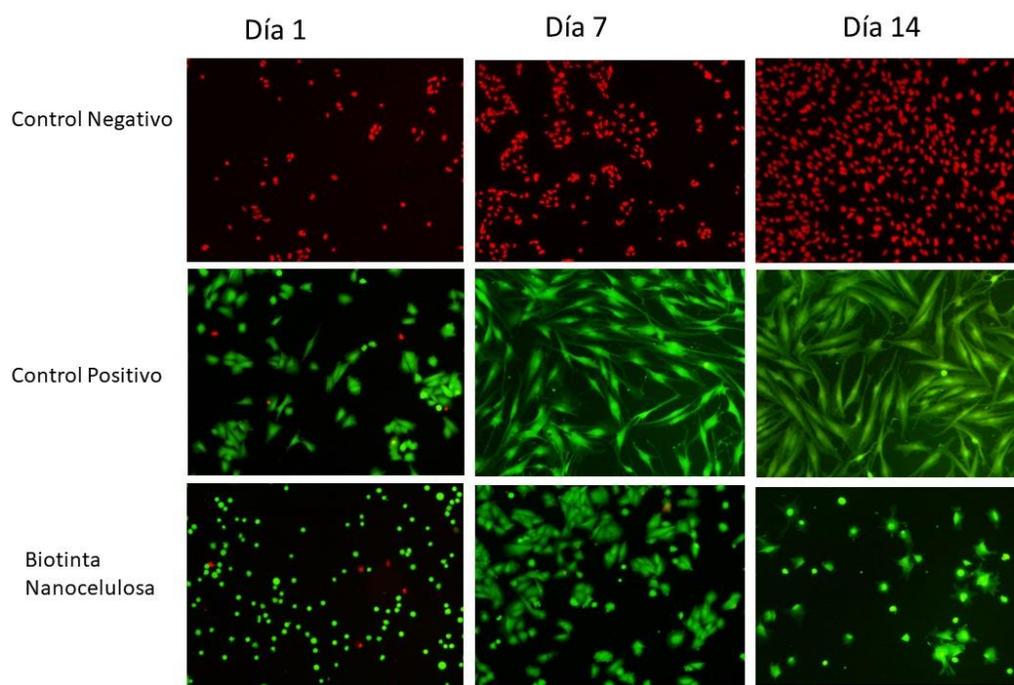


Figura 16: Ensayo Live-Dead en células madre de la papila apical grupo control, control positivo y el grupo de células impresas con celulosa nanofibrilar en los días 1, 7 y 14. En el grupo de control negativo se observa células de tinción roja que indican muerte celular. En el grupo de control positivo se observan células de tinción verde que corresponde a células con viabilidad positiva bajo condiciones de cultivo estándar, día 1 con morfología amorfa escasa proliferación, día 7 con proliferación aumentada y células alargadas distribuidas a través de toda la muestra, día 14 proliferación visiblemente aumentada, células alargadas y enlazadas por toda la muestra. Grupo biotinta celulosa nanofibrilar, se observa en el día 1 presencia de células vivas y algunas muertas, en el día 7 se observan células de tinción verde difuminadas que indica viabilidad positiva, día 14 limitado cantidad de células vivas y en estado de proliferación.

En la prueba Live- Dead donde se evaluó viabilidad celular, se evidencia el grupo control negativo en los días 1, 7 y 14 de color rojo que corresponde a las células muertas, posterior a la aplicación de tripsina para inducir la muerte celular. En el control positivo que

se realizó en cultivo bajo condiciones estándar, se evidencia en el día 1 pequeñas colonias que inician un proceso de proliferación que se ve aumentado en el día 7 y se continúa hasta el día 14 con morfología alargada de las células y tinción verde que indica viabilidad positiva. Por otro lado, en el grupo de la biotinta de nanocelulosa se observó en el día 1 células de color verde distribuidas por la muestra, observándose escasos puntos rojos equivalentes a células muertas, en el día 7 se evidencia un aumento de las células y estas se encuentran formando colonias, en el día 14 se evidencian menos puntos verdes y una mayor dispersión (*Figura 16*).

Tabla 2 Prueba de viabilidad de células madre de la papila apical

Día del conteo	Recuento de células vivas (número de células vivas)	Recuento de células muertas (número de células muertas)	Porcentaje de viabilidad	Promedio de número de células vivas/día	Desviación Estándar
Día 1	4278	445	90,58	213,90	11,03
Día 7	12465	266	97,91	623,25	24,64
Día 14	1856	403	82,16	92,80	7,08

Tabla 2: Prueba de viabilidad celular, se muestra recuento de células vivas, células muertas, el porcentaje de viabilidad, promedio de células vivas por día y la desviación estándar en los días 1, 7 y 14.

Los valores de *viabilidad general* para los tres días fueron de 90,2% +/- 7,88%. Los valores separados por cada uno de los tiempos se observan en la columna de porcentaje de viabilidad en la tabla 2.

El gráfico de viabilidad permite señalar que esta se mantiene hasta los 14 días bajo las condiciones de cultivo realizadas, por encima de 80% hasta los 14 días, con un pico máximo sobre los 7 días (Gráfico 1).

Gráfico 1 Gráfico de viabilidad celular con la técnica Live-Dead

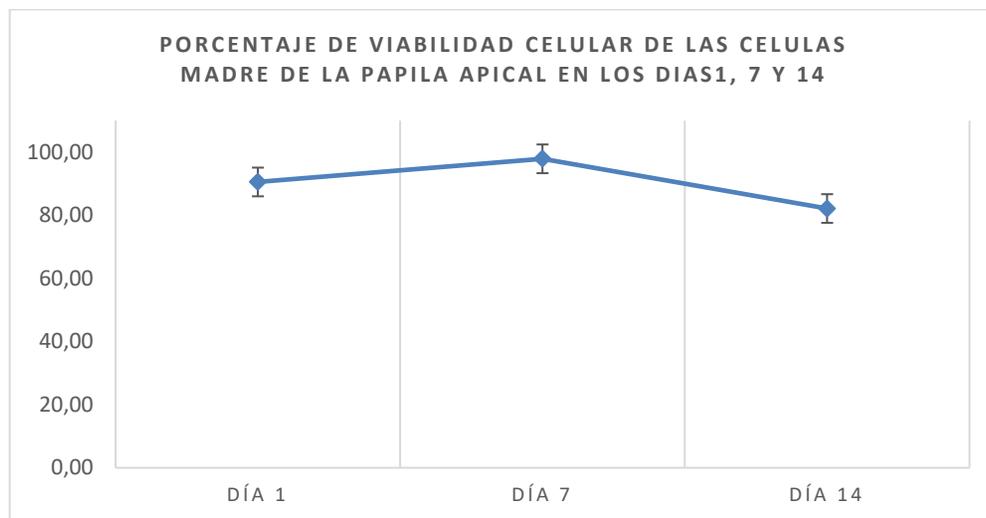


Gráfico 1: Porcentaje de viabilidad celular de células madre de la papila apical impresas con una biotinta de la celulosa nanofibrilar con la técnica Live-Dead para el día 1, 7 y 14, día 1: 90,58%, día 7: 97,91% y día 14: 82,16%.

6.4. Proliferación celular

La proliferación determinada mediante la prueba de Live-Dead, mostró que la proliferación aumenta desde el primer día hasta el pico máximo sobre el día 7 y luego decae rápidamente hasta el día 14. Los valores fluctúan entre 29,62 % para el día 1, 44,64% para el día 7 con pico máximo de proliferación, y 25,75% para el día 14. Ver tabla 3.

Tabla 3 Porcentaje de proliferación de los cultivos celulares para día 1, 7 y 14

Día del conteo	Promedio número de células/día (%)	Desviación Estándar	Porcentaje de proliferación celular
Día 1	10589,33%	1072,61	29,62%
Día 7	15961,00%	4187,34	44,64%
Día 14	9205,33%	1038,23	25,75%

Tabla 3: Porcentaje de proliferación celular de células madre de la papila apical impresas con una biotinta de la celulosa nanofibrilar con la técnica Live-Dead para el día 1, 7 y 14.

Grafico 2 Porcentaje de proliferación celular a los días 1, 7 y 14

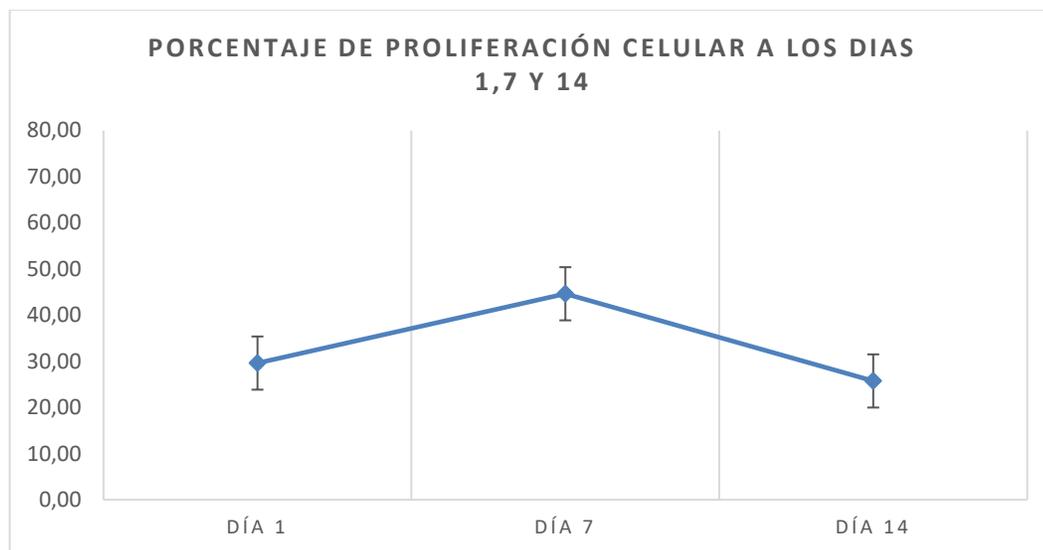
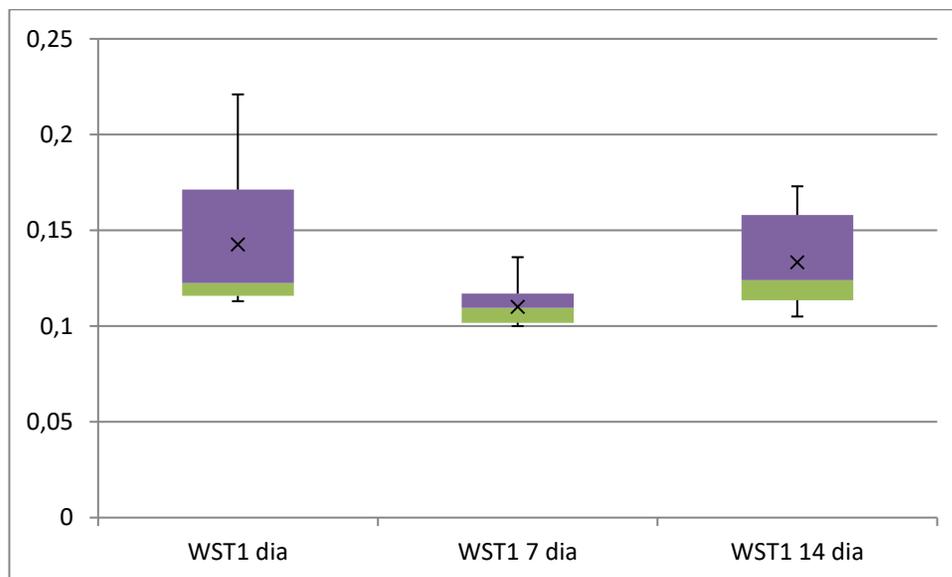


Grafico 2: Porcentaje de proliferación de células madre de la papila apical en cultivo para los días 1, 7 y 14. Día 1 29,62%. Día 7, proliferación del 44,64%; Día 14 proliferación del 25,75%.

Para la evaluación de las células madre mesenquimales de la papila apical a través de la técnica de WST-1 se realizaron cultivos y conteo a tres tiempos (1 día, 7 días y 14 días).

La distribución de los datos se observa en la *gráfica 3*. Para determinar las diferencias entre los tres tiempos valorados en la que se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis luego de probar que no se cumplía con los parámetros de normalidad mediante la aplicación de la prueba de Shapiro Wilks (Tabla 5), y que los datos no tenían varianzas homogéneas mediante la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas con un valor de $p= 2,098$. Los cálculos se realizaron mediante el software de Real Statistics versión de R para Excel 2019.

Grafico 3 Diagrama de Box Plot



Nota: Diagrama de Box Plot para distribución de los datos en los tres tiempos de lectura en la proliferación de células madre de papila apical bajo las condiciones de cultivo mediante WTS-1

Tabla 4. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

	WST1 día	WST1 7 día	WST1 14 día
W-stat	0,72663943	0,89344213	0,85352323
p-value	2,3138E-05	0,01566852	0,00254311
Alpha	0,05	0,05	0,05
Normal	no	no	no

Tabla 4: Muestra las diferencias entre los valores del día 1, 7 y 14 que no son homogéneos es decir, no son normales.

Prueba de Kuskal -Wallis

La prueba de K-W con un alfa de 0,05; mostró diferencias significativas con un valor $p= 1,021E-5$ y la prueba Post Hoc de Nemenyi mostró diferencia significativa entre los valores del tiempo a 1 día y 7 días y entre los días 7 y 14. Ver tabla 6.

Tabla 5 Valores para la prueba Post Hoc de Nemenyi

group 1	group 2	R mean	std err	q-stat	p-value	R-crit
WST1 día	WST1 7 día	26,8333333	4,27200187	6,28120823	* 0,00002784845664	14,1574142
WST1 día	WST1 14 día	4,04166667	4,27200187	0,94608261	0,781546229	14,1574142
WST1 7 día	WST1 14 día	22,7916667	4,27200187	5,33512563	* 0,000486141490	14,1574142

Nota: Valores para la prueba Post Hoc de Nemenyi para observar diferencias entre los grupos de tres

tiempos con la prueba WTS-1.

7. Discusión

La ingeniería tisular ha tomado importancia en las últimas décadas, debido a la necesidad de creación de tejidos humanos funcionales, asociado a la escasa disponibilidad de donantes aptos, y a una creciente demanda de órganos y tejidos a nivel mundial. La fabricación de estos tejidos ha tenido diferentes enfoques, uno de estos consiste en la creación de andamios tridimensionales que permitan la colonización, proliferación y futura diferenciación en linajes celulares (Groll et al., 2018; Gungor-Ozkerim et. al., 2018).

La importancia de este estudio, radica en el vacío del conocimiento que está presente en el uso de células madre de la papila apical en una biotinta a base de celulosa nanofibrilar, ya que se han utilizado diferentes tipos de células como son fibroblastos, queratinocitos y células madre hematopoyéticas, y aunque cada linaje celular tiene un comportamiento e interacción diferente frente a un scaffold, las células utilizadas en el estudio representan algo novedoso en el conocimiento científico al no existir evidencia previa (Martin-Piedra et. al., 2019).

En este estudio se tuvo una proliferación en el día 1 de 10589,33 células con un porcentaje del 29,62%, teniendo su pico más alto el día 7 con 15961,00 células con un porcentaje del 44,64% y una baja en el día 14 con 9205,33 con un porcentaje del 25,75%.

Se han usado diferentes materiales para la bio-impresión, siendo los más usados el alginato, gelatina, colágeno, fibrina / fibrinógeno, ácido hialurónico, nanocelulosa fibrilar, a los que se les cargan células pluripotentes que tengan la capacidad de diferenciación a otros tipos de linajes celulares, creando ambientes idóneos que puedan ser aplicados a la formación

adecuada de un tejido llevando así mismo a la regeneración tisular (Rodríguez-Salvador et al., 2018).

Luego de la caracterización de las células utilizadas en este estudio, como células madre de la papila apical, se debe tener en cuenta que La Sociedad Internacional de Terapia Celular define las células madre siempre y cuando expresen los marcadores moleculares CD73, CD90, CD105, CD73 y CD44, y carezcan de la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR; deben adherirse al plástico de polietileno donde son cultivadas bajo condiciones estándar y deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* (Ruparel, 2013; Kobolak, 2016; Dominici, 2006).

Para este estudio, se utilizó la celulosa nanofibrilar que se ha usado en diferentes aplicaciones farmacéuticas y biomédicas debido a la fácil manipulación y características deseables para ser un scaffold que se adapte según la necesidad del defecto (Lou, 2014), en este estudio se le utilizaron células madre de la papila apical, por ser células que presentan excelentes características de proliferación y viabilidad, esto con el objetivo de evaluar el potencial de proliferación celular en la biotinta usada que sea capaz de generar un ambiente idóneo para la viabilidad y crecimiento celular. Esto se logró analizando no solo la actividad mitocondrial con el ensayo colorimétrico WST-1 y el ensayo de PCNA, sino la viabilidad celular mediante la prueba de Live-Dead, la integridad de membrana y la morfología celular mediante hematoxilina & eosina y la técnica DAPI que indica la actividad celular por medio de la expresión de citoqueratinas CD90 y CD105.

Por medio de la prueba WST-1 la cual mide la citotoxicidad del ambiente al tiempo que mide la proliferación se pudo encontrar que el día 1, la proliferación fue de 87,9%,

viéndose levemente aumentada el día 14 con un 90.6%, tendiendo a disminuir el día 14 con un 88.6%. Este resultado difiere del realizado por Seo (Seo et. al., 2020) en donde evaluaron la proliferación de fibroblastos en andamios de metacrilato (GelMA) de gelatina mediante el ensayo WST-1 en los días 1, 3 y 5 mostraron un aumento del 164,98 % el día 3 y del 554,41 % el día 5 en comparación del día 1. Esto puede explicarse ya que se ha encontrado que la gelatina proporciona un mejor entorno que la nanocelulosa para la proliferación celular, a pesar de esto, se puede confirmar el aumento gradual de las actividades metabólicas de las células.

Por medio de la prueba PCNA que es una prueba de inmunohistoquímica se puede evidenciar la proliferación por medio de la actividad del núcleo, se pudo encontrar que el día 1 la membrana celular se desintegró, en el día 7 se logran observar puntos cafés que corresponden a núcleos celulares aglomerados en una zona debido a una actividad celular. Estos resultados son corroborados por el estudio de Beketov (2021), en donde usaron biotinta a base de 4% de colágeno y condrocitos para formar cartílago *de novo* y pudieron evidenciar grupos de células isogénicas que se continuaron formando en el andamio, al tiempo que se observaron signos morfológicos de actividad proliferativa y en el núcleo de los condroblastos dieron una reacción positiva a PCNA. Por otro lado, en el estudio de Ahmed (2021), donde utilizaron hidrogel de quitosano/alcohol polivinílico cargado con S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) que libera óxido nítrico (NO) y células madre de la médula ósea, se logró demostrar la actividad citoprotectora durante 6 días en la viabilidad y proliferación celular, lo cual se demostró por medio del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Teniendo en cuenta lo anterior, la prueba PCNA es una técnica confiable de

inmunohistoquímica para determinar si una célula se encuentra en estado mitótico, como lo pudimos demostrar en este estudio en el día 7 y 14.

A partir de los hallazgos encontrados, en este estudio sobre la viabilidad de la células madre de la papila apical en una biotinta de celulosa nanofibrilar, en donde se observó mediante la prueba de live-dead, tomadas de 4 imágenes aleatoriamente del cultivo contando las células vivas y muertas, se aplicó la fórmula de células vivas sobre el total de las células incluyendo las muertas, que multiplicado arrojando un porcentaje de viabilidad del 29,62% en el día 1, que se vio aumentado en el día 7 al observarse el pico con un 44,64%, mientras que el día 14 se evidenció una disminución en la densidad celular en un 25,75% en la viabilidad de las mismas. Estos resultados coinciden con el estudio de Im (Im et. al., 2022), quienes analizaron la viabilidad celular de osteoblastos en biotintas a base de hidrogel como el alginato, celulosa tempo-oxidada nanofibrilar (TOCNF) y nanopartículas de polidopamina (PDANP), calculando el porcentaje de células vivas y muertas observando que en la mayoría de las imágenes las células eran viables con >80% para las muestras el día 1 y el día 7. Este estudio se corrobora con el de Deng (2020), en donde evaluaron células madre modificadas con factor de crecimiento de la papila apical en andamios de hidrogel termosensible para la regeneración ósea, pudieron observar a los 7, 14 y 21 días en donde por medio de Live-Dead la viabilidad se mantenía constante hasta los 21 días, lo que demostró que el hidrogel mantiene una adecuada biocompatibilidad y crecimiento celular. Por el contrario, el artículo de Zhang (2013) en donde usaron materiales híbridos de gelatina/alginato en los que aplicaron mioblastos de ratón que fueron observados a las primeras 2 horas después de la impresión observándose 54.72% de viabilidad celular, 24 horas, 2 días, hasta el 5to día, en donde se

empieza a observar un decremento de en la viabilidad celular (Zhang et. al., 2013). Lo anterior puede confirmar que las biotintas y los procesos de bio-impresión son compatibles y adecuados para las células. De igual manera, esto puede deberse a que durante las primeras 24 horas las células están en un proceso de adaptación, debido a que el medio no es citotóxico y logra mantener durante los primeros 7 días el proceso de replicación. Este se ve afectado al día 14 debido a que la matriz extracelular de la biotinta inicia el proceso de reabsorción. Esto concuerda con lo que se busca en este tipo de materiales, que es una reabsorción rápida en la cual se incentive la regeneración de las células en un proceso fisiológico de cicatrización.

Con el objetivo de evidenciar la actividad celular se llevó a cabo el ensayo DAPI, donde se pudo observar mediante la expresión de citoqueratinas CD90 y CD105, manifestándose en los núcleos celulares una pigmentación azul fluorescente, esta expresión positiva corresponde a la presencia de células madre, que en este estudio confirma que las células cultivadas son células madre de la papila apical. Este resultado concuerda con el artículo de Kiiskinen (2019) en donde colocaron células madre estromales mesenquimatosas derivadas del tejido adiposo sobre un andamio de celulosa nanofibrilar, al que también se realizó la prueba de fluorescencia DAPI que confirmó mediante la respuesta positiva a los mismos indicadores la existencia de células madre (Kiiskinen et. al., 2019).

8. Conclusiones

- La tinción de Hematoxilina & Eosina u PCNA revelaron que los cuerpos de las células madre de la papila apical se encontraban integrados en la celulosa nanofibrilar sin ser afectados por el proceso de bioimpresión en los tiempos de evaluación.
- Mediante la técnica de Live-Dead se pudo observar que en la celulosa nanofibrilar la viabilidad celular se mantuvo durante el día 1, con un 90,58%; el día 7 con un 97,9% y el día 14 con 82,16%.
- Mediante la técnica WST-1 se determinó la proliferación celular de las células madre de la papila apical en una celulosa nanofibrilar presentando un comportamiento incremental del día 1 (29,62%), con el pico en el día 7 (44,64%) y una disminución en el día 14 (25,75%).
- Las células madre de la papila apical tienen un alto potencial de viabilidad y proliferación en una celulosa nanofibrilar obtenida por bioimpresión en los tiempos evaluados, determinado mediante pruebas cualitativas y cuantitativas.

9. Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados de este estudio, en donde se evaluó la viabilidad y proliferación de células madre de la papila apical en un scaffold de celulosa nanofibrilar obtenida mediante bioimpresión, se recomienda la continuación de la línea de investigación, implementando células como queratinocitos y fibroblastos sobre dicha membrana, para de esta manera generar una estratificación celular, y determinar si es posible crear una membrana de mucosa oral artificial.

10. Bibliografía

- Al Habib, M., & Huang, J. (2019). Dental Mesenchymal Stem Cells: Dental Pulp Stem Cells, Periodontal Ligament Stem Cells, Apical Papilla Stem Cells, and Primary Teeth Stem Cells-Isolation, Characterization, and Expansion for Tissue Engineering. *Methods in molecular biology*, 59-76.
- Bertana, V., Catania, F., Cocuzza, M., Ferrero, S., Scaltrito, L., & Pirri, C. (2020). Medical and biomedical applications of 3D and 4D printed polymer nanocomposites. En *3D and 4D Printing of Polymer Nanocomposite Materials* (págs. 325-366). Italy: Elsevier Inc.
- Blanco-Elices, C., España-Guerrero, E., & Mateu-Sanz, M. (2020). In Vitro Generation of Novel Functionalized Biomaterials for Use in Oral and Dental Regenerative Medicine Applications. Running Title: Fibrin-Agarose Functionalized Scaffolds. *Materials*.
- Cairo, F. (2017). Periodontal plastic surgery of gingival recessions at single and multiple teeth. *Periodontology 2000*, 296–316.
- Cairo, Nieri, Cincinelli, & Mervelt. (2011). The interproximal clinical attachment level to classify gingival recessions and predict root coverage outcomes: an explorative and reliability study. *Journal of Clinical Periodontology*, 661-666.
- Casagrande, & Cordeiro. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 1-7.
- Casagrande, & MM, C. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 1-7.
- Casagrande, L., & Cordeiro, M. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 1-7.

- Chan, H.-L. (2015). Does gingival recession require surgical treatment? *Dental clinics of North America.*, 981-96.
- Colombia, M. d. (1993). Resolución número 8430 de 1993. 19.
- Cortellini, P., & Bissada , N. (2018). Mucogingival conditions in the natural dentition: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol*, S204-S213.
- Cruchley, A., & Bergmeier, L. (2018). Structure and Functions of the Oral Mucosa. *Oral Mucosa in Health and Disease.*, 1-18.
- de Resende DRB, G. S. (2019). Acellular dermal matrix allograft versus free gingival graft: a histological evaluation and split-mouth randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*, 539-550.
- Ding , D.-C., Chang , Y.-H., & Shyu , W.-C. (2015). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. . *Cell Transplantation*, 339-347.
- Excmo, P., & Pérez, A. (2007). Ingeniería tisular de la mucosa bucal tissue engineering of the oral mucosa. *Real Academia Nacional de Medicina*, 157.
- Foley, J. &. (1991). *Detection and Evaluation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Rat Tissue by an Improved Immunohistochemical Procedure.* Journal of Histotechnology.
- Golinski , P., Gröger, S., & Herrmann, J. (2011). Oral mucosa model based on a collagen-elastin matrix. *J Periodontal*, 704-71.
- Golinski, & S, G. (2011). Oral mucosa model based on a collagen-elastin matrix. *J Periodontal Res.*, 704-711.
- Gomathysankar, S., Halim, A., & Yaacob, N. (2016). *Compatibility of Porous Chitosan Scaffold with the Attachment and Proliferation of human Adipose-Derived Stem Cells In Vitro.* Journal of stem cells & regenerative medicine.

- Groll , J., Burdick, J., & Cho, D. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, 11.
- Groll, J., Burdick , J., Cho, D., & Derby , B. (2019). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*.
- Gungor-Ozkerim, & I, I. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*, 915-946.
- Gungor-Ozkerim, P., Inci, I., & Zhang, Y. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*, 915–946.
- Hafezi, F., Shorter, S., & Tabriz, A. (2020). *Bioprinting and Preliminary Testing of Highly Reproducible Novel Bioink for Potential Skin Regeneration*. Pharmaceutics .
- Julie & Dietrich, D. &. (1991). *Detection and Evaluation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Rat Tissue by an Improved Immunohistochemical Procedure*. . Journal of Histotechnology.
- Kang, & Fan. (2019). Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. *Biomed Res Int*.
- Kang, J., Fan, W., & Deng, Q. (2019). Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. *BioMed Research International*, 1-8.
- Langer, B., & Langer, L. (1985). Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol*, 715-20.
- Li, L, C., & E, P. (2016). Epithelial stratification and placode invagination are separable functions in early morphogenesis of the molar tooth. *Development*, 670-681.
- Lindhe, J., & Lang, N. (2017). *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

- Löe, H., Ånerud, A., & Boysen, H. (1992). The Natural History of Periodontal Disease in Man: Prevalence, Severity, and Extent of Gingival Recession. *Journal of Periodontology*, 489–495.
- Martin-Piedra, & Alfonso-Rodriguez. (2019). Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. *Eur Cell Mater.*, 233-249.
- Merijohn, G. K. (2016). Management and prevention of gingival recession. *Periodontol 2000*, 228-42.
- Moharamzadeh, K., Brook, I., & Van Noort, R. (2007). Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res*, 115-124.
- Moharamzadeh, K., Colley, H., Murdoch, C., Hearnden, V., Chai, W., Brook, I., . . . MacNei, S. (2012). Tissue-engineered Oral Mucosa. *Journal of Dental Research*, 642–650.
- Murphy , S., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.*, 773-85.
- Ozenci , I., Ipci, S., Cakar, G., & Yilmaz, S. (2015). Tunnel technique versus coronally advanced flap with acellular dermal matrix graft in the treatment of multiple gingival recessions. *J Clin Periodontol*, 1135-42.
- P., G. (2020). *Washington, DC, U.S. Patente n° 10.675.379.*
- Pini-Prato , G., Franceschi, D., & Cairo, F. (2010). Classification of dental surface defects in areas of gingival recession. *J Periodontol*, 885-90.
- Pini-Prato, G. (2011). The Miller classification of gingival recession: limits and drawbacks. *J Clin Periodontol*, 243-5.
- Pini-Prato, G., Franceschi, D., & Cairo, F. (2010). Classification of dental surface defects in areas of gingival recession. *J Periodontol.*, 885-90.

- Rajakpakse, P., McCracken, G., & Gwynnett, E. (2007). Does tooth brushing influence the development and progression of non-inflammatory gingival recession? A systematic review. *J Clin Periodontol*, 1046-61.
- Rao, R., Patil, S., & Ganavi, B. (2014). Oral cytokeratins in health and disease. *J Contemp Dent Pract*, 127-36.
- Reiser, G., Bruno, J., & Mahan, P. (1996). The subepithelial connective tissue graft palatal donor site: Anatomic considerations for surgeons. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 131-137.
- Rodriguez-Salvador, M., & Ruiz-Cantu, L. (2018). Revealing emerging science and technology research for dentistry applications of 3D bioprinting. *International journal of bioprinting*, 170.
- Santana, R., Fonseca, E., & Furtado, M. (2019). Single-stage advanced versus rotated flaps in the treatment of gingival recessions: A 5-year longitudinal randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, 941-947.
- Sbricol, L., Guazzo, R., Annunziata, M., & Gobbato. (2020). Selection of collagen membranes for bone regeneration: A literature review. *Materials*, 786.
- Sears, N., Seshadri, D., & Dhavalikar, P. (2016). A Review of 3D Printing of Tissue Engineering Constructs. *Department of Biomedical Engineering, Texas A&M University*, 298-310.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Dianji, C., & Yamaza, T. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one*.
- Tavelli, L., Barootchi, S., & Nguyen, T. (2018). Efficacy of tunnel technique in the treatment of localized and multiple gingival recessions: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 1075-1090.

- Tayeb , A., Amini , E., Ghasemi, S., & Tajvidi, M. (2018). Cellulose Nanomaterials-Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules*, 2684.
- Tonetti MS, Cortellini P, Pellegrini G, Nieri M, & Bonaccini D. (2018). Xenogenic collagen matrix or autologous connective tissue graft as adjunct to coronally advanced flaps for coverage of multiple adjacent gingival recession: Randomized trial assessing non-inferiority in root coverage and superiority in oral health-related. *J Clin Periodontol.*, 78-88.
- Victor, A., & Reiter, L. (2017). Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Hum Mol Genet*, 166-171.
- Viñuela-Prieto, J., Sánchez-Quevedo, M., & Alfonso-Rodríguez, C. (2015). Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. *Journal of periodontal research*, 658-65.
- Viñuela-Prieto, Sánchez-Quevedo, & Alfonso-Rodríguez. (2015). Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. *J Periodontal Res*, 658-665.
- Wan , W., Zhong , H., & Wang, J. (2020). Creeping attachment: A literature review. *J Esthet Restor Dent.*, 776-782.
- Wang , X., Wang, Q., & Xu, C. (2020). Nanocellulose-Based Inks for 3D Bioprinting: Key Aspects in Research Development and Challenging Perspectives in Applications-A Mini Review. *Bioengineering*, 40.
- Xie, & Zhou. (2017). Regulation of mitotic spindle orientation during epidermal stratification. *J Cell Physiol*, 1634-1639.

- Zadeh, & Homayoun, H. (2011). Minimally invasive treatment of maxillary anterior gingival recession defects by vestibular incision subperiosteal tunnel access and platelet-derived growth factor BB. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 653.
- Zucchelli G., L, T., & MK, M. (2020). Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction. *J Periodontol*, 9-16.
- Zucchelli, G., & Cesari, C. (2004). Laterally moved, coronally advanced flap: a modified surgical approach for isolated recession-type defects. *Journal of Periodontology*, 1734-1741.
- Zucchelli, G., & Mounssif, I. (2015). Periodontal plastic surgery. *Periodontology 2000*, 333–368.
- Zucchelli, G., Gori, G., Mele, M., & Stefanini, M. (2011). Non-carious cervical lesions associated with gingival recessions: a decision-making process. *J Periodontol*, 1713-24.
- Zucchelli, G., Tavelli, L., & McGuire, M. (2019). Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant. *J. Peridontol*, 1-8.