

**EFFECTO DEL ÁCIDO FÓLICO EN LA VIABILIDAD, PROLIFERACIÓN, MORFOLOGÍA Y
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES**

ZITA CAROLINA BENDAHAN ALVAREZ

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC - JULIO - 2020**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad:	Universidad El Bosque
Facultad:	Odontología
Programa:	Maestría en Ciencias Odontológicas
Título	Efecto del ácido fólico en la viabilidad, proliferación, morfología y diferenciación de células mesenquimales.
Grupo de Investigación	Unidad de Manejo Integral de Malformaciones Craneofaciales (UMIMC)
Línea de investigación:	Labio y paladar hendido
Tipo de investigación:	Postgrado / Grupo
Estudiante	Zita Carolina Bendahan Álvarez
Director	Lina María Escobar Márquez, DMD, MSc.
Codirectores	María Clara González Carrera, DMD.
Otros Asesores	Jaime Eduardo Castellanos P., DMD, MSc, PhD.
Análisis estadístico	Zita Carolina Bendahan Álvarez

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

TIANA CIAN LEAL	Presidente del Claustro
CAMILO ALBERTO ESCOBAR JIMÉNEZ	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rectora
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrectora Académica
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Directora Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Directora Área Comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinadora de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MARIA CONSUELO ROMERO	Directora Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas
ANGELA VICTORIA FONSECA BENITEZ	Coordinadora Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas

AGRADECIMIENTOS

Me faltan palabras para agradecer a tantas personas que me ayudaron a alcanzar este logro.

Agradezco a mi familia, mi gran equipo, mi ejército, que vivió conmigo cada minuto de este proceso y que me ayudó en tantas formas que no puedo describir.

Gracias a mis tutoras, la doctora María Clara González y la doctora Lina Escobar, que confiaron en mí y me han permitido trabajar de su mano desde hace siete años. A la doctora Lina, muchísimas gracias por enseñarme y guiarme por este camino de las ciencias básicas.

Infinitas gracias a todo el equipo del Laboratorio de Virología por adoptarme. Al doctor Jaime Castellanos y la doctora Myriam Velandia que literalmente abrieron su laboratorio para ayudarme. A la doctora Eliana, Sonia, Giovanni, Nayeli les agradezco inmensamente. A Sigrid, Hernando, Carolina, Lilia, María Angélica y Lady, gracias por sus conocimientos, por su ayuda, pero sobre todo por los almuerzos, los cafés, los tés, los helados compartidos, gracias porque sin Uds. no hubiera sido posible.

Muchas gracias a la doctora Sandra Perdomo por siempre estar pendiente de mí y dispuesta a ayudarme.

Agradezco también a todos los que trabajan en los laboratorios por la ayuda que me brindaron.

Finalmente, gracias a la Universidad El Bosque por el apoyo y por motivarme a estudiar cada día.

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

TABLA CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. SITUACIÓN ACTUAL	31
6. OBJETIVOS	33
6.1 Objetivo general	33
6.2 Objetivos específicos	33
7. METODOLOGÍA	34
7.1. Tipo de estudio	34
7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	34
7.3. Materiales y métodos	34
7.4. Hipótesis de estudio	46
7.5. Plan de tabulación y análisis	46
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	47
9. RESULTADOS	48
10. DISCUSIÓN	62
11. CONCLUSIONES	72
12. PERSPECTIVAS	73
13. BIBLIOGRAFÍA	74
14. ANEXOS	82

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Genes implicados en el desarrollo del LPH.	6
Tabla 2. Prevalencia de anomalías cromosómicas y DTN entre 1980-2007 en Europa.	13
Tabla 3. Resumen de las revisiones sistemáticas que evaluaron el efecto del FA sobre la formación de LPH.	17
Tabla 4. Resumen de los estudios sobre modelos animales que evaluaron el efecto del FA sobre la formación de LPH.	18
Tabla 5. Resumen de los estudios <i>in vitro</i> que evaluaron el efecto del FA.	21
Tabla 6. Kit de fenotipificación de MSC de origen humano.	36
Tabla 7. Características de los <i>primers</i> empleados en RTqPCR.	41
Tabla 8. Condiciones para la incubación de anticuerpos primarios y secundarios.	45

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formación del paladar primario.	2
Figura 2. Proceso de la palatogénesis.	3
Figura 3. Formación del paladar a las seis semanas.	4
Figura 4. Formación del paladar a las siete semanas.	4
Figura 5. Formación del paladar a las 10 u 11 semanas.	5
Figura 6. Patrón de expresión de algunos genes involucrados en los diferentes estadios de desarrollo del labio y el paladar.	6
Figura 7. Estructura química del FA.	10
Figura 8. Vía metabólica del folato y del FA.	11
Figura 9. Participación del folato en otras vías metabólicas.	12
Figura 10. Vías de señalización de BMP.	24
Figura 11. Protocolo de amplificación de <i>RUNX2</i> , <i>OCN</i> , <i>OP</i> , <i>ALP</i> , <i>BMP2</i> , <i>OSX</i> y <i>GAPDH</i> mediante RTqPCR.	42
Figura 12. Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, Ref. #26616), de 10 a 180 kDa.	44
Figura 13. Caracterización morfológica de hDPSC.	48
Figura 14. Caracterización de las hDPSC.	49
Figura 15. Evaluación de la proliferación de hDPSC tratadas con FA.	51
Figura 16. Cambios morfológicos de las hDPSC tratadas con FA (0,8 mM y 1,6 mM) durante seis días.	52
Figura 17. Efecto del FA sobre el contenido de ADN de las hDPSC.	53

Figura 18. Mineralización de matriz extracelular determinada por medio de la tinción con rojo de alizarina.	54
Figura 19. Detección de ALP mediante inmunohistoquímica.	55
Figura 20. Expresión relativa de los genes durante la diferenciación.	57
Figura 21. Expresión relativa de genes durante la diferenciación.	58
Figura 22. Efecto del FA en la expresión y fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 y p38.	60
Figura 23. Patrón de expresión de las proteínas Smad1/5/8 y p38 en su estado fosforilado según el grupo de tratamiento.	61
Figura 24. Vía de señalización del FA.	71

RESUMEN

EFFECTO DEL ÁCIDO FÓLICO EN LA VIABILIDAD, PROLIFERACIÓN, MORFOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES.

Antecedentes: El ácido fólico (FA) es la forma sintética del folato, obtenido por medio de la dieta o suplementos. Se ha determinado que la administración periconcepcional de suplementos de FA reduce los defectos del tubo neural; sin embargo, su efecto sobre la prevención de labio y paladar hendido (LPH) aún no es concluyente; así como tampoco es claro su mecanismo de acción en la diferenciación osteoblástica y formación ósea. **Objetivo:** Determinar el efecto del FA en la viabilidad, proliferación, morfología y diferenciación hacia linaje osteoblástico de células mesenquimales de pulpa dental (hDPSC). **Metodología:** Se aislaron, caracterizaron y trataron hDPSC con 0,8 y 1,6 mM de FA para evaluar cambios fenotípicos, en la proliferación celular y diferenciación hacia el linaje osteoblástico (rojo de alizarina, marcaje de ALP y expresión de marcadores de diferenciación osteogénica). Se evaluaron también cambios en la expresión y fosforilación de Smad1/5/8 y p38 mediante Western Blot. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y Kruskal-Wallis. Esta investigación fue aprobada a nivel ético y financiada por la Universidad El Bosque. **Resultados:** El FA indujo cambios morfológicos y redujo la proliferación celular 12,5-14,8% a los seis días de tratamiento. El FA 0,8 mM promovió la actividad de ALP, la expresión de *OSX*, *OP*, *OCN*, *RUNX2* y *BMP2* y el aumento y activación temprana de p38. La vía de Smad1/5/8 también fue estimulada, aunque con menor intensidad que p38. **Conclusiones:** El tratamiento de células hDPSC con FA indujo cambios morfológicos y redujo la proliferación celular a partir del cuarto día de tratamiento, dependiente de la concentración de FA utilizada. La concentración 0,8 mM de FA promovió la diferenciación de las células hacia el linaje osteoblástico, como se comprobó con el incremento en el marcaje de ALP y la expresión de genes específicos de diferenciación: *OSX*, *OP*, *OCN*, *RUNX2* y *BMP2*. El tratamiento con FA indujo activación y fosforilación temprana de p38, sin embargo, la vía de Smad1/5/8 también fue estimulada con menor intensidad.

Palabras claves: Ácido Fólico, Células Madre Mesenquimatosas, Fisura del Paladar, Labio Leporino.

ABSTRACT

FOLIC ACID EFFECT ON VIABILITY, PROLIFERATION, MORPHOLOGY AND DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS.

Background: Folic acid (FA) is the synthetic form of folate, obtained through diet or supplements. Periconceptional administration of FA supplements has been found to reduce neural tube defects; however, its effect on cleft lip and palate (CLP) prevention is not yet conclusive; as well as its mechanism of action in osteoblastic differentiation and bone formation is not clear. **Aim:** To determine FA effect on viability, proliferation, morphology and differentiation towards osteoblastic lineage of mesenchymal dental pulp cells (hDPSC). **Methodology:** Isolated and characterized hDPSC were treated with 0,8 and 1,6mM FA to evaluate phenotypic and proliferation changes and its differentiation towards osteoblastic lineage (alizarin red, ALP activity and changes in osteogenic differentiation markers expression). Changes in Smad1/5/8 and p38 expression and phosphorylation were evaluated using Western Blot. Statistical analysis was performed using ANOVA and Kruskal-Wallis. This research was ethical approved and funded by Universidad El Bosque. **Results:** FA induced morphological changes and reduced 12.5-14.8% cell proliferation at day six of treatment. 0,8 mM FA promoted ALP activity, *OSX*, *OP*, *OCN*, *RUNX2* and *BMP2* expression and p38 expression and early activation. The Smad1/5/8 pathway was also stimulated, although with less intensity than p38. **Conclusions:** Treatment of hDPSC with FA induced morphological changes and reduced cell proliferation from the fourth day of treatment, depending on the concentration of FA used. FA 0,8 mM promoted the differentiation of the cells towards the osteoblastic lineage, as it was verified with the increase in the ALP label and the expression of specific genes of differentiation: *OSX*, *OP*, *OCN*, *RUNX2* and *BMP2*. FA treatment induced early activation and phosphorylation of p38, however, the Smad1/5/8 pathway was also stimulated with less intensity.

Key words: Cleft Lip, Cleft Palate, Folic acid, Mesenchymal Stem Cells.

1. INTRODUCCIÓN

El labio y paladar hendido (LPH) es la malformación congénita craneofacial más común y la cuarta anomalía congénita más prevalente a nivel general (ACPA, 2009). Su origen es complejo y actualmente se reconoce que su principal factor etiológico es la interrelación entre variables epigenéticas y su influencia sobre la expresión de diferentes genes (Guarnizo, 2017).

El efecto de los suplementos de FA durante el período periconcepcional sobre la prevención de los DTN está bien establecido (Lumley *et al.*, 2001; Wilcox *et al.*, 2007; Eurocat Special Report, 2009; Suárez-Obando *et al.*, 2010; De-Regil *et al.*, 2010). Múltiples revisiones sistemáticas sugieren que el FA puede tener un efecto benéfico sobre la prevención del LPH no sindrómico (Blanco *et al.*, 2016; Millacura *et al.*, 2017, Jahanbin *et al.*, 2018). Sin embargo, otros estudios no apoyan el efecto protector del FA preconcepcional contra hendiduras orofaciales, ya sea en forma de tabletas o granos de cereales fortificados (Czeizel y Dudas, 1992; Ray *et al.*, 2003; Johnson y Little, 2008; De-Regil *et al.*, 2015). Los modelos animales en ratas y ratones han permitido continuar estudiando el efecto del FA sobre la formación del LPH, sugiriendo que previene la formación PH (Bienengraber *et al.*, 2001; Burgoon *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2011; Scheller *et al.* 2013; Kriangkrai *et al.* 2017). Sin embargo, la variabilidad en los diseños experimentales ha impedido establecer una asociación entre estas variables y comprender el mecanismo de acción de la vitamina durante la formación del paladar. Por lo tanto, el efecto del FA sobre el desarrollo de otras anomalías congénitas como el LPH hasta el momento no es concluyente.

Adicionalmente, se conoce que las células son muy susceptibles al déficit de folatos en periodos de gran actividad metabólica, como el de la embriogénesis (López-Camelo *et al.*, 2010), pero se conoce muy poco con respecto a la diferenciación de las células mesenquimales del paladar hacia osteoblastos después de la fusión de los procesos palatinos.

Por todo lo expuesto anteriormente, se hace evidente la necesidad de estudios a nivel celular y molecular donde se determinen los efectos inducidos por la aplicación del FA, que permitan comprender mejor el mecanismo de acción de dicha vitamina en los procesos de formación de las estructuras orales, específicamente del paladar.

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del FA en la viabilidad, proliferación, morfología y diferenciación hacia linaje osteoblástico de células mesenquimales de pulpa dental.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Labio y/o paladar hendido.

De acuerdo con la Academia Americana de Hendiduras Palatinas-Craneofaciales, el LPH es la malformación congénita craneofacial más común y la cuarta anomalía congénita más prevalente a nivel general (ACPA, 2009).

Las últimas cifras disponibles de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportan que la incidencia mundial de las hendiduras orales es de 15,4:10.000 nacidos vivos; en Sudamérica es de 17,4:10.000 nacidos vivos, de las cuales el 30% del LPH es sindrómico, y el 70% es aislado (Guarnizo, 2017). El 46% de los pacientes con hendiduras presentan labio hendido (LH) y paladar hendido (PH) conjuntos, seguido del 32% que presenta únicamente PH y 21% que presenta sólo LH (Munz *et al.*, 2011).

En Colombia, se registró una incidencia de 5,66:10.000 nacidos vivos, de los cuales el 37,83% de las hendiduras corresponden a LPH, siendo más prevalente en los hombres (53,11%) (Guarnizo, 2017).

2.1.1 Formación embriológica del paladar y del labio.

A partir de la quinta o sexta semana de vida intrauterina las regiones mediales de ambas elevaciones nasales confluyen entre sí y se unen simultáneamente a los extremos caudales de las regiones laterales, cerrando el canal olfatorio. La fusión de las regiones mediales de ambas elevaciones nasales forma el segmento intermaxilar superior, que comprende la porción media del labio superior, la porción media del maxilar, la encía correspondiente y el paladar primario. Los procesos maxilares superiores forman las regiones laterales del labio superior y del maxilar (Figura 1) (Sadler, 2007; Gómez de Ferraris, 2009).

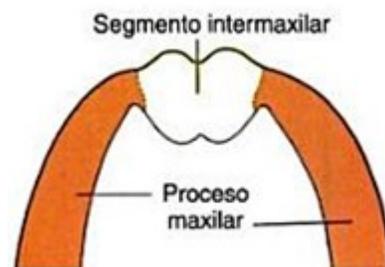


Figura 1. Formación del paladar primario. La fusión de las regiones mediales de ambas elevaciones nasales forma el segmento intermaxilar superior y los procesos maxilares superiores forman las regiones laterales del labio superior y del maxilar (Tomado de Sadler, 2007).

El paladar primario se origina a partir del segmento intermaxilar superior, en forma de placa horizontal cuneiforme en dirección hacia la región dorsal (Sadler, 2007).

Los procesos palatinos son láminas laterales que se originan a partir de proliferaciones mesodérmicas de los procesos maxilares superiores. Estas placas crecen primero hacia la cavidad bucal, posteriormente durante la séptima semana de vida intrauterina ascienden, ubicándose por encima de la lengua. Crecen en sentido horizontal y avanzan gradualmente hacia la línea media donde sus bordes se fusionan entre sí, de adelante hacia atrás (Figura 2). Posteriormente, el epitelio medio palatino, de ambos procesos contactan entre sí, se adhieren y forman la lámina epitelial media. Con el crecimiento de la cabeza, la lámina epitelial media se adelgaza debido a apoptosis de algunas células y luego, las células remanentes sufren una transformación epitelio-mesenquimal, permitiendo la fusión de los procesos palatinos (Montenegro y Rojas, 2001).

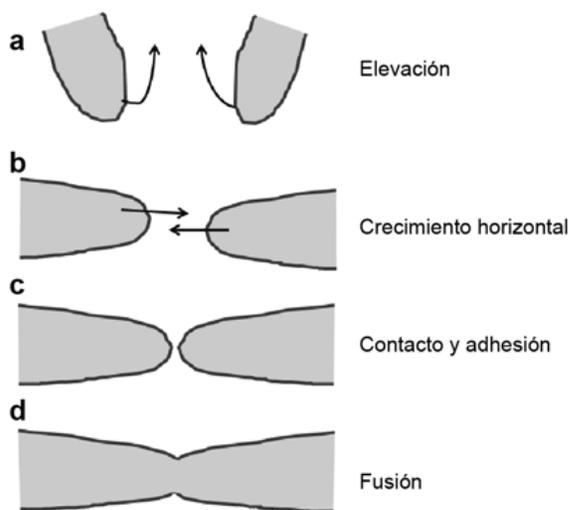


Figura 2. Proceso de la palatogénesis. Los procesos palatinos crecen hacia la cavidad bucal, ascienden, ubicándose por encima de la lengua, crecen en sentido horizontal y avanzan gradualmente hacia la línea media donde sus bordes se fusionan entre sí (Tomado de Escobar *et al.*, 2013).

Simultáneamente, los procesos palatinos se unen con el paladar primario y con el tabique nasal, quedando delimitadas la cavidad nasal y bucal (Figuras 3 y 4). Esto es posible debido a la capacidad de los procesos palatinos laterales de elevarse en sentido céfalo-caudal, gracias a la hidrofilia que le ofrece la presencia de ácido hialurónico y, debido al descenso pasivo de la lengua como resultado del crecimiento mandibular, dejando de interponerse entre los procesos palatinos laterales (Sadler, 2007).

Las regiones dorsales de los procesos palatinos se extienden hacia atrás y al fusionarse entre sí forman el paladar blando y la úvula (Sadler, 2007).

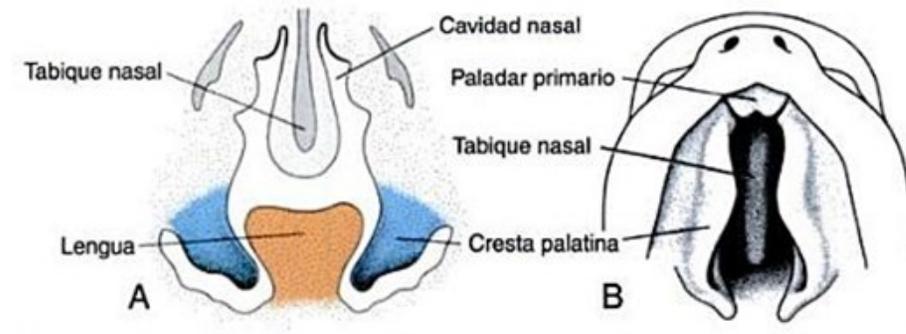


Figura 3. Formación del paladar a las seis semanas. (A) Corte frontal de la cabeza de un embrión de seis semanas y media. Las crestas palatinas están situadas en posición vertical a cada lado de la lengua. (B) Vista ventral de las crestas palatinas después de la extirpación del maxilar inferior y la lengua. Los procesos palatinos se ubican por encima de la lengua y avanzan hacia la línea media donde se fusionan entre sí, de adelante hacia atrás (Tomado de Gómez de Ferraris, 2009).

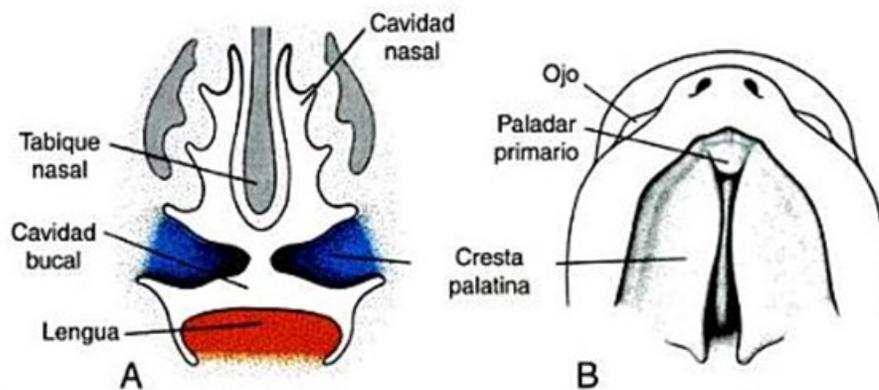


Figura 4. Formación del paladar a las siete semanas. (A) Corte frontal de la cabeza, se observa unión de los procesos palatinos con el paladar primario y con el tabique nasal, quedando delimitada la cavidad nasal y bucal. (B) Vista ventral de las crestas palatinas (Tomado de Gómez de Ferraris, 2009).

El tabique nasal también participa en la formación del paladar duro cuando se fusiona con los procesos palatinos, ocasionando apoptosis en ambos epitelios y las células epiteliales se transforman en mesénquima y migran hasta integrarse con el epitelio bucal (Gratacós *et al.*, 2009). Entre la décima y la décimo primera semana de vida intrauterina las dos crestas palatinas se han fusionado entre sí y con el tabique nasal (Figura 5) (Sadler, 2007; Gómez de Ferraris, 2009).

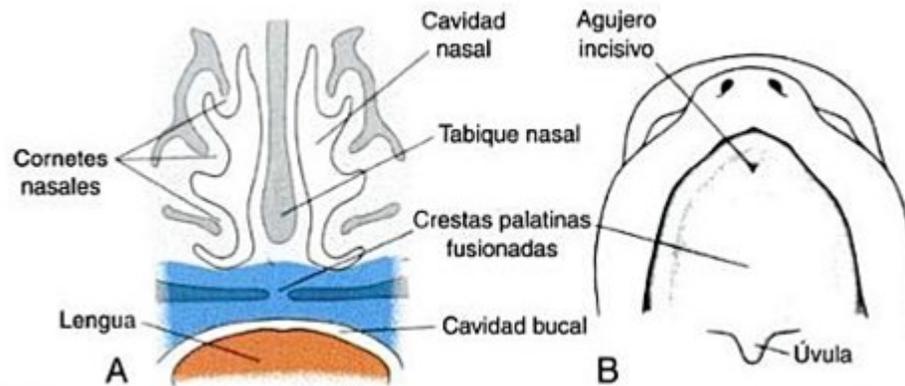


Figura 5. Formación del paladar a las 10 u 11 semanas. (A) Corte frontal de la cabeza, se observa fusión de los procesos palatinos entre sí y con el tabique nasal. (B) Vista ventral del paladar (Tomado de Gómez de Ferraris, 2009).

Por otro lado, hacia la mitad de la sexta semana, las partes de los procesos nasales laterales que bordean los orificios nasales se elevan en forma de crestas curvadas y se aproximan a los procesos maxilares con los cuales se unirán en un estadio más avanzado junto con el paladar primario, que corresponde al tejido que separa los orificios nasales de la apertura bucal. Si el proceso maxilar no se une con el proceso nasal medio, la fisura persistirá como labio hendido (Gómez de Ferraris, 2009).

Cualquier alteración en alguno de estos procesos origina fallas en la formación del paladar que concluirá en la aparición frecuente de hendiduras palatinas de diferentes tipos.

2.1.2 Etiología y teorías embriológicas de LPH.

El LPH se origina debido a fallas en la fusión de los procesos palatinos y a la falta de unión entre el proceso maxilar y el proceso nasal medio (Brown y Sandy, 2002). El origen de esta patología es muy complejo, ya que, se han descrito tres posibles grupos de factores etiológicos asociados: ambientales, teratogénicos y genéticos. Actualmente, se reconoce la interrelación entre variables epigenéticas y su influencia sobre la expresión de diferentes genes como principal factor etiológico del LPH (Guarnizo, 2017).

2.1.2.1 Factores genéticos asociados a la formación de LPH.

Las alteraciones de tipo genético constituyen una de las principales causas del desarrollo del LPH, ya que alteraciones en la expresión o función de uno o varios genes implicados en la formación del paladar, el labio o ambas estructuras generarán fallas en su desarrollo, lo que se

traduce en formación de hendidura labial y/o palatinas. Dichas alteraciones son ocasionadas por factores intrínsecos como los derivados de la recombinación genética, mutaciones puntuales, deleciones, entre otros; y factores derivados de la influencia medioambiental (Dixon *et al.*, 2011; Guarnizo, 2017).

Hasta la actualidad se han logrado conocer genes específicos que están implicados en el desarrollo del LPH (Tabla 1).

Tabla 1. Genes implicados en el desarrollo del LPH. (Tomado de Guarnizo, 2017).

Genética			
Genes	Factores de transcripción	Factores de crecimiento	Vías de señalización
*Polimorfismo			
MTR	MSX1	TGF- α	PVRL1
PCYT1A	TBX22	TGF- β 1	PVRL2
ASS1	IRF6	TGF- β 2	PVR
SLC25A13	LHX8	TGF- β 3	PTCH
GSTM1	TBX19	TP63	GABRB3
GSTT1	DLX1/2/5/6	SKI1	ARNT2
SUMO1	SATB2	TGF- β r1	WNT9A
	RYK	FGFR1	ROR2

Se han identificado genes específicamente asociados con alteraciones en la palatogénesis, como se ha podido evidenciar mediante estudios realizados en ratones *knockout* para dichos genes (Gajdos *et al.*, 2004; Escobar *et al.*, 2013) (Figura 6).

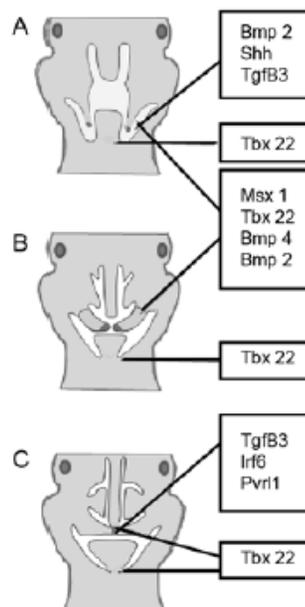


Figura 6. Patrón de expresión de algunos genes involucrados en los diferentes estadios de desarrollo del labio y el paladar. A. Estadio inicial, B. Crecimiento y elevación de los procesos palatinos, C. Fusión de los procesos palatinos (Tomado de Escobar *et al.*, 2013).

2.1.2.1 Factores medioambientales asociados a la formación de LPH.

Los factores medioambientales representan un rol importante en la formación del LPH. La literatura los clasifica en tres grandes subcategorías: factores relacionados con el estilo de vida de la madre, factores asociados con riesgos laborales y factores ambientales (Guarnizo, 2017). Adicionalmente, la evidencia ha demostrado que la interacción entre el ambiente y los genes es importante para la formación del LPH (Dixon *et al.*, 2011).

a. Factores relacionados con el estilo de vida de la madre:

El consumo de alcohol y cigarrillo (Dixon *et al.*, 2011), así como el consumo pasivo de cigarrillo (Jia *et al.*, 2011) durante las etapas tempranas del embarazo aumenta sustancialmente el riesgo de tener un hijo con LPH no sindrómico. La desnutrición, el uso de drogas anticonvulsivantes como difenilhidantoína o el consumo de ácido valproico antes del embarazo o en las primeras semanas de gestación, también se ha relacionado con la formación de LPH (Reyes Velázquez y Osorio, 2011; Dixon *et al.*, 2011). Factores nutricionales como la deficiencia de folato, FA, zinc y colesterol también han sido asociados con la formación de LPH. Se ha reportado que el uso de multivitamínicos por las mujeres embarazadas disminuye la formación de LPH (Dixon *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011).

b. Factores asociados con riesgos laborales:

La ocupación de la madre usualmente determina la exposición a diversos factores ambientales de riesgo para el LPH, como aldehídos, ácidos alifáticos, éter etílico, tricloroetileno, plomo y pesticidas (Reyes Velázquez y Osorio, 2011; Jia *et al.*, 2011). La radiación y su efecto teratógeno, los agentes químicos, el papel de los fármacos en la producción de anomalías embriológicas también se asocia con el LPH, pero todavía es muy incierto (Reyes Velázquez y Osorio, 2011). La asociación del LPH con el nivel socioeconómico y estabilidad laboral de la madre todavía no ha sido demostrada (Jia *et al.*, 2011).

c. Factores ambientales:

Dentro de los factores ambientales se encuentra la exposición de la madre a agentes derivados de la contaminación tales como la concentración de ozono (O₃), dióxido de azufre (SO₂), material particulado 2.5 (PM2.5) y benceno en la atmósfera (Guarnizo, 2017). Se ha reportado que el 10% de las malformaciones humanas conocidas se deben a causas ambientales (Reyes Velázquez y Osorio, 2011).

2.2 Defectos del tubo neural (DTN).

Los defectos del tubo neural (DTN) son malformaciones congénitas del cerebro y la espina dorsal. Se estima que aproximadamente 300.000 bebés nacen con DTN anualmente, de los cuales aproximadamente 88.000 mueren, ubicando a los DTN entre las cinco causas más frecuentes de muerte neonatal. En los países en desarrollo el 29% de las muertes neonatales se deben a defectos congénitos visibles. La mayoría de estos defectos pueden ser prevenidos con FA. A nivel mundial la espina bífida es el DTN más común, seguido por anencefalia y encefalocele. En América se observó una prevalencia promedio de 11,5 por cada 10.000 nacidos vivos (Zaganjor *et al.*, 2016). En Colombia, el Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) reportó una prevalencia de 9,9 por cada 10.000 nacidos vivos entre 2001 y 2007 (Suárez-Obando *et al.*, 2010). Su prevalencia varía dependiendo del país, sin embargo, desde 1992 esta ha disminuido, principalmente en los países desarrollados. Esta reducción se debe en parte a la interrupción del embarazo al detectar DTN mediante ecografía, a los niveles de α -feto proteína y principalmente, al consumo de FA, independientemente del origen étnico de las mujeres (Eurocat Special Report, 2009; Suárez-Obando *et al.*, 2010).

2.2.1 Etiología de los DTN.

El cierre del tubo neural se inicia durante la cuarta semana de vida intrauterina. La etiología de los DTN es multifactorial, y están involucrados factores genéticos y ambientales, entre los que se han identificado el consumo de cigarrillo, alcohol y medicamentos como antiepilépticos y metrotexato, la obesidad materna y la presencia de anticuerpos contra los receptores de folato. Entre los factores genéticos se incluyen los polimorfismos asociados con la 5,10 metileno-tetrahydrofolato reductasa (MTHFR) (Suárez-Obando *et al.*, 2010). Según la OMS, valores inferiores a 400 ng/mL de folato eritrocitario determina el riesgo para desarrollar DTN en mujeres en edad reproductiva (Herrera *et al.*, 2016).

Los DTN son considerados la consecuencia de eventos escalonados que se originan en la reparación defectuosa del ADN (ácido desoxirribonucleico) en el periodo de la gastrulación, proceso que se interrumpe al incrementar la disponibilidad del FA (Suárez-Obando *et al.*, 2010).

2.3 Ácido Fólico (FA).

El descubrimiento del FA se produjo a principios de 1930 cuando Lucy Wills reconoció que un factor en la levadura era capaz de corregir la anemia macrocítica en mujeres embarazadas. Este hallazgo fue confirmado en estudios con animales y como resultado, se recomendó el consumo de suplementos de levadura o Marmite (un extracto de levadura) para las mujeres que padecían anemia macrocítica en Bombay. El FA se aisló primero de las espinacas en 1941, después de lo cual, fue sintetizado por Bob Stokstad en 1943 (Goh y Koren, 2008).

El FA, forma sintética del folato, es también denominado vitamina B₉. Es soluble en agua y no puede ser sintetizado por el cuerpo, por lo tanto, debe ser obtenido por medio de la dieta o mediante suplementos (Obican, 2010; De-Regil *et al.*, 2015).

Hay dos formas generales de folatos utilizadas en estudios biológicos: 1) los folatos en sí, derivados sustituidos del FA que aparecen naturalmente en los alimentos y 2) el FA, un ácido pteroylglutámico sintético, utilizado en suplementos y alimentos fortificados (Green, 2002).

El primero se encuentra en verduras de hoja verde, cítricos, legumbres e hígado. El folato alimentario existe como poliglutamato y tiene que ser convertido en monoglutamato por conjugasas en el intestino delgado para ser absorbido. Es relativamente lábil al calor; por lo tanto, una cantidad considerable puede ser destruida por la cocción, procesamiento y almacenamiento de los alimentos que lo contienen.

El FA, por su parte, existe como monoglutamato lo que lo hace más estable y que se absorba rápidamente sin necesidad de ser procesado. Se estima que solo el 50% del folato de los alimentos es absorbido, mientras que el FA en los alimentos fortificados se absorbe el 85% y el 100% del FA en suplementos vitamínicos es absorbido (Czeizel, 1996). En el organismo se almacena en el hígado y en el riñón (PubChem, NIH, US National Library of Medicine, [acceso el 19 de diciembre de 2019]).

El principal papel metabólico del folato es el transporte de unidades de un carbono, empleadas para regular la función del ácido desoxirribonucleico (ADN) y para sintetizar ADN y ácido ribonucleico (ARN) (Czeizel, 1996), ya que a partir del FA se obtienen bases nitrogenadas, aminoácidos y S-adenosín metionina, el cual es el principal donador de grupos metilo para el ADN

(Czeizel, 1996; Herrera *et al.*, 2016). Por lo tanto, el FA es esencial para el crecimiento y la diferenciación celular, así como para la reparación y la defensa del huésped (Obican, 2010).

2.3.1 Estructura química del FA.

La estructura química del FA está conformada por pteridina, ácido para-amino benzoico (PABA, por sus siglas en inglés) y uno o varios residuos de glutamato. La unión de los dos primeros a través de un puente metileno forma el ácido pteroico y su unión con el glutamato mediante un enlace peptídico, forma el FA (Figura 7). Este último carece de átomos de hidrógeno y posee solo un glutamato; lo que le brinda mayor estabilidad y biodisponibilidad que el folato (Herrera *et al.*, 2016) y tiene una masa molecular de 441,4 g/mol (PubChem, NIH, US National Library of Medicine, [acceso el 19 de diciembre de 2019]).

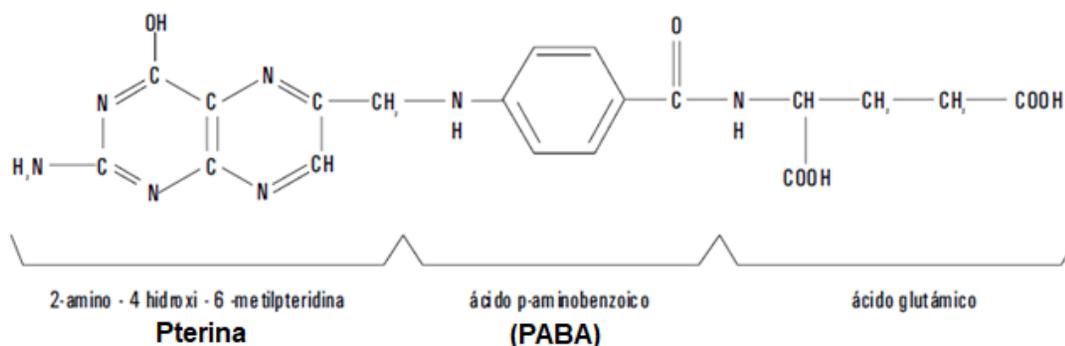


Figura 7. Estructura química del FA. El FA está conformado por pteridina, ácido para-amino benzoico (PABA, por sus siglas en inglés) y un residuo de glutamato (Tomado de Herrera *et al.*, 2016).

El folato, por su parte, corresponde a la forma reducida de la vitamina, ya que cuenta con dos o cuatro átomos de hidrógeno que forman el dihidrofolato y el tetrahidrofolato, respectivamente; y entre uno y seis residuos de glutamato (Goh y Koren, 2008; Herrera *et al.*, 2016).

Los humanos carecen de la enzima dihidropteroato sintetasa que cataliza la unión entre la pterina y el PABA (Herrera *et al.*, 2016), por lo tanto, el FA es un nutriente esencial que debe ser incorporado por medio de la dieta o multivitamínicos.

2.3.1 Bioquímica del folato.

Los folatos naturales se metabolizan en dos etapas. Inicialmente se transforman en monoglutamatos en la parte superior del intestino delgado, para luego ser absorbidos por la

membrana celular de la parte proximal del mismo intestino. Por su parte, los folatos sintéticos como el FA, son monoglutamatos, más estables y rápidamente absorbidos (Goh y Koren, 2008).

Intracelularmente, el metabolismo del folato se produce en el citoplasma (Goh y Koren, 2008; Herrera *et al.*, 2016). Los folatos poliglutamatos son hidrolizados a folylmonoglutamatos, luego a 5-methylH4PteGlu1 y por acción de la Methionina Sintasa se convierte en Monoglutamil tetrahidrofolato. Este monoglutamato sintetiza tres productos 10-formyltetrahidrofolato, Methylene tetrahidrofolato y 5-Methylene tetrahidrofolato. Estos tres productos son necesarios para la síntesis de anillos de purina, para la conversión de desoxiuridina monofosfato en desoxitiamina monofosfato y para la remetilación de homocisteína (HCY) a metionina, respectivamente (Goh y Koren, 2008). El 5-Methylen tetrahidrofolato es la forma primaria del folato en el suero y también la forma químicamente activa del FA (Figura 8).

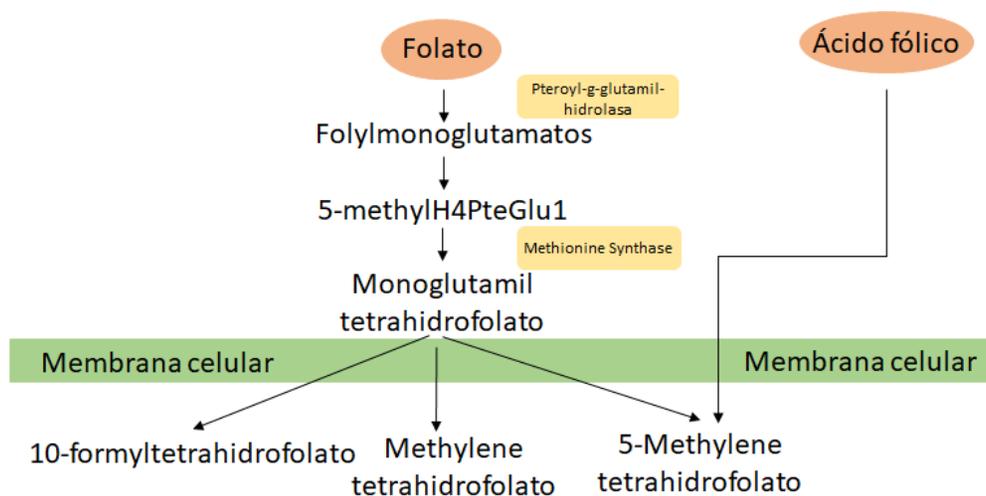


Figura 8. Vía metabólica del folato y del FA. A partir del folato se sintetizan tres productos 10-formyltetrahidrofolato, Methylene tetrahidrofolato y 5-Methylene tetrahidrofolato. El FA se metaboliza en 5-Methylene tetrahidrofolato. Figura realizada por Zita Bendahan.

Los folatos son necesarios para la síntesis de metionina a partir de HCY. La metionina se convierte en s-adenosilmetionina (SAM), que actúa como un cofactor para muchas reacciones de metilación incluyendo la metilación de ADN, ARN, proteínas y neurotransmisores. Su capacidad para transferir grupos metilo da como resultado la conversión de HCY de nuevo a metionina. Las unidades de carbono único de este producto final se usan para la biosíntesis de nucleótidos, incluyendo pirimidinas y purinas y para la síntesis de ADN. El folato también desempeña un papel en el metabolismo de las proteínas, mediando la interconversión de serina y glicina y desempeñando un papel en el catabolismo de la histidina (Goh y Koren, 2008) (Figura 9).

Por lo tanto, la deficiencia de folato en las células que se dividen rápidamente puede conducir a alteraciones en la síntesis del ADN y producir aberraciones y mutaciones cromosómicas (Goh y Koren, 2008).

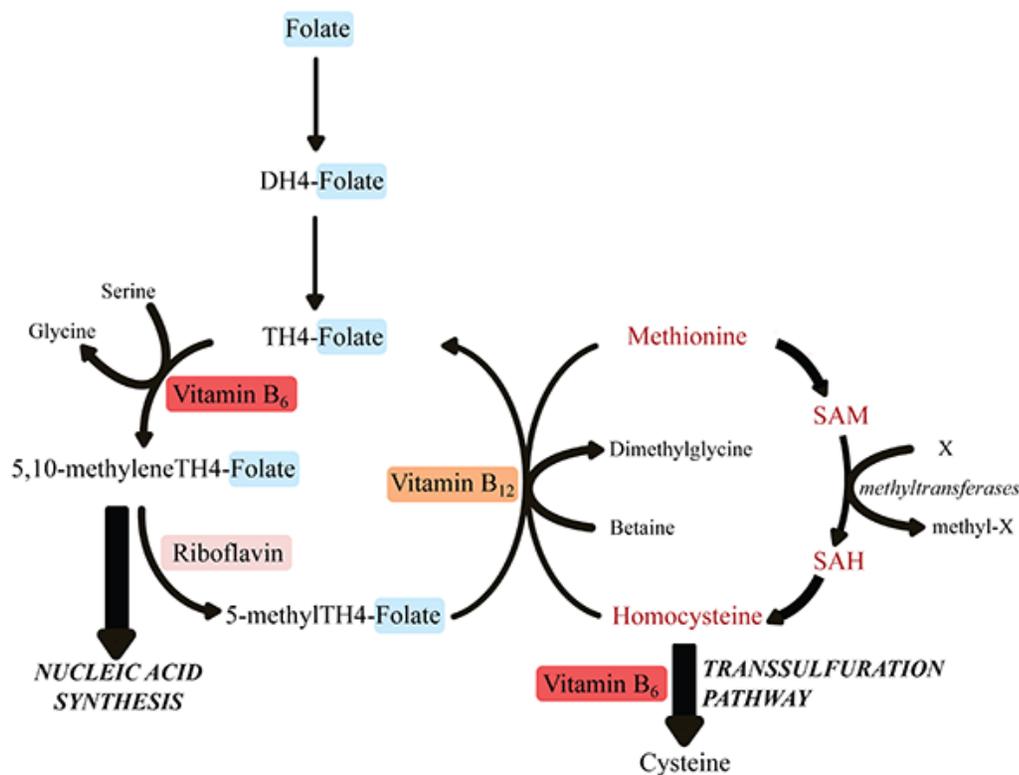


Figura 9. Participación del folato en otras vías metabólicas. Los folatos intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y neurotransmisores y en la conversión de HCY a metionina y viceversa (Tomado de Linus Pauling Institute, Oregon State University [acceso el 19 de diciembre de 2019]).

2.3.1 El FA y los DTN.

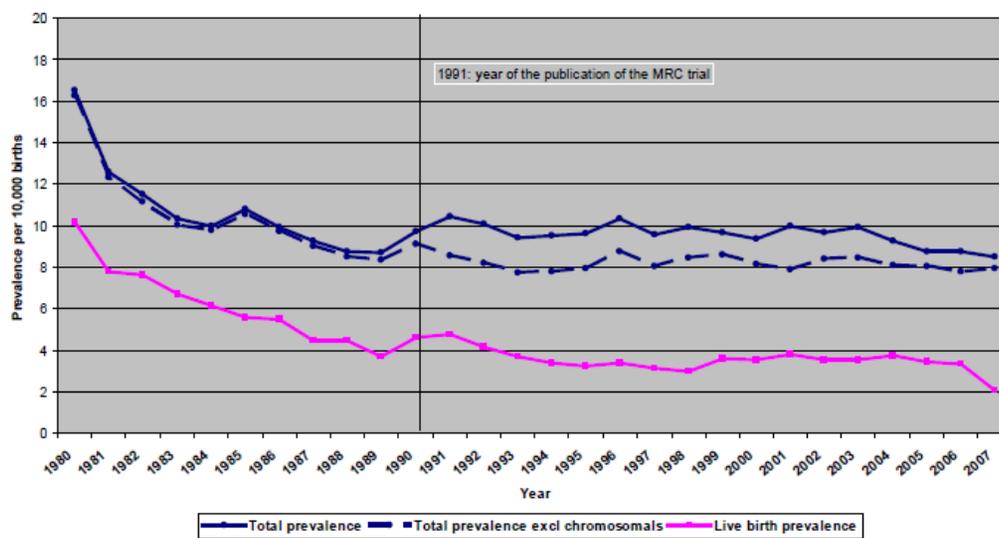
El tubo neural es la estructura a partir de la cual se desarrolla el cerebro y la médula espinal del bebé. Los DTN son un grupo de anomalías que se originan en la columna o el cerebro del feto durante el primer mes de embarazo y causan discapacidad física y mental severa (Lumley *et al.*, 2001). Los dos DTN más comunes son la espina bífida y la anencefalia. En la espina bífida, la columna vertebral del feto no llega a cerrarse del todo y suele haber un daño a los nervios que causa parálisis en las piernas. En la anencefalia, gran parte del cerebro y cráneo no se desarrolla; generalmente, los bebés nacen sin vida o mueren poco tiempo después de nacer. Los DTN pueden ocurrir como defectos aislados o con otros defectos de nacimiento. Síndromes como Joubert, Schisis y Hard presentan múltiples malformaciones y suelen incluir uno de estos defectos (Lumley *et al.*, 2001).

Ciertos tipos de células son particularmente sensibles a los folatos, lo que representa una de las principales alteraciones por deficiencia de folato. Las células embrionarias de la cresta neural tienen una expresión extremadamente alta de los receptores de folato, lo que indica una alta demanda de folato en este tipo de células en particular (Obican, 2010).

La asociación entre el desarrollo de los DTN y la carencia de FA fue sugerida inicialmente en 1960 cuando se demostró que la distribución geográfica y poblacional de las enfermedades se explicaba por factores nutricionales y no por factores genéticos exclusivos de una comunidad; pero la primera evidencia sobre la relación entre los micronutrientes y la prevención de los DTN se publicó en 1981 (Suárez-Obando *et al.*, 2010). Los suplementos de multivitaminas o folato antes del embarazo y durante los dos primeros meses de gestación ayudan a prevenir los DTN, sin aumentar el riesgo de aborto espontáneo o embarazo ectópico (Lumley *et al.*, 2001). Aunque el mecanismo exacto por el cual el FA facilita el cierre del tubo neural no es del todo conocido, se estima que hasta 70% de los DTN pueden ser prevenidos por suplementos con FA (De-Regil *et al.*, 2010).

A partir de 1980 se observó en Europa una reducción en la prevalencia de los DTN y a principios de los años 90 se demostró el efecto preventivo del FA sobre la formación de DTN, lo que motivó el desarrollo de campañas de prevención en muchos países europeos, evidenciándose su efecto desde 1992 (Eurocat Special Report, 2009) (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de anomalías cromosómicas y DTN entre 1980-2007 en Europa (Imagen tomada de Eurocat Special Report, 2009).



La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió que el nivel mínimo de folato asociado con el menor riesgo de sufrir DTN es de 906 nmol/L (De-Regil *et al.*, 2015). El consumo de 0,4 mg de FA diarios durante 20 semanas permite alcanzar una concentración plasmática de 1050 y 1340 nmol/L, óptima para la prevención de DTN. Por lo tanto, el consumo de FA debe iniciar cinco a seis meses antes de la concepción (Van Gool *et al.*, 2018).

2.3.2 El FA y formación de hendiduras orofaciales, específicamente el PH en humanos.

Los suplementos de multivitaminas o folato antes del embarazo y durante los dos primeros meses de gestación ayudan a prevenir los DTN. Wilcox *et al.*, [2007] encontró que el consumo de suplementos de FA tempranamente durante el embarazo (400 µg/día) se asoció con la reducción de un tercio del riesgo de padecer labio hendido aislado con o sin paladar hendido. También determinó que independientemente de los suplementos, las dietas ricas en frutas, verduras y otros alimentos que contienen alto contenido de folato redujeron también el riesgo. La menor incidencia de hendidura labial se encontró entre las mujeres que comieron dietas ricas en folato y también tomaron suplementos de FA y multivitaminas. Sin embargo, el FA no proporcionó ninguna protección contra el paladar hendido aislado en este estudio (Wilcox *et al.*, 2007).

Shaw *et al.*, [1995] realizó un estudio de casos y controles y encontró que las mujeres que tomaron multivitaminas periconcepcionales que contenían FA tuvieron una reducción del 25% ± 50% en el riesgo de tener hijos con hendiduras orofaciales. Tolarova y Harris [1995] encontró en un estudio prospectivo de intervención que el consumo de 10 mg diarios de FA disminuyó en un 65,4% la recurrencia de PH. Adicionalmente, redujo la aparición en un 82,6%, en las familias con mujeres afectadas o con un hijo previo con hendidura unilateral; sin embargo, no se observó reducción del riesgo en familias con historia previa de un niño con hendidura bilateral (Shaw *et al.*, 1995; Tolarova y Harris, 1995).

Czeizel *et al.* [1999] concluyó que ingerir suplementos de FA durante el periodo crítico de formación del labio y del paladar pueden evitar hendiduras aisladas en estas estructuras, pero no LPH en dosis de <1 mg de FA. Altas dosis de FA aislado (por ejemplo, 6 mg/día) durante este período crítico parecen ser eficaces para la reducción de las hendiduras orofaciales en este estudio, por lo que los autores sugieren utilizar con precaución dosis más allá de las fisiológicas debido a los posibles efectos secundarios que puedan desarrollarse (Czeizel *et al.*, 1999).

Existen reportes de hendiduras orales en descendientes de mujeres que ingirieron antagonistas de folato durante el embarazo, como metotrexato, amiriopterina (ácido 4-pteriloilglutámico) y anticonvulsivos (Shaw *et al.*, 1995; Hernández-Díaz *et al.*, 2000).

Aunque se reconoce el efecto protector de los folatos, el mecanismo por el cual algunas personas desarrollan niveles bajos de folato, presumiblemente predisponiendo a su descendencia a DTN y otros posibles defectos de nacimiento, como LPH, sigue siendo un tema de debate. Algunos estudios se han enfocado en las enzimas de la vía del folato, como 5,10 metilenotetrahidro- reductasa (MTHFR), que convierte 5,10 metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato. Estos estudios demostraron la asociación de una mutación C- T (C677T), que convierte una alanina en un residuo de valina en el gen MTHFR, en individuos con DTN. La variante C677T produce una enzima termolábil con actividad reducida. Esta característica se relaciona con niveles elevados de HCY plasmática y folato plasmático reducido debido a la actividad reducida de la enzima MTHFR. Los autores sugirieron que la homocigosidad para el alelo T o C, del polimorfismo C677T en mujeres, constituye un importante factor de susceptibilidad para el desarrollo de LPH (Martinelli *et al.*, 2001; Van Rooijl *et al.*, 2003). Goh *et al.* [2006], mediante un meta-análisis determinó que el uso de multivitamínicos fortificados con FA por las mujeres antes de la concepción y durante el primer trimestre del embarazo, se asocia con una disminución de varias malformaciones como DTN, anomalías cardiovasculares, hendiduras orales, anomalías del tracto urinario, hidrocefalia congénita, y defectos de las extremidades. Sin embargo, se necesitan ensayos aleatorizados para determinar qué vitaminas específicas están produciendo estos efectos protectores (Canfield *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 2006).

Los estudios descritos anteriormente sugieren efectos protectores de los suplementos con FA sobre los riesgos de hendiduras orofaciales, especialmente para LPH, pero todos ellos presentan limitaciones de datos y diseño, particularmente al carecer de aleatorización en los grupos de tratamiento y control y en el uso de intervenciones que combinan el FA con otros suplementos e impiden la identificación de los efectos del FA por sí solo. La asignación no aleatoria introduce sesgos de autoselección en el tratamiento, lo que puede confundir los resultados del estudio e introducir diferencias en los resultados entre los grupos tratados y no tratados, que no son propiamente el resultado del tratamiento. La mayoría de los estudios de intervención anteriores también tienen un pequeño tamaño de muestra y limitaciones de potencia.

Otros estudios no parecen apoyar el efecto protector del FA preconcepcional contra hendiduras orofaciales, ya sea en forma de tabletas o granos de cereales fortificados (Ray *et al.*, 2003). Adicionalmente, un ensayo clínico controlado aleatorizado que estudió los suplementos de FA no encontró evidencia de un efecto protector en casos de HL con o sin PH asociado con el consumo de suplementos de dicha vitamina (Czeizel y Dudas, 1992).

Czeizel [1996] encontró que el FA no tiene un efecto significativo sobre las hendiduras orales en un estudio aleatorizado húngaro (Czeizel, 1996; Bailey y Berry, 2005).

Hayes *et al.*, [1996] determinó en un estudio de casos y controles que los suplementos de FA no afectan el riesgo de fisuras orales. Sus resultados los atribuye a los mecanismos biológicos relacionados con la formación del labio y el paladar. En el momento del cierre del tubo neural, las células de la cresta neural se forman desde el ectodermo a lo largo de los márgenes laterales de la placa neural. Estas células experimentan una migración extensa tanto caudal como cefálica. El desarrollo de la cara y el paladar tiene lugar durante un período de tiempo más largo que el del tubo neural, y otros factores físicos y de desarrollo están involucrados. Por lo tanto, el papel de las células de la cresta neural es solo uno de una multitud de factores responsables del desarrollo de los tejidos orales y aunque la cresta neural está relacionada con los DTN y las hendiduras orales, los tipos celulares específicos, los mecanismos migratorios, y las vías de diferenciación pueden tener diferentes susceptibilidades al FA. Este estudio no demostró una asociación protectora entre el uso de suplementos de esta vitamina durante el período periconcepcional y el riesgo de hendiduras orales. Sin embargo, los hallazgos de este trabajo no minimizan la importancia de las recomendaciones actuales de que las mujeres en edad fértil consuman un suplemento diario de FA, ya que el efecto protector con respecto a los DTN ha sido consistentemente demostrado (Hayes *et al.*, 1996).

De acuerdo con los estudios previos, la administración de suplementos de FA durante el período periconcepcional ha sido bien documentada, resultando en una reducción sustancial de la aparición de DTN; sin embargo, si el uso específico del FA modifica el riesgo de otras anomalías congénitas como el LPH hasta el momento no es concluyente.

La evidencia científica disponible se ha analizado mediante cinco revisiones sistemáticas realizadas entre 2000-2019: Johnson y Little (2008); De-Regil *et al.*, (2015); Blanco *et al.*, (2016); Millacura *et al.*, (2017); Jahanbin *et al.*, (2018). Una de estas revisiones concluyó que no existe una fuerte evidencia de asociación entre las hendiduras orales y la ingesta de FA por sí solo; sin embargo, el uso de multivitamínicos de forma temprana en el embarazo puede proteger contra la formación de hendiduras orales específicamente LPH (Johnson y Little, 2008). La revisión realizada por De-Regil *et al.* [2015] concluye que el FA solo o combinado con vitaminas y minerales, previene los DTN, pero no tiene un efecto claro sobre otros defectos de nacimiento. Por su parte, las revisiones realizadas más recientemente por Blanco *et al.*, (2016); Millacura *et al.*, (2017), Jahanbin

et al., (2018) sugieren que el FA sí puede tener un efecto benéfico sobre la prevención del LPH no sindrómico (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de las revisiones sistemáticas que evaluaron el efecto del FA sobre la formación de LPH.

Autor	Año	Título	Conclusión
Johnson y Little	2008	Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging?	No existe una fuerte evidencia de asociación entre hendiduras orales e ingesta de FA por sí solo. Sin embargo, el uso de multivitamínicos de forma temprana en el embarazo puede proteger contra la formación de hendiduras orales específicamente LPH.
De-Regil <i>et al.</i>	2015	Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects	El FA solo o combinado con vitaminas y minerales, previene los DTN, pero no tiene un efecto claro sobre otros defectos de nacimiento.
Blanco <i>et al.</i>	2016	Maternal biomarkers of methylation status and nonsyndromic orofacial cleft risk: a meta-analysis	El nivel elevado de HCY en el plasma materno es un factor de riesgo para hendiduras orofaciales no sindrómicas en los hijos.
Millacura <i>et al.</i>	2017	Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: a meta-analysis	La fortificación con FA puede tener un efecto benéfico sobre el LPH no sindrómico.
Jahanbin <i>et al.</i>	2018	Maternal Folic Acid Supplementation and the Risk of Oral Clefts in Offspring	Suplementos de FA durante las etapas tempranas del embarazo reduce el riesgo de LPH no sindrómico y PH en niños.

Tabla diseñada por Zita Bendahan

2.3.3 El FA y la formación de hendiduras orofaciales en animales.

Los modelos animales en ratas y ratones han permitido continuar estudiando el efecto del FA sobre la formación del LPH. El diseño experimental varía entre los estudios: dos de ellos suministraron el suplemento de FA a través del alimento de los animales hembras antes del apareamiento (Burgoon *et al.*, 2002; Barua *et al.*, 2014). Otros estudios lo administraron a través de inyecciones, bien sea de forma intraperitoneal (Reynolds *et al.*, 2002) o subcutánea durante la gestación (Bienengraber *et al.*, 2001) o por vía intravenosa (Akpınar *et al.*, 2016). Otros estudios cultivaron *ex vivo* embriones de ratón tratados con FA (Yao *et al.*, 2011) y FA y ácido retinoico (Kriangkrai *et al.*, 2017).

Las dosis de FA suministradas varían desde dietas deficientes en FA con una dosis mínima de 0,09 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de peso (Burgoon *et al.*, 2002) hasta 226,5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de peso (Akpinar *et al.*, 2016). Algunos estudios comparan entre sí diferentes concentraciones de FA (Barua *et al.*, 2014; Akpinar *et al.*, 2016), sin embargo, otros analizaron el efecto del FA comparado con metionina de forma independiente y combinada (Reynolds *et al.*, 2002) y lo compararon también con el ácido retinoico (Yao *et al.*, 2011; Kriangkrai *et al.*, 2017).

De los nueve estudios en modelos animales analizados, siete de ellos sugieren un efecto protector del FA contra el PH (Paros y Beck, 1999; Bienengraber *et al.*, 2001; Burgoon *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2011; Scheller *et al.*, 2013; Kriangkrai *et al.*, 2017); los otros dos estudios no analizan este aspecto debido a que uno de ellos analizó el remodelado óseo en casos de periodontitis (Akpinar *et al.*, 2016), el otro estudio determinó alteraciones genéticas posiblemente relacionadas con otras patologías (Barua *et al.*, 2014) (Tabla 4).

El mecanismo de acción del FA se ha explicado igualmente mediante modelos animales que convergen en la activación de genes corriente abajo del Factor de Crecimiento Transformante β (*TGF β*). Uno de los cuales concluyó que el FA induce la expresión del receptor II del *TGF β* (*TGF β RII*) en MSC de paladar de ratones en los que se observó la reparación de las hendiduras palatinas inducidas por ácido retinoico (Yao *et al.*, 2011). También, ha sido reportado el efecto del FA sobre el *TGF β 3*. En ratones *knockout* para el gen del *TGF β 3* (*TGF β 3* *-/-*) se observó mejoría en las HP asociada a suplementos de FA en la dieta (López-Gordillo *et al.*, 2019). Igualmente, dietas deficientes en FA causaron HP en ratones y alteración de la expresión del *TGF β 3*; sin embargo, dichas hendiduras pudieron ser reparadas mediante la colocación exógena de *TGF β 3* (Maldonado *et al.*, 2011). Más específicamente, la fosforilación de Stat3 en la vía de señalización *RUNX/Core binding factor (Cbfb)-TGF β 3* como consecuencia de la aplicación de FA permitió reparar la formación del paladar en ratones mutantes con HP (Sarper *et al.*, 2019).

Tabla 4. Resumen de los estudios sobre modelos animales que evaluaron el efecto del FA sobre la formación del LPH.

Autor	Año	Título	Conclusión
Paros y Beck	1999	Folinic acid reduces cleft lip in A/WySn mice	El FA administrado continuamente durante el periodo crítico del desarrollo, reduce la frecuencia del LPH.
Bienengraber <i>et al.</i>	2001	It is possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An	El porcentaje de PH completo fue significativamente menor en el grupo con folato (4%) comparado con el grupo sin

		experimental study	folato (53%). Adicionalmente, se presentó 22% menos microgenia y 24% menos microglosia en el grupo con folato.
Burgoon <i>et al.</i>	2002	Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model	El 80% de los ratones alimentados con una dieta deficiente en FA presentaron hendidura de paladar secundario, comparado con el 37% de los que consumieron una dieta con 2 mg/kg.
Reynolds <i>et al.</i>	2003	Combination therapy with folic acid and methionine in the prevention of retinoic acid-induced cleft palate in mice	El FA disminuye la incidencia de PH a 6,3%, metionina (ME) a 5,7% y el grupo con FA+ME no presentó PH.
Yao <i>et al.</i>	2011	Folic acid rescue of ATRA-induced cleft palate by restoring the TGF β signal and inhibiting apoptosis	El FA permite el desarrollo y fusión del paladar en cultivos en los que su formación había sido inhibida por ácido retinoico, desarrollando PH.
Scheller <i>et al.</i>	2013	Lower Concentrations of B-Vitamin Subgroups in the Serum and Amniotic Fluid Correlate to Cleft Lip and Palate Appearance in the Offspring of A/WySn Mice	La reducida disponibilidad de algunos subgrupos de vitamina B (B1, B5 y FA) en el líquido amniótico y el suero se relacionó con un aumento en la aparición de hendiduras en ratones A/WySn.
Barua <i>et al.</i>	2014	Increasing maternal or post weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offsprings	Los ratones expuestos a altas dosis de FA presentaron vocalizaciones ultrasónicas elevadas, ansiedad e hiperactividad. Estos hallazgos sugieren que a pesar de que el FA juega un rol importante en los mecanismos celulares de los mamíferos, el efecto positivo se puede afectar a altas concentraciones de FA.
Akpinar <i>et al.</i>	2016	Comparative effects of riboflavin, nicotinamide and folic acid on alveolar bone loss: A morphometric and histopathologic study in rats	La administración de diferentes dosis de FA sistémico aumenta la actividad de los osteoblastos, reduce el número de osteoclastos y la pérdida ósea alveolar en modelos experimentales de periodontitis en ratas.
Kriangkrai <i>et al.</i>	2017	Pretreatment Effect of Folic Acid on 13-Cis-RA-Induced Cellular Damage of Developing Midfacial Processes in Cultured Rat Embryos	El FA reduce los efectos teratogénicos de 13-cis-ácido retinoico en los tejidos del proceso facial medio.

Tabla diseñada por Zita Bendahan

2.3.4 El FA y su efecto *in vitro*.

La absorción celular del folato se produce principalmente por endocitosis y es mediada por receptores de alta afinidad al folato, como el receptor alpha del folato (FR α) y el transportador de FA acoplado a protones. FR α es una proteína rica en cisteína que se une al FA en la membrana celular y permite su paso hacia el citoplasma, además, es crítico para el desarrollo embrionario. El ambiente ácido del endosoma promueve que el folato sea liberado y transportado al citoplasma por medio de un transportador de FA acoplado a protones (Hwang *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2017).

El FA es necesario para la división celular, específicamente en condiciones donde las células requieren rápida proliferación celular y contribuye con el estado de metilación de moléculas celulares esenciales como el ADN, ARN y proteínas (Goh y Koren, 2008). Sin embargo, poco se conoce con respecto a la diferenciación de las células mesenquimales del paladar hacia osteoblastos después de la fusión de los procesos palatinos.

Ciertos tipos celulares son particularmente sensibles a los folatos, y su deficiencia puede ocasionar alteraciones. Específicamente, las células embrionarias de la cresta neural tienen una expresión extremadamente alta de los receptores de folato, lo que indica una alta demanda de este (Obican, 2010; Melo *et al.*, 2017).

Siete estudios han analizado el efecto del FA en la formación de tejido óseo *in vitro*, sobre diferentes tipos celulares no cancerosos: células mesenquimales de médula ósea (Santos *et al.*, 2017), de paladar de ratón (Xiao *et al.*, 2006), células de la cresta neural de embriones de ratón (Melo *et al.*, 2017), osteoblastos (Herrmann *et al.*, 2007), osteoclastos (Herrmann *et al.*, 2007), líneas celulares de placenta humana (Ahmed *et al.*, 2016) y directamente sobre embriones de gallo (Kobus *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios adicionan las vitaminas directamente a los cultivos celulares a través del medio de cultivo, sin embargo, Santos *et al.*, [2017] expuso los cultivos celulares a nanopartículas de hidroxapatita cargadas con FA y por su parte, Kobus *et al.*, [2009] inyectó las sustancias en el saco vitelino de gallos. Las concentraciones ensayadas alcanzan niveles similares a 1,1 mM de FA y en dos estudios analizan el efecto combinado del FA y la HCY (Kobus *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2017).

Los resultados de cinco de los estudios analizados refuerzan el efecto del FA en la prevención de LPH (Xiao *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017). Por el contrario, Kobus *et al.* [2009] concluyó que las altas concentraciones de FA alteran la diferenciación neural durante los estadios tempranos del desarrollo embriológico y

Herrmann *et al.* [2007] encontró que la acumulación de HCY causada por las bajas concentraciones de folato no afecta la actividad de los osteoblastos humanos primarios (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los estudios *in vitro* que evaluaron el efecto del FA.

Autor	Año	Concentración de FA (mM)	Tipo de célula	Forma de administración	Conclusión
Xiao <i>et al.</i>	2006	10^{-1}	MSC de paladar de embrión de ratón	Directamente sobre los cultivos celulares.	La proliferación celular es dependiente de la dosis de FA.
Herrmann <i>et al.</i>	2007	$0-10^{-3}$	Osteoblastos humanos	Directamente sobre los cultivos celulares.	Acumulación de HCY disminuye la concentración de folato, Vitamina B ₆ y B ₁₂
Herrmann <i>et al.</i>	2007	$0-10^{-3}$	Osteoclastos obtenidos a partir de PB- MSC	Directamente sobre los cultivos celulares.	Aumento significativo de la actividad osteoclástica en cultivos con bajas concentraciones de FA, B ₁₂ y B ₆ . La deficiencia simultánea de las tres vitaminas estimula la reabsorción dentinal y la actividad osteoclástica.
Kobus <i>et al.</i>	2009	10^{-7}	Huevos fértiles de gallo	Inyección en el saco vitelino	Concentraciones elevadas de FA alteran la diferenciación de células neurales <i>in vitro</i> .
Ahmed <i>et al.</i>	2016	$<10^{-2}$	HTR-8/SVneo BeWo explantes de tejido de placenta humana	Directamente sobre los cultivos celulares.	No se encontraron diferencias significativas en la proliferación celular entre las concentraciones de FA
Melo <i>et al.</i>	2017	$10^{-2}-10^{-4}$	Células de cresta neural de embriones de ratón	Directamente sobre los cultivos celulares.	Concentración elevada de HCY altera la morfogénesis de las células neurales en mamíferos. Refuerza que el efecto protector del folato se debe a su habilidad de prevenir la teratogénesis inducida por HCY.

Santos <i>et al.</i>	2017	<1.1	MSC de médula ósea	Partículas de hidroxiapatita cargadas con FA	Las partículas de hidroxiapatita+FA pueden mejorar el efecto de la Hidroxiapatita en la diferenciación de osteoblastos.
----------------------	------	------	--------------------	--	---

Células mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés)

Tabla diseñada por Zita Bendahan

2.4 Proteínas Morfogenéticas Óseas.

Estudios previos en modelos animales han reportado posibles vías de acción del FA que convergen en la activación del *TGFβ*, actuando sobre genes que interactúan o se encuentran corriente abajo del *TGFβ2* (Yao *et al.*, 2011) o del *TGFβ3* (Maldonado *et al.*, 2011; Sarper *et al.*, 2019; López-Gordillo *et al.*, 2019).

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son un subgrupo perteneciente a la superfamilia del *Tgfβ* (Wang *et al.*, 2014; Nickel y Mueller, 2019). Consisten en moléculas diméricas con dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro simple. Cada monómero es biosintetizado como una cadena polipeptídica de más de 400 aminoácidos (Phillips, 2003). Su actividad fue identificada por primera vez en 1960, pero fue en la década de los 80 cuando se reconocieron como las proteínas responsables de inducir la formación ósea (Chen *et al.*, 2004).

Las BMP actúan sobre varios tipos celulares y regulan diferentes procesos óseos. También participan en la embriogénesis y regulan la homeostasis en los tejidos del adulto, ayudando a mantener la integridad de las articulaciones, iniciar la reparación de fracturas y el remodelado vascular (Wang *et al.*, 2014). Las células blanco de las BMP usualmente se diferencian hacia el linaje osteoblástico y producen fosfatasa alcalina (ALP) y tejido mineralizado (Granjeiro *et al.*, 2005).

Se han identificado 15 BMP, las cuales se han dividido en subfamilias de acuerdo con las similitudes en la secuencia de aminoácidos (Granjeiro *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014). BMP2/4/6/7/9 son reconocidas como las BMP osteogénicas, debido a su importante capacidad para inducir formación ósea. Por su parte, la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) es indispensable para la formación de hueso endocondral (Wang *et al.*, 2014).

Las isoformas de *TGFβ* y sus receptores se expresan en diferentes ubicaciones y tiempos de desarrollo del paladar (Yao *et al.*, 2011) y se ha visto que la señalización mediada por BMP es esencial para la palatogénesis; observándose expresión de BMP2, 3, 4 y 5 en el paladar del ratón, tanto en el epitelio como en el mesénquima, antes, durante y después de la fusión de las

prolongaciones palatinas (Lu *et al.*, 2000). En ratones transgénicos a los que se les inducía formación de hendiduras con ácido retinóico, se observó una reducción significativa de la expresión de BMP2, 4 y 5 (Lu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005).

2.4.1 Vía de señalización de las BMP.

La acción de las BMP es mediada por receptores heterotetraméricos con actividad serina/treonina cinasa. Estos receptores se denominan Receptor de BMP tipo 1 (BMPR1) y tipo 2 (BMPR2) (Nickel y Mueller, 2019). Se conocen tres receptores BMPR1, conocidos como Alk2, 3, 6 (Brederlau *et al.*, 2004). El BMPR2 se encuentra activo debido a su constitución y ayuda a fosforilar y activar al BMPR1 cuando se une a su ligando, es decir a una de las BMP (Figura 10) (Granjeiro *et al.*, 2005; Beederman *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Nickel y Mueller, 2019).

La formación del complejo BMP-BMPR1-BMPR2 activa dos vías de señalización, una de ellas es mediada por proteínas Smad y la otra por la cinasa p38 activada por mitógenos (p38/MAPK ó p38) (Figura 10) (Granjeiro *et al.*, 2005).

En la vía de las proteínas Smad o vía canónica, la unión de BMP a su receptor fosforila a las proteínas Smad1/5/8 (Nickel y Mueller, 2019). Posteriormente, se forma un complejo con Smad4, el cual es translocado al núcleo de la célula para activar ciertos factores de transcripción (Smith *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Beederman *et al.*, 2013; Nickel y Mueller, 2019). Una vez en el núcleo el complejo Smad1/5/8/4 coopera con otras proteínas de unión al ADN para inducir al *distal-less homeobox 2/5* (*DLX2/5*) y al factor de transcripción 2 relacionado a Runt (*RUNX2*), los cuales estimulan la expresión de genes relacionados con la osteogénesis, como fosfatasa alcalina (*ALP*), colágeno tipo 1 (*COL1*), sialoproteína ósea (*BSP*), osteocalcina (*OCN*) y osteopontina (*OP*) (Rath *et al.*, 2011). Smad6 puede formar un complejo no funcional con Smad4 e inhibir la señalización de BMP en la formación ósea y Smad7 se une al receptor BMPR1 activado evitando que active a Smad1/5/8 (Figura 10) (Beederman *et al.*, 2013).

En la vía no canónica o vía de la p38/MAPK corriente abajo de la cinasa 1 activada por TGF β (TAK1), el TGF β y las BMP activan la TAK1, que permite la activación de p38. Todavía se desconocen los eventos a nivel molecular que generan la activación de esta vía (Nickel y Mueller, 2019). Sin embargo, Relaxin, miembro de la familia de la insulina/RI α , puede fosforilar a TAK1 y colaborar con BMP2, activando la vía de señalización de p38 y promoviendo así la osteogénesis (Rodríguez-Carballo *et al.*, 2016). Corriente abajo de TAK1, se activan las proteínas cinasas de especificidad dual (MKK3 y MKK6) pertenecientes a la familia serina/treonina proteína cinasa (STE7) y éstas, a su

vez, fosforilan cada una de forma independiente a p38 (Chen *et al.*, 2012). Estos eventos continúan con la activación de Osterix (*OSX*) en las serinas Ser77 y Ser33. *OSX* se une con *RUNX2* para aumentar su poder transcripcional y activar a *COL1*. La vía independiente de Smad tiene una importante contribución en la diferenciación de los osteoblastos y la formación de hueso (Figura 10) (Chen *et al.*, 2012; Ebioscience [acceso el 27 de septiembre de 2019]).

Tanto la vía de Smad como la de p38/MAPK convergen en la expresión de *RUNX2*, el cual controla la diferenciación de las células precursoras mesenquimales en preosteoblastos (Chen *et al.*, 2012). En un estudio fue demostrado que la vía de señalización dependiente del receptor BMPR1 tipo a (BMPR1a) es uno de los reguladores principales de la fusión del labio y del paladar y de la formación dental; la inactivación de este gen ocasiona LPH y agencias dentales. BMPR1 tipo b (BMPR1b) es expresado en los procesos craneofaciales, sin embargo, todavía debe estudiarse más sobre su función (Figura 10) (Liu *et al.*, 2005).

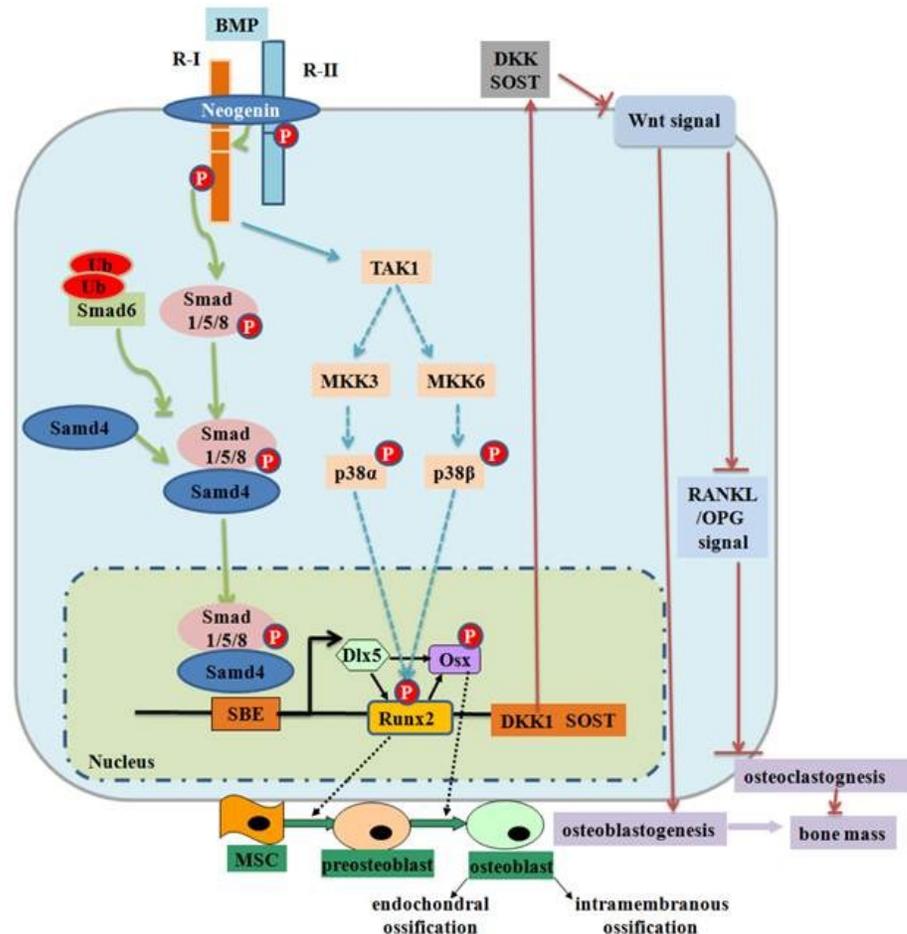


Figura 10. Vías de señalización de las BMP. La formación del complejo BMP-BMPR1-BMPR2 activa dos vías de señalización, una de ellas es mediada por proteínas Smad y la otra por la cinasa p38 activada por mitógenos (p38/MAPK) (Imagen tomada de Chen *et al.*, 2012).

La vía de señalización Smad2/4 y p38/MAPK regula la expresión de p21 en células mesenquimales de las prolongaciones palatinas, que junto con los factores de transcripción Snail 1 y 2 promueven la apoptosis y la desintegración de las células mesenquimales, procesos indispensables para la fusión de los procesos palatinos (Murray y Schutte, 2004).

2.4.2 Proteína morfogenética ósea 2 (BMP2).

BMP2 fue aislada por primera vez en 1965 por Urist y colaboradores y es uno de los principales factores que inducen la diferenciación osteogénica (Park *et al.*, 2019).

El gen que codifica para la BMP2 está localizado en el locus 20p12. Esta proteína madura existe como un homodímero, en el cual las dos moléculas de BMP están unidas por un puente disulfuro a través de un residuo de siete cisteínas, lo cual la mantiene activa, a diferencia de su forma monomérica (El Bialy *et al.*, 2017). La BMP2 humana madura (homodímero) contiene 114 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 30-32 kDa (Yang *et al.*, 2014; El Bialy *et al.*, 2017), comparte el 92.7% de la secuencia de aminoácidos con *Ratus Norvegicus* y 91.9% con *Mus musculus*, pero comparte solo el 62.3% con BMP4 (Uniprot [acceso el 1 de septiembre de 2019]). La proteína monomérica tiene un peso molecular esperado de ~18 kDa, mientras que la precursora pesa ~60 kDa. Los heterodímeros de BMP2 se encuentran tanto *in vivo* como *in vitro* y son los factores más efectivos en la vía de señalización, comparados con sus homodímeros (Yang *et al.*, 2014).

BMP2 induce la proliferación de los condrocitos, la formación de hueso endocondral, el crecimiento longitudinal óseo, reparación de hueso y cartílago. Adicionalmente, induce la formación o calcificación ectópica de hueso a través de la diferenciación de células mesenquimales, células madre, células vasculares del músculo liso en células del hueso y cartílago (Fritz *et al.*, 2006). BMP2 es la segunda BMP con mayor potencial osteoinductor, después de la BMP9, ya que estimula la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos a través de la vía de señalización de Smad (Yang *et al.*, 2014).

La importancia de BMP2 en la palatogénesis se empezó a evidenciar mediante modelos de investigación en ratones con paladar hendido. En estos, la HP era inducida mediante aplicación de ácido retinóico y se asoció con expresión disminuida de BMP2, 4 y 5 (Lu *et al.*, 2000). Evidencia adicional se obtuvo mediante el estudio de ratones transgénicos con inactivación del Receptor de activina A tipo 1 (*ALK2*) o *BMPR1a*, los cuales desarrollaban hendiduras orofaciales (Liu *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se ha visto que la señalización mediada por BMP es esencial para la palatogénesis; observándose expresión de BMP2, 3, 4 y 5 en paladar de ratón, tanto en el epitelio como en el mesénquima, antes, durante y después de la fusión de las prolongaciones palatinas (Lu *et al.*, 2000;; Parada y Chai, 2012). En el mesénquima adyacente a la línea media durante la fusión de los procesos palatinos se observa una elevada expresión de BMP2, mientras que la señalización mediada por BMP4 y 7 no fue esencial para este proceso, según lo demostrado mediante ratones *knockout*. Por lo tanto, se cree que la señalización mediada por BMP2 es clave para que se lleve a cabo el proceso de la palatogénesis (Escobar *et al.*, 2013). También se ha visto ARN mensajero (ARNm) en el primordio facial de embriones de pollo y mamíferos (Parada y Chai, 2012).

El tejido blando desorganizado del LPH muestra expresión reducida de BMP2 y 4, sin embargo, se observa proliferación y diferenciación celular, especialmente en la señalización que contribuye con el remodelado óseo (Krivicka *et al.*, 2013). BMPR1a y BMPR1b están expresados de forma intercalada en el paladar primario; el primero es esencial para la proliferación y señalización en esa zona, si se pierde el gen en las células de la cresta neural, se origina una hendidura en el paladar secundario debido a la disminución en la proliferación de las células mesenquimales (Smith *et al.*, 2013). Se ha evidenciado que Smad1/5/8 fosforilado (pSmad1/5/8), el cual indica la activación de la vía de señalización de BMP, se expresa únicamente en el tejido mesenquimal palatino cercano a la nariz, a pesar de que BMP2 y BMP4 se expresan homogéneamente en todo el tejido mesenquimal del paladar (Parada y Chai, 2012).

BMP2 puede activar las vías de señalización de las cinasas c-Jun N-terminal 1/2 (JNK) y p38 e inducir la diferenciación de células osteoblásticas (Guicheux *et al.*, 2003).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El FA es una vitamina del complejo B, hidrosoluble, presente en legumbres y vegetales de hoja verde; es la forma sintética y más estable del folato que se encuentra en suplementos y se le agrega a los alimentos fortificados. Constituye un nutriente esencial, que el hombre no puede sintetizar y, por tanto, tiene que incorporarlo a través de la dieta (Obican, 2010; De-Regil *et al.*, 2015).

La deficiencia de esta vitamina se ha relacionado con una variedad de trastornos, incluyendo DTN (Barua *et al.*, 2014), los cuales se previenen entre 50-70% de los casos mediante el consumo de FA antes del embarazo (Kobus *et al.*, 2009). Según la OMS, el nivel mínimo de folato asociado con el menor riesgo de sufrir DTN es de 906 nmol/L, lo cual se puede alcanzar con el consumo de la dosis suplementaria diaria durante cuatro semanas (De-Regil *et al.*, 2015). Las deficiencias de FA, vitamina B₆ y B₁₂ favorecen el aumento de los niveles plasmáticos de HCY, la cual disminuye la metilación del ADN, favoreciendo su ruptura, la apoptosis en el sistema nervioso y los DTN (Kobus *et al.*, 2009).

El efecto del FA en la formación de hendiduras orofaciales es aún controversial. Revisiones sistemáticas realizadas recientemente (Blanco *et al.*, 2016; Millacura *et al.*, 2017; Jahanbin *et al.*, 2018) sugieren que puede tener un efecto benéfico sobre la prevención del LPH no sindrómico. Sin embargo, todavía no existe consenso al respecto. Otras revisiones sistemáticas concluyeron que el FA, solo o combinado con otras vitaminas, previene los DTN (De-Regil *et al.*, 2015) pero no existe fuerte evidencia sobre la asociación entre el LPH y la ingesta de FA aislado o en multivitamínicos (Johnson y Little, 2008).

Los modelos animales en ratas y ratones han permitido continuar estudiando el efecto del FA sobre la formación del LPH, sugiriendo que previene la formación del PH (Bienengraber *et al.*, 2001; Burgoon *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2011; Scheller *et al.* 2013; Kriangkrai *et al.* 2017). Sin embargo, la variabilidad en los diseños experimentales ha impedido establecer una asociación entre estas variables y comprender el mecanismo de acción de la vitamina durante la formación del paladar.

Por otra parte, se conoce que las células son muy susceptibles al déficit de folatos en periodos de gran actividad metabólica como el de la embriogénesis y que los folatos y el FA intervienen en procesos fundamentales como la síntesis proteica y la formación del ADN (López-Camelo *et al.*, 2010). Estudios *in vitro*, refuerzan el efecto del FA en la prevención de LPH (Xiao *et*

al., 2006; Herrmann *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017). Sin embargo, todavía no se conoce a profundidad su efecto sobre los diferentes tipos celulares involucrados en la formación de estructuras como el paladar, ni se tiene claridad sobre cómo se induce su efecto protector a nivel celular y molecular.

Estudios epidemiológicos, revisiones realizadas a partir de estudios clínicos, estudios *in vivo* en animales y estudios *in vitro* han mostrado una posible asociación del FA y la prevención del LPH. Sin embargo, la heterogeneidad en los protocolos de tratamiento, en relación con la dosis y el método de administración del FA, así como la diversidad de tipos de células sobre los cuales fue aplicado a nivel *in vitro*, no ha permitido establecer de forma definitiva el efecto protector del FA sobre la formación del LPH. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones que permitan entender el mecanismo de acción de dicha vitamina en los procesos de formación de las estructuras orales, específicamente del paladar.

4. JUSTIFICACIÓN.

Los suplementos de multivitaminas o folato antes del embarazo y durante los dos primeros meses de gestación ayudan a prevenir los DTN. Aunque el mecanismo exacto por el cual el FA facilita el cierre del tubo neural no es del todo conocido, se estima que hasta 70% de los DTN pueden ser prevenidos por suplementos con FA (De-Regil *et al.*, 2010). La OMS definió que el nivel mínimo de folato asociado con el menor riesgo de sufrir DTN es de 906 nmol/L, lo cual se puede alcanzar con el consumo de la dosis suplementaria diaria durante cuatro semanas (De-Regil *et al.*, 2015).

Revisiones sistemáticas basadas en estudios clínicos (Blanco *et al.*, 2016; Millacura *et al.*, 2017; Jahanbin *et al.*, 2018) han demostrado el efecto protector del FA en la formación del LPH, la malformación congénita craneofacial más común y la cuarta anomalía congénita más prevalente a nivel general (ACPA, 2009). Sin embargo, otros estudios consideran el uso de multivitamínicos, pero no del FA aislado, como el factor responsable de prevenir la formación del LPH (Johnson y Little, 2008) y DTN (De-Regil *et al.*, 2015), por lo que todavía existe controversia al respecto.

Los modelos animales en ratas y ratones han permitido continuar estudiando el efecto del FA sobre la formación del LPH. No obstante, la mayoría de los estudios sugieren un efecto protector del FA contra el PH (Bienengraber *et al.*, 2001; Burgoon *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2011; Scheller *et al.*, 2013; Kriangkrai *et al.*, 2017), sin embargo; la heterogeneidad en los modelos experimentales hace difícil establecer si efectivamente el FA previene el desarrollo de estas hendiduras.

Las células son muy susceptibles al déficit de folatos en periodos de gran actividad metabólica, como el de la embriogénesis. A nivel molecular los folatos y el FA intervienen en procesos fundamentales como la síntesis proteica y la formación del ADN (López-Camelo *et al.*, 2010). Adicionalmente en estudios *in vitro*, se ha determinado que el FA incrementa la actividad osteoblástica, disminuye el número de osteoclastos y reduce la pérdida ósea asociada a la periodontitis (Akpınar *et al.*, 2016), además, puede contribuir en la osteogénesis y regeneración ósea (Santos *et al.*, 2017).

Sin embargo, no se conoce a profundidad el efecto del FA sobre células humanas involucradas en la formación de estructuras como el paladar, ni se tiene claridad sobre la vía de señalización que modula su efecto a nivel celular y molecular e induce su posible efecto protector sobre la formación del LPH.

Por esta razón, se requieren estudios donde se determinen los efectos inducidos por la aplicación del FA a nivel celular, que permitan comprender mejor el mecanismo de acción de dicha vitamina en los procesos de formación de las estructuras orales, específicamente del paladar.

5. SITUACIÓN ACTUAL.

Los DTN son malformaciones congénitas del cerebro y la espina dorsal con las que se estima que nacen aproximadamente 300.000 bebés anualmente, y fallecen aproximadamente 88.000 de estos, ubicando a los DTN entre las cinco causas más frecuentes de muerte neonatal a nivel mundial. En América la prevalencia promedio es de 11,5 por cada 10.000 nacidos vivos (Zaganjor *et al.*, 2016) y en Colombia, el ECLAMC reportó una prevalencia de 9,9 por cada 10.000 nacidos vivos entre 2001 y 2007 (Suárez-Obando *et al.*, 2010). En los países en desarrollo el 29% de las muertes neonatales se deben a defectos congénitos visibles. La espina bífida es el DTN más común, seguido por anencefalia y encefalocele (De-Regil *et al.*, 2015).

A pesar de que la prevalencia de los DTN varía dependiendo del país, esta ha disminuido, principalmente en los países desarrollados. Los suplementos de multivitaminas o folato antes del embarazo y durante los dos primeros meses de gestación ayudan a prevenir los DTN. Aunque el mecanismo exacto por el cual el FA facilita el cierre del tubo neural no es del todo conocido, se estima que hasta 70% de estas anomalías pueden ser prevenidas mediante el consumo de suplementos con FA. Por lo cual, la OMS definió que el nivel mínimo de folato asociado con el menor riesgo de sufrir DTN es de 906 nmol/L (De-Regil *et al.*, 2015). El consumo de 4 mg de FA diarios durante 20 semanas permite alcanzar una concentración plasmática de 1050 and 1340 nmol/L, óptima para la prevención de DTN. Por lo tanto, el consumo de FA debe iniciar 5-6 meses antes de la concepción (Van Gool *et al.*, 2018).

De acuerdo con la ACPA, el LPH es la malformación congénita craneofacial más común y la cuarta anomalía congénita más prevalente a nivel general (ACPA, 2009). Las últimas cifras disponibles de la OMS reportan que la incidencia mundial de las hendiduras orales es de 15,4:10.000 nacidos vivos; y en Sudamérica es de 17,4:10.000 nacidos vivos, de las cuales el 30% del LPH es sindrómico, y el 70% es aislado (Guarnizo, 2017). En Colombia, se registró una incidencia de 5,66:10.000 nacidos vivos, de los cuales el 37,83% corresponde a LPH, siendo más prevalente en los hombres (53,11%) (Guarnizo, 2017).

Revisiones sistemáticas basadas en estudios clínicos (Blanco *et al.*, 2016; Millacura *et al.*, 2017; Jahanbin *et al.*, 2018) han sugerido un efecto protector del FA en la formación del LPH. Sin embargo, otros estudios consideran el uso de multivitamínicos, pero no del FA aislado, como el factor responsable de prevenir la formación del LPH (Johnson y Little, 2008) y los DTN (De-Regil *et al.*, 2015), por lo que todavía existen controversias al respecto.

Los estudios en animales también dieron evidencias del efecto protector del FA contra el PH (Bienengraber *et al.*, 2001; Burgoon *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2011; Scheller *et al.*, 2013; Kriangkrai *et al.*, 2017).

Adicionalmente, está comprobado que esta vitamina incrementa la actividad osteoblástica, disminuye el número de osteoclastos y reduce la pérdida ósea asociada a la periodontitis (Akpınar *et al.*, 2016), además de contribuir en la osteogénesis y regeneración ósea (Santos *et al.*, 2017).

Las células son susceptibles al déficit de folatos en periodos de gran actividad metabólica, como el de la embriogénesis. Además, a nivel molecular los folatos y el FA intervienen en procesos fundamentales como la síntesis proteica y la formación del ADN (López-Camelo *et al.*, 2010). A nivel *in vitro*, los estudios han demostrado el efecto del FA en la prevención de LPH en estudios sobre diferentes tipos celulares (Xiao *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017).

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Determinar el efecto del FA en la viabilidad, proliferación, morfología y diferenciación de células mesenquimales de pulpa dental.

6.2 Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto en la viabilidad, la proliferación y morfología de las células mesenquimales tratadas con diferentes concentraciones y tiempos de ácido fólico.

2. Evaluar la diferenciación hacia el linaje osteoblástico de células mesenquimales inducida por el tratamiento con ácido fólico.

3. Cuantificar y comparar la expresión marcadores de diferenciación osteogénica en células mesenquimales tratadas con ácido fólico.

4. Determinar cambios en la expresión de proteínas de la vía de señalización de BMP inducidos por el tratamiento con ácido fólico.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Tipo de estudio: Experimental.

7.2 Población y muestra.

Células mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC, por sus siglas en inglés) aisladas a partir de dos dientes permanentes con exodoncia indicada por fines ortodónticos, de pacientes entre 15 y 25 años, sistémicamente sanos, atendidos en un consultorio particular y elegidos a conveniencia.

Criterios de inclusión de los pacientes:

- Edad del paciente (15-25 años).
- Paciente sistémicamente sano.
- Diente permanente con exodoncia indicada por fines ortodónticos.
- Deseo de participar en el estudio.

Criterios de exclusión de los pacientes:

- Edad del paciente inferior a 15 años o superior a 25 años.
- Paciente con alguna patología sistémica.
- Diente con caries o con alguna patología dental que indique su exodoncia.
- Pacientes que no deseen participar en el estudio.

7.3 Materiales y métodos.

7.3.1 Aislamiento y cultivo primario de hDPSC.

Las células mesenquimales fueron aisladas a partir de pulpa dental de terceros molares de dos pacientes masculinos (19 y 23 años de edad), extraídos con fines ortodónticos, previa firma de consentimiento informado, siguiendo el protocolo descrito por Gronthos *et al.* (2000), con modificaciones de Baldión *et al.* (2018).

Luego de realizada la exodoncia, el diente fue desinfectado por inmersión en hipoclorito de sodio al 5% durante 5 segundos; posteriormente, se lavó tres veces con solución salina fisiológica estéril y se desgastaron las paredes coronales y radiculares con fresa de carburo a alta velocidad

e irrigación profusa con solución salina hasta observar la pulpa dental cameral y radicular. La pulpa dental se extrajo con cucharilla de dentina, se colocó en viales de 1,5 mL con medio de cultivo Dulbecos Modified Eagle Medium bajo en glucosa (DMEM) (GE Healthcare Life Sciences, Ref. #SH30021.02) suplementado con 1X de una solución de antibiótico-antifúngico (AA) (10.000 U/mL penicilina, 10.000 µg/mL estreptomina y 25 µg/mL anfotericina B) (Hyclone, Ref. #SV30079.01) para ser transportado al laboratorio.

En cabina de flujo laminar los explantes fueron sumergidos en 2 mL de solución enzimática compuesta por colagenasa tipo I (3 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Ref. # SCR103) y dispasa (4 mg/mL) (Gibco Ref. #17105041), e incubados por 8 horas a 37°C. Posteriormente, se centrifugó la suspensión celular obtenida a 2000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 mL de DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GE Healthcare Life Sciences, Cat. #SH30088.03), AA 1X. Se sembró el precipitado celular en una botella de cultivo plástica, de 25 cm² con 5 mL de medio cultivo completo y se incubó con 5% de CO₂, 95% de humedad relativa y 37°C. A las 24 horas se verificó la adhesión celular al plástico mediante el microscopio invertido Carl Zeiss Primo Vert. Se cambió el medio de cultivo cada 48 horas hasta alcanzar 90% de confluencia celular, posterior a lo cual se realizó el desprendimiento de las células, con una solución de tripsina (GE Healthcare Life Sciences, Ref. #SV30037.01) al 0,25%.

7.3.2 Caracterización de los cultivos primarios de hDPSC.

Las hDPSC de ambos cultivos primarios fueron caracterizadas según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISTC, por sus siglas en inglés) (Flores-Figueroa *et al.*, 2006).

7.3.2.1 Caracterización fenotípica.

Ambos cultivos fueron observados mediante microscopía óptica, a las 24 horas de cultivados y cada 48 horas, hasta alcanzar una confluencia celular del 70%, para verificar su adherencia al plástico y la morfología fibroblastoide característica de este tipo celular.

7.3.2.2 Caracterización inmunofenotípica.

La caracterización inmunofenotípica fue realizada mediante el kit de fenotipificación de células mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) de origen humano (Miltenyi Biotec, Ref. #130-095-198), por medio del citómetro de flujo BD Accuri™ C6 Flow Citometer (BD Bioscience).

Se realizaron alícuotas de aproximadamente 1×10^6 células de pasaje cuatro de cada cultivo primario. Se incubó una alícuota de cada cultivo con la mezcla de fenotipificación de MSC y la otra con la mezcla para control de isotipo (anticuerpos monoclonales, originarios de ratón y conjugados con fluorocromos) de acuerdo al protocolo del kit de Miltenyi Biotec (Tabla 6). Se analizaron 100.000 eventos por cada muestra. La información fue analizada utilizando el software BD CSampler Analysis Software, versión 1.0.

Tabla 6. Kit de fenotipificación de MSC de origen humano (Miltenyi Biotec, Ref. #130-095-198).

Anticuerpos para fenotipificación		Anticuerpos para control de isotipo
Anticuerpo	Isotipo	
CD14-PerCP	IgG2a	IgG1-FITC
CD34-PerCP	IgG1	IgG1-PE
CD45-PerCP	IgG2a	IgG1-APC
CD73-APC	IgG1	IgG1-PerCP
CD90-FITC	IgG1	IgG2a-PerCP
CD105-PE	IgG1	

7.3.2.2 Caracterización funcional.

Teniendo en cuenta el objetivo del estudio, las MSC fueron inducidas a diferenciarse hacia células del linaje osteoblástico. Para lo cual se cultivaron en medio de diferenciación osteogénica (OIM, por sus siglas en inglés) compuesto por DMEM (GE Healthcare Life Sciences, Ref. #SH30021.02), 10% de SFB (GE Healthcare Life Sciences, Ref. #SH30088.03), AA 1X (Hyclone, Ref. #SV30079.01), suplementado con $0,1 \mu\text{M}$ de dexametasona (Sigma-Aldrich, Ref. #D4902), 5 mM β -glicerolfosfato (Santa Cruz, Ref. #203343A), y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Ref. #A8960). Se cambió el medio de cultivo cada tres a cuatro días, hasta alcanzar los 21 días, luego de lo cual se evaluó la diferenciación celular (Kang *et al.*, 2012).

7.3.2 Tratamiento con ácido fólico.

Se disolvió el FA (MP Biomedicals, Ref. #194665) en hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, Ref. #221465) 0,1 N, a una concentración de FA igual a 16 mM; la solución obtenida se filtró mediante una membrana de acetato de 0,20 micras (GVS, Ref. FJ25ASCCA002DL01). Posteriormente, se preparó el medio de cultivo celular combinando DMEM bajo en glucosa, 10% SFB, antibiótico 1X y FA a diferentes concentraciones.

7.3.1.1 Efecto del FA sobre la proliferación celular.

Previo a evaluar el efecto del FA, se evaluó el efecto del medio de cultivo con NaOH 0,1 N sobre las células, para descartar que éste último indujera algún efecto tóxico sobre las mismas.

Posteriormente, para determinar la concentración óptima de FA, se trataron las hDPSC con diferentes concentraciones de la vitamina (0 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM y 1,6 mM) de acuerdo a lo reportado por otros autores en estudios *in vitro* utilizando diferentes tipos de células (Xiao *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2007; Kobus *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017).

La proliferación celular fue evaluada mediante el ensayo fluorométrico de resazurina, durante seis días de tratamiento con las diferentes concentraciones de FA. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron los pozos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M (Sigma-Aldrich, Ref. #P4417) estéril. Posteriormente, se adicionaron 350 μ L de resazurina por pozo (Sigma-Aldrich, Ref. #R7017), a una concentración final de 0,44 μ M, y se incubó durante cuatro horas a 37°C (Escobar *et al.*, 2010). Luego del tiempo de incubación, se analizó la intensidad de fluorescencia del colorante a una longitud de onda de excitación 535 nm y 595 nm de emisión (Escobar *et al.*, 2010) en un lector Tecan Infinite 200 PRO. Se retiró el medio con resazurina y se cambió por el medio de cultivo apropiado para cada grupo de tratamiento con el objetivo de continuar el experimento hasta seis días de tratamiento. Se realizaron dos experimentos independientes con un total de siete réplicas por cada condición de tratamiento.

Las unidades de fluorescencia reportadas por el equipo fueron comparadas con los valores de referencia de una curva de proliferación realizada a partir de concentraciones de células conocidas (10000, 20000, 40000, 80000 células/pozo). El número exacto de células fue calculado mediante la ecuación de la recta con intercepto en eje "y" ($y=mx+b$).

7.3.1.2 Efecto del FA sobre la morfología de hDPSC.

Se sembraron las células hDPSC de ambos cultivos celulares (pase 4 y 6) en cajas de 12 pozos, de 3,8 cm² (1x10⁴ células/pozo), en experimentos independientes y con réplicas por triplicado. A las 24 horas posterior a la siembra, un grupo de células se mantuvo sin tratamiento (Control) y otros dos se trataron con FA 0,8 mM y con 1,6 mM. Las hDPSC tratadas con FA se observaron diariamente mediante microscopía óptica y se compararon con las células no tratadas para determinar cambios fenotípicos inducidos por las diferentes concentraciones de FA. Se realizó el registro fotográfico hasta los seis días de tratamiento, mediante microscopio invertido Zeiss Axio Imager M2 (Zeiss, Alemania) y la cámara AxioCam Hrm (Zeiss, Alemania).

7.3.1.3 Efecto del FA sobre el contenido de ADN de las hDPSC.

Con el propósito de determinar posibles cambios en el ciclo celular de las hDPSC tratadas con las diferentes concentraciones de FA, se cultivaron en cajas de 12 pozos, (2x10⁴ células/pozo) y se trataron con el medio de cultivo apropiado para cada grupo de tratamiento (0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM) durante siete días. Para el análisis del ciclo celular, las células fueron desprendidas con solución de tripsina (GE Healthcare Life Sciences, Ref. #SV30037.01) al 0,25%, cada pozo de forma independiente, obteniendo tres réplicas por cada condición. Se centrifugaron tres minutos a 3.000 rpm, se realizaron dos lavados con PBS 0,01 M (Sigma-Aldrich, Ref. #P4417) y centrifugaciones entre cada lavado. Se fijaron las células con etanol frío (PanReac Ref. #8075), al 70%, durante 30 minutos a 4 °C. Después de la fijación, se centrifugaron las muestras y se le realizaron nuevamente dos lavados, posteriormente, se adicionaron 5 µL por muestra (0,25 µg/muestra) del colorante 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Invitrogen eBioscience, Ref. #50-112-8859) por cada muestra y se incubó durante cinco minutos, de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. La fluorescencia del colorante se detectó mediante un BD Accuri™ C6 Flow Citometer (BD Bioscience) en el rango de la luz infrarroja (650 nm) a través del filtro de detección de fluorescencia FL3. La distribución celular en cada fase del ciclo celular fue determinada mediante el software ModFit LT 5.0.

7.3.1.4 Evaluación de la diferenciación celular.

Las hDPSC (pase 6) fueron cultivadas en cajas de 12 pozos, de 9,6 cm² (2x10⁴ células/pozo) con el medio de cultivo apropiado para cada grupo de tratamiento (0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM) durante 7 y 21 días, cambiando el medio de cultivo cada tres a cuatro días. Luego de lo cual se

evaluó la diferenciación celular hacia el linaje osteoblástico por tres métodos: tinción con rojo de alizarina, marcaje de ALP y cambios en la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica.

a. Tinción con rojo de alizarina.

La tinción con rojo de alizarina se empleó para evaluar la mineralización de la matriz extracelular en las células hDPSC tratadas con el medio de cultivo apropiado para cada grupo. Para esto se siguió el protocolo descrito por Gregory *et al.*, (2004) con modificaciones de Baldión y colaboradores (Baldión *et al.*, 2018).

Luego de 7 y 21 días de tratamiento (0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, OIM), las hDPSC sembradas en monocapa se lavaron con PBS 0,01 M y se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante una hora a temperatura ambiente, luego de lo cual se lavaron nuevamente con PBS. Se adiciona a cada pozo 300 µL de solución de rojo de alizarina (Sigma-Aldrich, Ref. #A5533) al 5% en agua destilada y se dejó actuar sobre todas las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de descartar el colorante sobrante, se realizaron dos lavados con agua destilada, durante cinco minutos cada uno.

Se observaron en microscopio invertido Zeiss Axio Imager M2, las monocapas celulares teñidas y se realizó el registro fotográfico con la cámara AxioCam Hrm.

Para cuantificar la tinción de cada muestra se agregaron 200 µL de PBS a cada pozo y se dejó actuar durante 15 minutos en agitación. Se recolectó el sobrenadante y se distribuyó en alícuotas de 100 µL, por triplicado en cajas de 96 pozos. Se analizó la absorbancia del colorante en un lector Tecan Infinite 200 PRO con una longitud de onda de 545 nm.

b. Marcaje de ALP.

La actividad de la ALP fue analizada mediante el kit SIGMAFAST Fast Red TR/Naphthol AS-MX Phosphate (4-Cloro-2-metylbenzenediazonio/ácido 3-Hidroxy-2-naftoico 2,4-dimethyl anilídico fosfato) (Sigma-Aldrich, Ref. #F4523).

Las hDPSC fueron sembradas en monocapa sobre laminillas de vidrio tratadas con una solución de Poly-L-lisina (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich) y tratadas durante 7 y 21 días con el medio de cultivo apropiado para cada grupo (0 uM, 0,8 uM, 1,6 uM, IOM). Pasado el tiempo de tratamiento, se fijaron las células con etanol frío (PanReac Ref. #8075), al 95%.

Se adiciona a cada pozo la mezcla de Fast Red TR/Naphthol AS-MX y la solución tampón Trizma, combinado en proporciones iguales en agua destilada. Se dejó actuar durante 30 minutos

y luego se observaron las monocapas celulares teñidas al microscopio óptico invertido Zeiss Axio Imager M2 y se realizó el registro fotográfico con la cámara AxioCam Hrm.

c. Expresión de marcadores de diferenciación osteogénica.

Las hDPSC tratadas con el medio de cultivo apropiado para cada grupo (0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, OIM), fueron recolectadas a los 7 y 21 días de tratamiento, desprendiendo la monocapa con tripsina al 0,25%. Posteriormente, se realizó la extracción del ácido ribonucleico (ARN), la retrotranscripción y se evaluaron los cambios en la expresión de genes de diferenciación osteogénica por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTqPCR).

Extracción del ARN.

Se realizó la extracción del ácido ribonucleico (ARN) mediante Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, Ref. #R1051). De acuerdo con el protocolo del fabricante, se adicionaron 100 μ L a cada muestra de la solución tampón para la lisis hasta disolver el precipitado celular, luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 1 minuto y se agregó la misma cantidad de etanol al 99% (PanReac Ref. #8075).

Para lograr la purificación de las muestras, se transfirieron a las columnas con matriz de sílica, se lavaron con la solución tampón de lavado y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 segundos.

Se incubaron las muestras con la enzima desoxirribonucleasa I (DNasa I) a una concentración de 1 U/ μ L durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados, con centrifugaciones entre cada paso.

Finalmente se cuantificó el ARN y se analizó su pureza por medio del espectrofotómetro Nanodrop NanoVolume NP80 (Implen), determinando la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se consideró el ARN puro cuando presentara una proporción \sim 2.0 en su relación 260/280 nm y dentro del rango de 2.0-2.2 en su relación 260/230 nm, para garantizar la ausencia de contaminantes como proteínas, fenoles entre otros (NanoDrop Spectrophotometers T042 Thecnical Bulletin, ThermoFisher, [acceso el 19 de diciembre de 2019]).

Transcripción reversa de ARN.

Se realizó la transcripción reversa del ARN obtenido, sintetizando ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA, por sus siglas en inglés), empleando el kit ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis (New England BioLabs, Ref. #E6560L). Siguiendo el protocolo estándar recomendado por fabricante, se denaturó la plantilla de RNA (concentración final 200 µg/µL) junto con la mezcla aleatoria de cebadores (60 µM) durante cinco minutos a 65 °C en el termociclador BioRad T100 Thermal Cycler.

Posteriormente, se incorporó la mezcla ProtoScript II (2X) que contiene los desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), una solución tampón optimizada, la mezcla de la enzima (10X) que contiene Transcriptasa Reversa ProtoScript II y un inhibidor de RNasa de origen murino. Se incubaron las muestras a 25 °C por cinco minutos y luego a 42 °C por 60 minutos.

Como control negativo se combinaron los mismos reactivos, incluyendo agua libre de nucleasas en lugar de la plantilla de ARN y se siguió el mismo protocolo empleado con las muestras.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTqPCR).

Se empleó la técnica RTqPCR para evaluar la expresión de genes de diferenciación osteogénica: *RUNX2*, Osteocalcina (*OCN*), Osteopontina (*OP*), Osterix (*OSX*), fosfatasa alcalina (*ALP*) y *BMP2* fabricados de acuerdo a la Tabla 7. La RTqPCR se realizó usando el kit Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) basado en el colorante fluorescente SYBR Green I y cuantificada en el termociclador BioRad CFX96 Real-Time System, de acuerdo a condiciones previamente estandarizadas (Figura 11). El gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) se tuvo en cuenta como gen de referencia. Como control positivo de la técnica se empleó una muestra de cDNA previamente amplificada y como control negativo se omitió la plantilla de cDNA en una de las reacciones. Se verificó la temperatura de hibridación de cada amplicón y se descartó la presencia de dímeros de los primers.

Tabla 7. Características de los primers empleados en RTqPCR.

Gen	Primer forward	Primer reverse	Tamaño esperado del amplicón (pb)	Temperatura de hibridación	Concentración final
<i>RUNX2</i>	CATCTAATGACACCACCAGGC	GCCTACAAAGGTGGGTTTGA	168	60	0,25 µM

<i>OCN</i>	CCTCACACTCCTCGCCCTAT	TCCCAGCCATTGATACAGGT	166	58	0,25 μ M
<i>OP</i>	TGAAACGAGTCAGCTGGATGACCA	TGGCTGTGAAATTCATGGCTGTGG	168	60	0,20 μ M
<i>OSX</i>	TGGGAAAAGGGAGGGTAATC	CGGGACTCAACAACTCTGG	191	61	0,25 μ M
<i>ALP</i>	TCAGAAGCTCAACACCAACG	GTCAGGGACCTGGGCATT	199	60	0,25 μ M
<i>BMP2</i>	CGAAACACAAACAGCGGAAAC	GCCACATCCAGTCGTTCCA	97	60	0,25 μ M
<i>GAPDH</i>	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3	226	60	0,25 μ M

pb: pares de bases

Datos y diseño de tabla por Dra. Sandra Perdomo

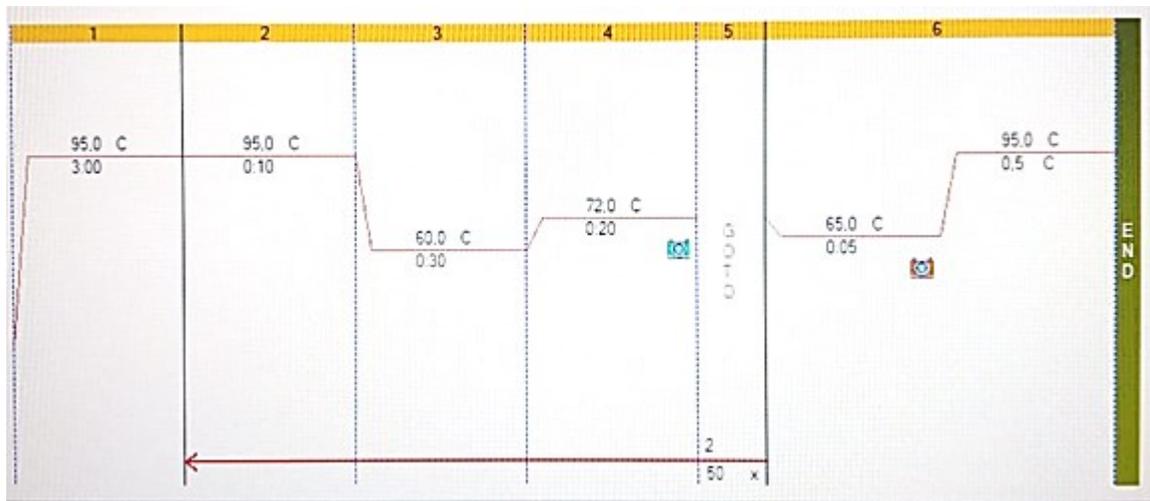


Figura 11. Protocolo de amplificación de *RUNX2*, *OCN*, *OP*, *ALP*, *BMP2*, *OSX* y *GAPDH* mediante RTqPCR.
Figura tomada por Zita Bendahan

Los cambios en la expresión relativa de los genes fueron analizados mediante el método de Sheffée, comparando cada gen de cada grupo de tratamiento con la expresión del grupo no tratado (0 mM) y normalizados mediante los valores obtenidos para el *housekeeping gen GAPDH*. La expresión relativa del gen en la muestra control (0 mM) fue considerada con un valor igual a 1 y se consideraron como significativos los cambios en la expresión relativa de genes superiores a dos veces la expresión del control.

7.3.1.5 Evaluación de los cambios en la expresión de Smad1/5/8 y p38.

Se evaluaron los cambios en la expresión y fosforilación de Smad1/5/8 y p38 mediante la técnica de Western Blot.

Para lo cual, primero se sembraron hDPSC en cajas de seis pozos y a las 24 horas se trataron con el medio de cultivo apropiado para cada grupo (0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, OIM). El procedimiento completo se realizó por duplicado a partir de dos experimentos independientes.

a. Extracción de proteínas intracelulares.

Se estandarizaron las condiciones que garantizaran la mayor eficacia para la extracción de las proteínas.

A los 7 y 21 días de tratamiento se lavaron las células con PBS 0,01 M (Sigma-Aldrich, Ref. #P4417) y se adicionaron 300 μ L de PhosphoSafe™ Extraction Reagent (Sigma-Aldrich, Ref. #C973M11) por cada tres pozos. Se incubó durante cinco minutos sobre hielo para extraer las proteínas intracelulares; luego se raspó la monocapa con un raspador de células; adicionalmente se aplicaron dos pulsos de sonicación de 15 segundos cada uno, con una amplitud del 20%, con el propósito de obtener la mayor cantidad de proteínas. Los lisados celulares se centrifugaron a 1400 g durante 10 minutos a 4 °C para remover los desechos celulares.

b. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) haciendo uso del kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Ref. #23225).

Se preparó una solución de trabajo conformada por 50 partes de BCA por cada parte de sulfato cúprico (CuSO_4), se combinó una parte de muestra y 20 partes de la solución de trabajo y se dejó incubar 30 minutos a 37 °C.

Pasado este tiempo, se evaluó la absorbancia del producto de la reacción a una longitud de onda de 570 nm, empleando el espectrofotómetro Nanodrop NanoVolume NP80 (Implen).

La cuantificación de proteínas se realizó basada en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Ref. #A2153) de concentraciones conocidas en un rango de 0,125-2 mg/ml. La concentración exacta de proteína fue calculada por el espectrofotómetro mediante la ecuación de la recta con intercepto en eje "y" ($y=mx+b$).

c. Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó utilizando geles de 12-14% de acrilamida-bisacrilamida (acril-bisacril) con dodecilsulfato sódico (SDS), bajo condiciones denaturantes de la proteína. El tamaño

de los poros del gel separador fue determinado y estandarizado de acuerdo con el peso molecular de las proteínas (Tabla 8).

Las proteínas fueron diluidas en buffer Laemmli (BL) 1X, compuesto por 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol y 0,125 M Tris HCl, obteniendo concentraciones finales de proteína entre 8,5-20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dependiendo de la proteína de interés a detectar. Todas las muestras fueron denaturadas durante 10 minutos en ebullición (100 $^{\circ}\text{C}$), posteriormente se cargaron en el gel. Se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, Ref. #26616), de 10 a 180 kDa (Figura 12) a una concentración final de 3,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se cargaron 25 μL de cada solución de proteína por carril en geles de 10 carriles cada uno, manteniendo una concentración final entre 8,5-20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dependiendo de la proteína de interés a detectar. Se le aplicó una corriente de 90 voltios durante 15 minutos a la cámara de electroforesis y luego de esto se aumentó a 110 voltios durante aproximadamente 90 minutos.

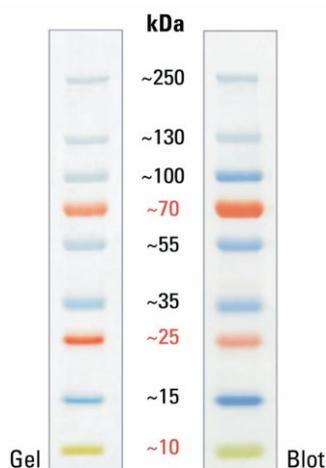


Figura 12. Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder de 10 a 180 kDa. (ThermoFisher Scientific, Ref. #26616).

d. Transferencia de las proteínas.

Se estandarizaron las condiciones ideales que garantizaran la mayor eficacia de transferencia de las proteínas.

Una vez culminada la electroforesis del gel, las proteínas fueron transferidas de este a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (ThermoFisher, Ref. 88518). Previamente, la membrana fue activada en metanol puro al 100% durante 2 minutos.

Luego, tanto el gel como la membrana se equilibraron en la solución tampón de transferencia fría, compuesta por UltraPure Tris (Invitrogen, Ref. #15504-020), glicina (Bio-Rad, Ref. #161-0718), SDS y metanol al 20%. Se realizó el montaje de la cámara de transferencia con la solución tampón y se dejó transferir a 4°C, durante 16 horas a 30 voltios.

e. Verificación de la transferencia.

Antes de la inmunodetección, se determinó la eficacia de la transferencia. Para esto, se tiñó el gel de forma irreversible con Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad, Ref. #1610400) durante una hora para comprobar la presencia de residuos de proteínas en el gel que no fueron transferidos a la membrana. La membrana se tiñó de forma reversible con rojo Ponceau (Sigma-Aldrich, Ref. #6226795) durante tres a cinco minutos, para detectar la presencia de proteínas sobre la membrana. Posteriormente, se lavó la membrana con agua destilada hasta no observar tinción y se procedió a la inmunodetección de las proteínas de interés.

f. Inmunodetección de la proteína de interés.

Se estandarizaron las condiciones que permitieran la mayor eficacia para la inmunodetección de cada una de las proteínas de interés. El bloqueo de las membranas se realizó con BSA al 1,5-5% por una hora a temperatura ambiente (TA), seguido de la incubación con el anticuerpo primario de acuerdo a las condiciones expuestas en la Tabla 8. Para normalizar las diferencias en la carga de proteína se utilizó el anticuerpo primario anti-β-actina diluido a una concentración 1:5000.

La detección de las proteínas se realizó mediante el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN2209) y fueron visualizadas y fotodocumentadas mediante el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, California, EEUU). La intensidad de las bandas de proteínas se cuantificó por densitometría usando el Software Labimage 1D (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Germany).

Tabla 8. Condiciones para la incubación de anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo primario				Anticuerpo secundario				Peso molecular
Anticuerpo/ Dilución	Marca	Número de referencia	Condiciones de incubación	Anticuerpo/ Dilución	Marca	Número de referencia	Condiciones de incubación	

								proteína (kDa)
Smad1/5/8 1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-6031-R	ON, 4°C	Anti-conejo-HRP 1:2000	Abcam	ab6721	1 h, TA	52-56
p-Smad1/5/8 1:250	Santa Cruz Biotechnology	sc-12353	1 h, TA	Conejo anti-cabra biotinilado 1:1000	Vector	BA-5000	1 h, TA	
p38 1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-7149	ON, 4°C	Anti-conejo-HRP 1:2500	Abcam	ab6721	1 h, TA	38
p-p38-R 1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-17852- R	ON, 4°C	Anti-conejo-HRP 1:2500	Abcam	ab6721	1 h, TA	

pSmad1/5/8: Smad1/5/8 fosforilada; pp38: p38/MAPK fosforilada; ON: *overnight* (>16h); h: hora; TA: Temperatura ambiente

Datos y diseño de tabla por Zita Bendahan

7.4 Hipótesis de estudio.

Hipótesis nula: El FA no favorece la diferenciación de células hDPSC hacia el linaje osteoblástico.

Hipótesis alterna: El FA favorece la diferenciación de células hDPSC hacia el linaje osteoblástico.

7.5 Plan de tabulación y análisis de datos.

La información fue recolectada en hojas de Excel y exportada al software Stata, versión 13.0 (Texas, EEUU) para el análisis.

Se determinó la distribución de los datos, y aquellos con una distribución normal se presentaron como media y desviación estándar, en caso contrario se expresaron en mediana y rango intercuartil.

Se consideraron como estadísticamente significativos aquellos resultados con valores de $p < 0.05$. Para analizar diferencias entre grupos de las variables con distribución normal se utilizó la prueba ANOVA de una vía y para las que no presentaron distribución normal se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional en Investigaciones de la Universidad El Bosque en la sesión extraordinaria del 15 de mayo de 2018, Acta No. S013-2018 (Anexo 1).

Este estudio se realizó teniendo en cuenta la normatividad de la resolución 008430 capítulo I, artículo 11, expedida por el Ministerio de Salud en 1993, que regula “Los aspectos éticos de la investigación en seres humanos”. Según esto, el uso de dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica se considera como una investigación con riesgo mínimo.

Una vez identificado el paciente que cumpliera con los criterios de inclusión, se le explicó el objetivo del estudio y se firmó un consentimiento informado por cada uno de los pacientes que donaron el diente extraído a partir del cual se obtuvieron las hDPSC (Anexo 2).

La información obtenida en este estudio se ha mantenido y se mantendrá estrictamente confidencial. Los pacientes no fueron ni serán identificados por su nombre, sino mediante un código de identificación.

Teniendo en cuenta que este estudio no tiene por objetivo evaluar ninguna condición especial de los pacientes, a la fecha ningún paciente ha solicitado que le sean entregados los resultados del mismo y serán entregados únicamente a los pacientes que así lo requieran.

9. RESULTADOS.

9.1 Caracterización de los cultivos primarios de hDPSC.

Células hDPSC fueron aisladas a partir de pulpa dental de terceros molares de dos pacientes masculinos (19 y 23 años de edad), extraídos con fines ortodónticos, previa firma de consentimiento informado, siguiendo el protocolo descrito por Gronthos *et al.*, con modificaciones de Baldión y colaboradores (Gronthos *et al.*, 2000; Baldión *et al.*, 2018).

A los siete días del aislamiento, las células hDPSC se observaron alargadas, en forma de huso, estrechas, de aspecto fibroblastoide, núcleo único y central, adheridas al plástico (Figura 13).

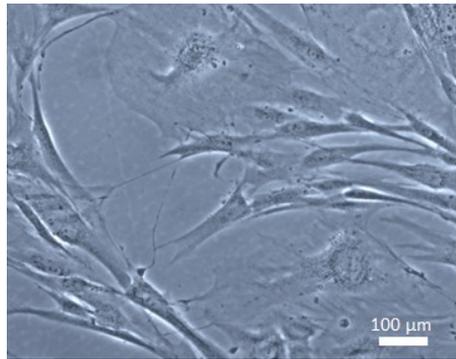


Figura 13. Caracterización morfológica de hDPSC. Fotomicrografía de hDPSC con apariencia fibroblastoide a los siete días del aislamiento. Escala 100 μm . Foto realizada por Zita Bendahan, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque.

La caracterización inmunofenotípica, mediante citometría de flujo, demostró que más del 95% de las células fueron positivas para CD73, CD90, CD105 y menos del 2% positivas para CD34 y CD45 (Figuras 14 A-D).

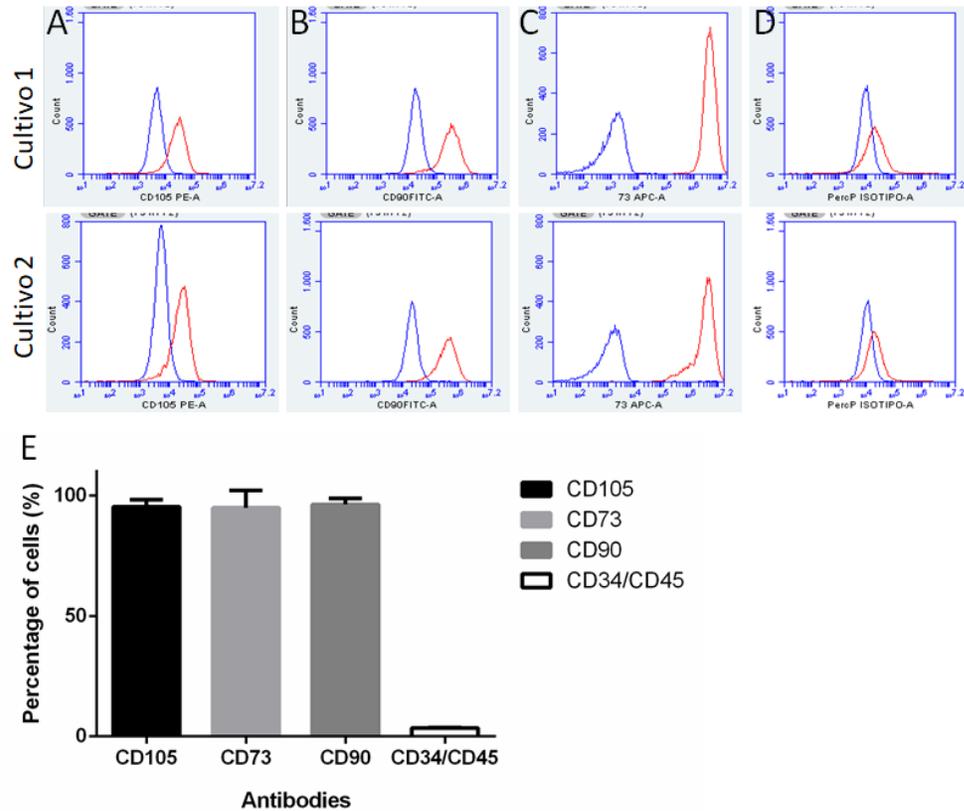


Figura 14. Caracterización de las hDPSC. Histogramas de citometría de flujo de dos cultivos primarios de hDPSC con marcadores de superficie positivos para (A) CD105, (B) CD90, (C) CD73 y (D) negativos para CD34 y CD45. (E) Porcentaje de células positivas para cada anticuerpo. El 95% de las células fueron positivas para CD73, CD90, CD105 y menos del 2% positivas para CD34 y CD45. Los valores se presentan como promedios y desviaciones estándar, a partir de dos experimentos independientes. Análisis estadístico realizado por Zita Bendahan.

9.3 Evaluación de la proliferación de hDPSC tratadas con FA.

Con el fin de determinar la toxicidad y biocompatibilidad del NaOH 0,1 N como disolvente del FA, este fue usado sobre células hDPSC durante 21 días sin observarse muerte celular evidente en estas células.

Para determinar la concentración óptima de FA, se evaluó la proliferación de las hDPSC tratadas con diferentes concentraciones de FA (0 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM y 1,6 mM) durante cuatro días, de acuerdo a lo reportado por otros autores en estudios *in vitro* (Xiao *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2007; Kobus *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 206; Melo *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). La proliferación celular fue evaluada mediante el ensayo fluorométrico de resazurina cada 24 horas y hasta los cuatro días de tratamiento. Se realizó una curva de proliferación a partir de concentraciones de células conocidas (10.000, 20.000, 40.000, 80.000 células por pozo). El

número exacto de células fue calculado mediante la ecuación de la recta con intercepto en eje “y” ($y=mx+b$), a partir del promedio de tres pozos para cada concentración. El análisis de regresión lineal mostró un alto índice de correlación (R^2 : 0,9948 y R^2 : 0,9988).

A los cuatro días de tratamiento, las hDPSC tratadas con 0,1 y 0,2 mM de FA proliferaron de forma similar al grupo control (0 mM). Los grupos tratados con concentraciones entre 0,4, 0,8 y 1,6 mM redujeron la proliferación celular 1,7, 15,8 y 3%, respectivamente; no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$, Kruskal-Wallis) (Figura 15 A).

Las concentraciones de 0,8 mM y 1,6 mM indujeron los mayores cambios en la proliferación celular con relación al grupo control, por lo que fueron escogidas como las concentraciones definitivas de trabajo.

Se evaluó nuevamente la proliferación celular mediante dos experimentos independientes con un total de siete réplicas por cada condición de tratamiento en hDPSC tratadas con 0 mM, 0,8 mM y 1,6 mM.

A pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$, Kruskal-Wallis), se observó una tendencia a la disminución en la proliferación celular en los grupos tratados con FA en comparación con el grupo no tratado, desde los dos días de tratamiento. Dicha reducción fue más evidente a los 6 días de tratamiento, donde los grupos tratados con 0,8 mM y 1,6 mM mostraron una reducción en su proliferación celular de 12,5% y 14,8% respectivamente, en comparación con el grupo control (0 mM). No se observó muerte celular evidente en ninguno de los grupos experimentales. Los datos se expresan en mediana y rango intercuartil (Figura 15 B).

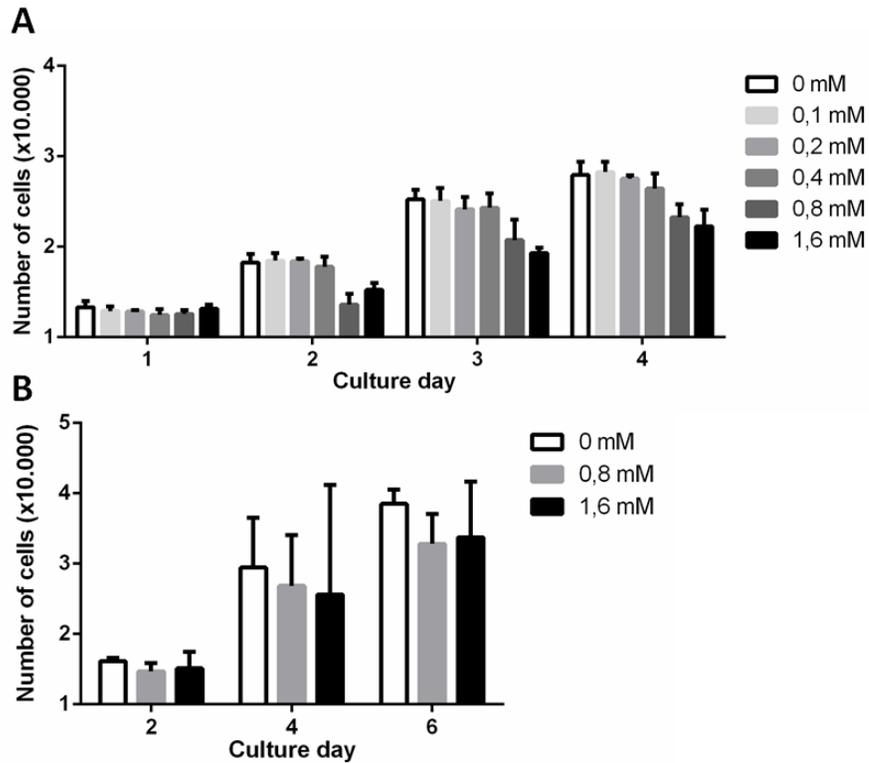


Figura 15. Evaluación de la proliferación de hDPSC tratadas con FA. (A) A los cuatro días de tratamiento, las hDPSC tratadas con 0,1 y 0,2 mM de FA proliferaron de forma similar al grupo control (0 mM). Los grupos tratados con concentraciones entre 0,4, 0,8 y 1,6 mM redujeron la proliferación celular 1,7, 15,8 y 3%, respectivamente; no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis). (B) A los 6 días de tratamiento, los grupos tratados con 1,6 mM y 0,8 mM mostraron una reducción no significativa en la proliferación celular de 12,5% y 14,8%, respectivamente, en comparación con el grupo control. Los datos son expresados en mediana y rango intercuartil. Análisis estadístico realizado por Zita Bendahan.

9.3 Evaluación de la morfología celular de hDPSC tratadas con FA.

Las hDPSC tratadas se observaron diariamente mediante microscopía óptica usando microscopio invertido Zeiss Axio Imager M2. Las células tratadas con 0,8 mM y 1,6 mM se mantuvieron adheridas al plástico, conservaron el fenotipo fibroblástico característico de las MSC sin embargo, se observaron más alargadas que las células no tratadas (Control o 0 mM), desde los cuatro días de tratamiento (Figura 16).

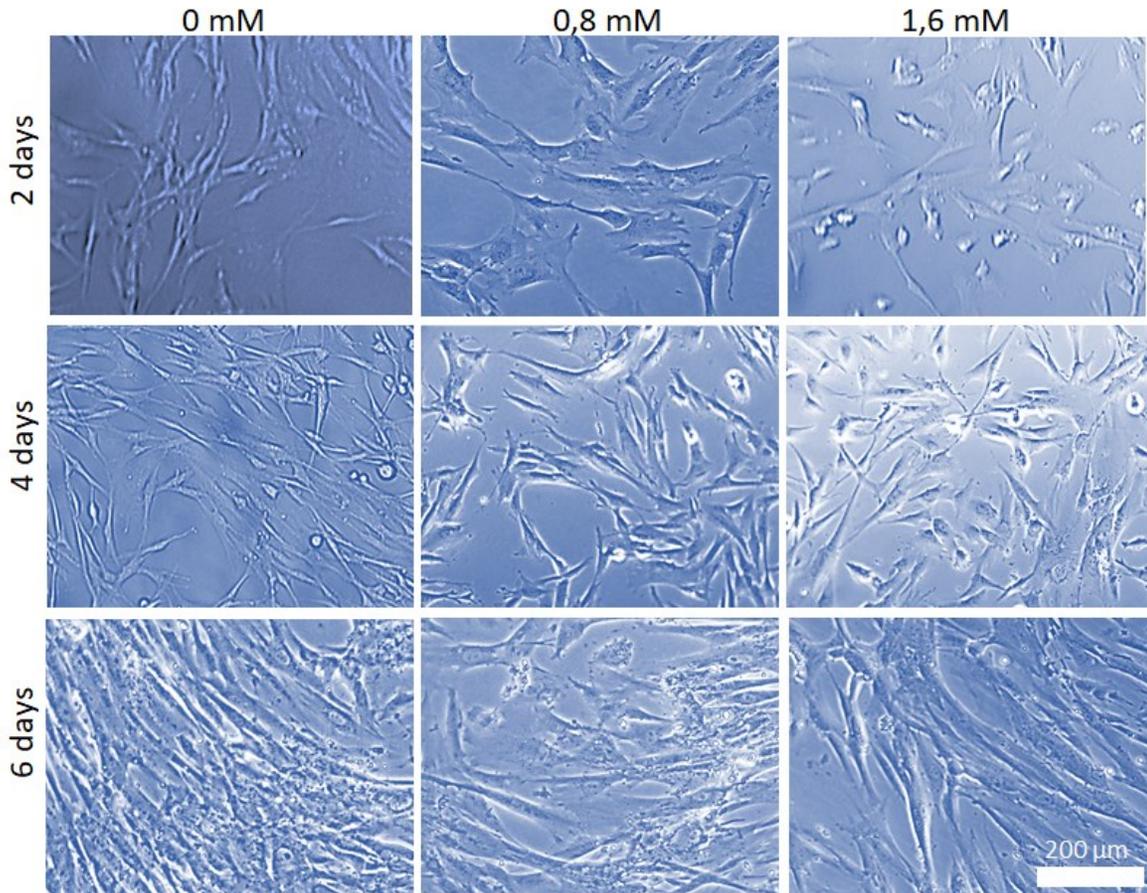


Figura 16. Cambios morfológicos de las hDPSC tratadas con FA (0,8 mM y 1,6 mM) durante seis días. A partir de los cuatro días de tratamiento, las hDPSC tratadas con 0,8 mM y 1,6 mM de FA se observaron más alargadas y con menor densidad que las células no tratadas (0mM). Escala 200 μm . Fotos realizadas por Zita Bendahan, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque.

9.4 Efecto del FA sobre el contenido de ADN de las hDPSC.

Las hDPSC fueron tratadas con FA 0,8 mM y 1,6 mM, durante siete días. Posteriormente, se evaluó el contenido de ADN en cada grupo mediante la aplicación del colorante 7-AAD y se comparó con el grupo control (0 mM).

El grupo tratado con FA 0,8 mM presentó el mayor porcentaje de células (47,4%) en la fase G0G1 del ciclo celular, lo cual representa 7,5 y 11,5% más que los grupos control y 1,6 mM, respectivamente. En cambio, los grupos control y tratamiento con 1,6 mM de FA presentaron el mayor porcentaje de células (43,2 y 46,2%, respectivamente) en la fase S.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las fases del ciclo celular ($p > 0.05$, Anova de una vía). Sin embargo, se observó que el grupo tratado con 0,8 mM presentó una tendencia a mantener un mayor porcentaje de células en una fase de reposo (Figura 17).

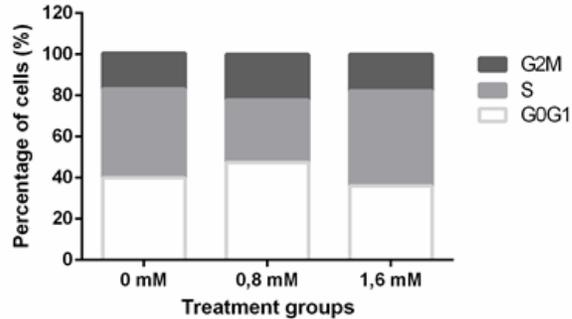


Figura 17. Efecto del FA sobre el contenido de ADN de las hDPSC. Porcentaje de células por fases del ciclo celular según tratamiento. El grupo tratado con 0,8 mM presentó una tendencia a mantener un mayor porcentaje de células en fase de reposo (Go-G1). Los valores están presentados en promedios. Análisis estadístico realizado por Zita Bendahan.

9.5 Efecto del FA en la diferenciación de las hDPSC.

Posteriormente, se evaluó el efecto del FA en la diferenciación de las hDPSC hacia el linaje osteoblástico, a través de tres métodos: tinción con rojo de alizarina, actividad de ALP y cambios en la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica.

9.5.1 Evaluación de la mineralización *in vitro* inducida por hDPSC tratadas con FA.

Mediante la tinción con rojo de alizarina se evaluó la mineralización de la matriz extracelular formada por las hDPSC tratadas con FA 0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM y OIM durante 7 y 21 días. A los siete días de tratamiento se observaron pequeños depósitos de calcio intracelulares en los grupos tratados con ambas concentraciones de FA, a diferencia del grupo no tratado. Los depósitos de calcio y los nódulos de mineralización aumentaron progresivamente durante el proceso de diferenciación, revelando una matriz altamente calcificada en el grupo tratado con OIM a los 21 días de tratamiento y aumento en la intensidad y el número de nódulos en los demás grupos de tratamiento, observándose con mayor intensidad en el grupo de 0,8 mM de FA. La formación de nódulos de mineralización en el grupo tratado con 1,6 mM de FA fue similar a la encontrada en el grupo control (0 mM) (Figura 18).

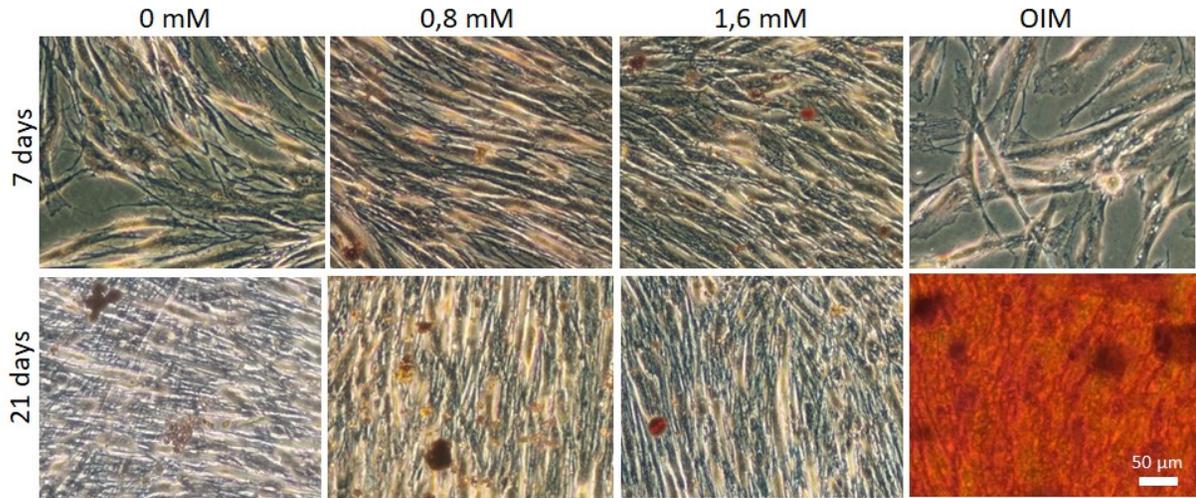


Figura 18. Mineralización de matriz extracelular determinada por medio de la tinción con rojo de alizarina. Los depósitos de calcio y los nódulos de mineralización aumentaron progresivamente durante el proceso de diferenciación, revelando una matriz altamente calcificada en el grupo tratado con OIM y aumento en la intensidad y el número de nódulos, principalmente en el grupo tratado con 0,8 mM de FA. Barra 50 µm. Fotos realizadas por Zita Bendahan, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque.

9.5.2 Marcaje de ALP en hDPSC tratadas con FA.

Se evaluó el marcaje de ALP en las hDPSC tratadas durante 7 y 21 días con el medio de cultivo apropiado para cada grupo (0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, OIM).

Mediante inmunohistoquímica, se detectó leve marcaje de ALP como nódulos de coloración rojo-violeta en las células tratadas con 0,8 mM, 1,6 mM y OIM desde los siete días de tratamiento con FA, a diferencia del grupo control donde no se observó la presencia de estos ni a los siete ni a los 21 días. El marcaje en el grupo OIM fue mayor que en los grupos de tratamiento con FA en ambos tiempos (Figura 19).

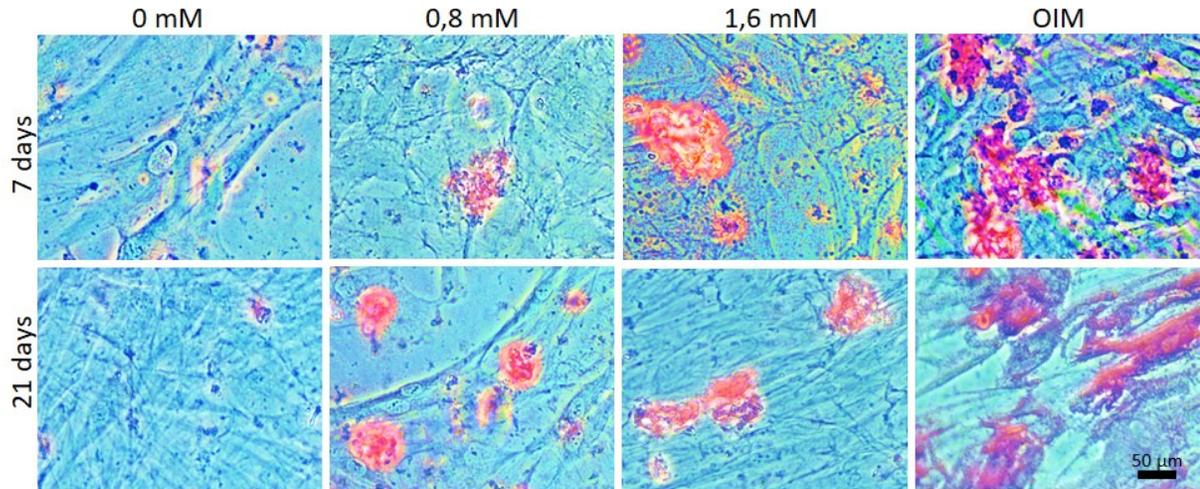


Figura 19. Detección de ALP mediante inmunohistoquímica. Nódulos de coloración rojo-violeta en las células tratadas con 0,8 mM, 1,6 mM y OIM desde los siete días de tratamiento con FA. En el grupo control (0 mM) no se detectó ALP en ninguno de los tiempos evaluados. Escala 50 µm. Fotos realizadas por Zita Bendahan, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque.

9.5.3 Expresión de marcadores de diferenciación osteogénica.

Se evaluó la expresión de *RUNX2*, *OCN*, *OP*, *OSX*, *ALP* y *BMP2* a los 7 y 21 días de tratamiento, mediante RTqPCR, empleando *GAPDH* como gen de referencia. La expresión relativa del gen en la muestra control (0 mM) fue considerada con un valor igual a 1 y se consideraron como significativos los cambios en la expresión relativa de genes superiores a dos veces la expresión del control.

OSX aumentó 2,3 veces su expresión a los siete días de tratamiento en el grupo de 0,8 mM de FA y posteriormente se observó reducción en su expresión a los 21 días. En los otros dos grupos de tratamiento (1,6 mM FA y OIM), se evidenció represión del gen, en todos los tiempos evaluados (Figura 20 A).

A los siete días de tratamiento, *RUNX2* aumentó 2,7 veces su expresión en el grupo OIM. En el grupo tratado con 0,8 mM de FA no se observaron cambios en la expresión en comparación con el grupo control y en el grupo tratado con FA 1,6 mM el gen se encontró reprimido. El efecto fue inverso a los 21 días, donde se observó que el tratamiento con FA 0,8 mM y 1,6 mM, indujeron aumento en la expresión de *RUNX2* de 3,1 y 1,6 veces, respectivamente (Figura 20 B).

El FA no promovió cambios significativos en la expresión de *ALP*. A los 21 días de tratamiento, este marcador se observó sobrepresado únicamente en el grupo OIM, mientras que los otros grupos mostraron una expresión similar a la observada en el grupo control (0 mM) (Figura 20 C).

Por otra parte, en el grupo OIM, OCN aumentó su expresión 5 veces más que en el grupo control a los 21 días. Este mismo patrón se evidenció en el grupo de 0,8 mM de FA, alcanzando una expresión 3,5 veces mayor que en el control a los 21 días de tratamiento. En cambio, el grupo tratado con 1,6 mM de FA presentó un patrón de expresión inverso, observándose sobreexpresado 3,9 veces a los 7 días y reprimido a los 21 días.

OP se expresó en igual proporción en el grupo tratado con 1,6 mM de FA y el control a los siete días de tratamiento, sin embargo, el grupo 0,8 mM presentó una mayor expresión de *OP* que los demás grupos evaluados (Figura 20 E).

La expresión de *BMP2* fue similar a la de *RUNX2* para los grupos de tratamiento con FA. Los niveles de RNAm de este gen en las células tratadas con 0,8 mM FA a los siete días fueron similares al grupo control, alcanzando una expresión 2,6 veces más que en las células control a los 21 días. En el grupo de tratamiento con 1,6 mM de FA, a los siete días su expresión estaba desregulada, pero ésta aumentó hasta llegar a niveles similares al control a los 21 días (Figura 20 F).

Analizando el patrón de expresión de los marcadores de diferenciación osteogénica en cada grupo de tratamiento, con respecto al control, a los siete días de tratamiento con 0,8 mM se presentó un aumento significativo únicamente en la expresión de *OSX*, y a los 21 días *RUNX2*, *OCN* y *BMP2* se observaron sobreexpresados. Por el contrario, *ALP* mantuvo una expresión similar a la del grupo control. Por su parte, el grupo tratado con 1,6 mM mostró un comportamiento diferente, ya que solo se observó un cambio significativo en la expresión de *OCN*, cuatro veces mayor que el control a los siete días de tratamiento. Sin embargo, los demás marcadores mostraron una expresión similar al control y el aumento o disminución en su expresión no fue significativo en los tiempos evaluados. En el grupo OIM, a los 7 días solo está sobreexpresado *RUNX2*. *OCN* presentó una expresión más tardía, encontrándose sobreexpresado cinco veces más que el control a los 21 días de tratamiento (Figura 21 A-C).

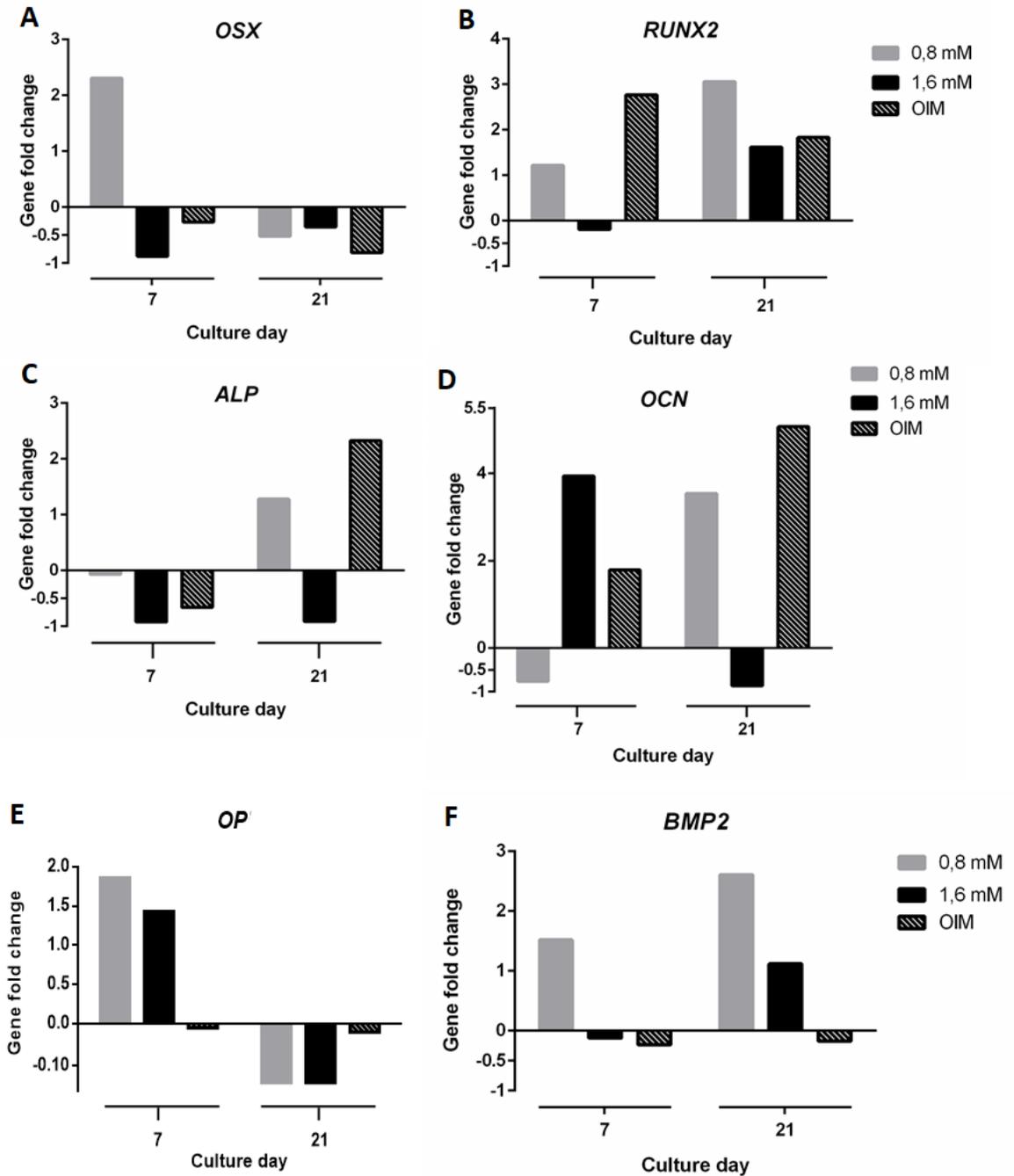


Figura 20. Expresión relativa de los genes durante la diferenciación. Se evaluaron marcadores específicos hacia linaje osteoblástico de células hDPSC tratadas con 0 mM, 0,8 mM, 1,6 mM y OIM durante siete y 21 días mediante RTqPCR. Se consideró un valor de 1 en las células control (0 mM) y valores superiores a 2 como significativos. (A) Osterix (*OSX*), (B) Factor de transcripción 2 relacionado a Runt (*RUNX2*), (C) Fosfatasa alcalina (*ALP*), (D) Osteocalcina (*OCN*), (E) Osteopontina (*OP*), (F) Proteína morfogenética ósea 2 (*BMP2*). Análisis realizado por Zita Bendahan.

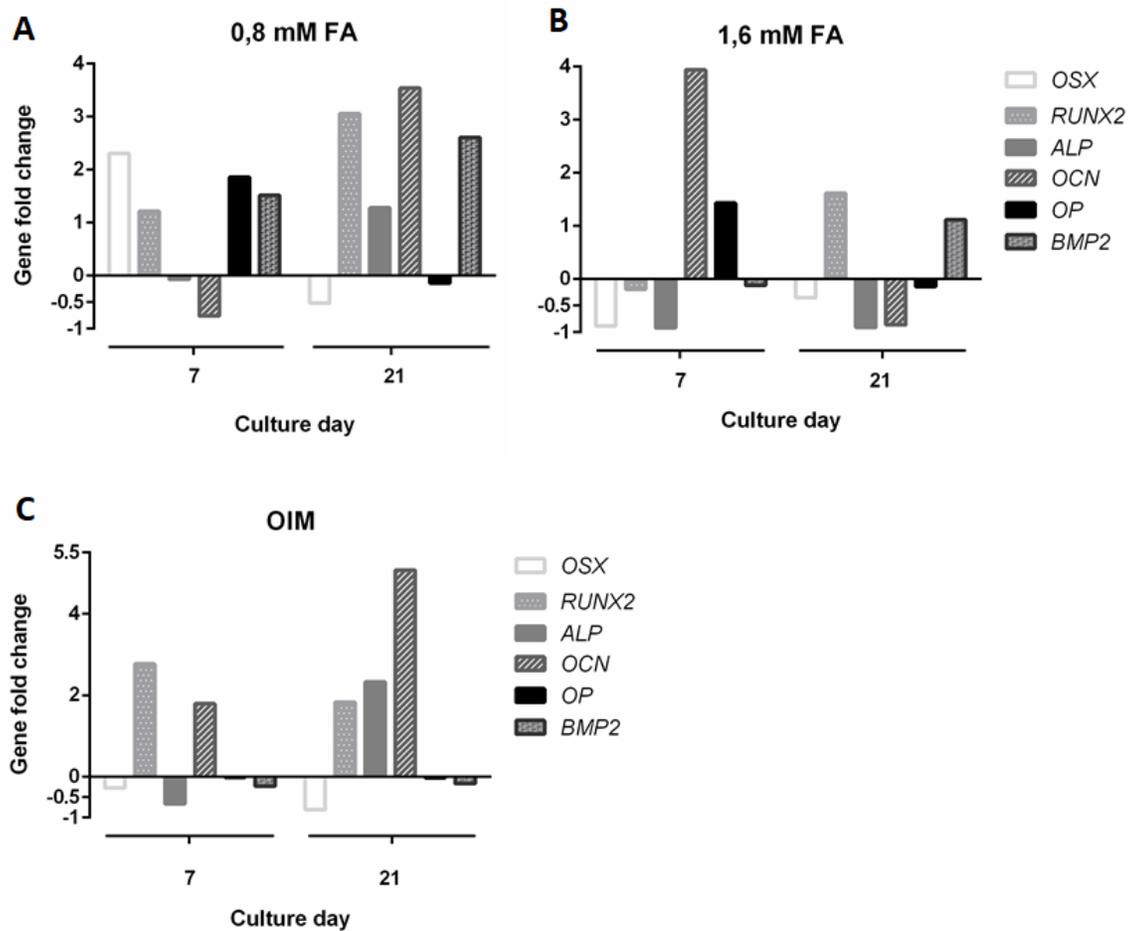


Figura 21. Expresión relativa de genes durante la diferenciación. El tratamiento con 0,8 mM indujo la sobreexpresión de *OSX* a los 7 días y de *RUNX2*, *OCN* y *BMP2* a los 21 días. El comportamiento de *RUNX2* y *OCN* en este grupo coincide con lo observado en el grupo tratado con OIM. En el grupo tratado con 1,6 mM *OCN* se expresó cuatro veces más que el control a los siete días de tratamiento, sin embargo, los demás marcadores mostraron una expresión similar al control o sus cambios no fueron significativos en los tiempos evaluados. En el grupo OIM *OCN* presentó una expresión más tardía, viéndose sobreexpresado cinco veces más que el control a los 21 días de tratamiento. Análisis estadístico realizado por Zita Bendahan.

9.5.4 Evaluación de los cambios en la expresión de Smad1/5/8 y p38.

Para evaluar la vía de señalización de BMP, se analizaron los cambios en la expresión y la fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 y p38 mediante la técnica de Western Blot para cada uno de los grupos de tratamiento.

Analizando la vía canónica, a los siete días fue posible observar la expresión de Smad1 (52-56 kDa) y Smad5/8 (52 kDa) de forma independiente. Se encontró expresión de estas proteínas en todos los grupos evaluados, pero Smad1 se expresó con mayor intensidad que Smad5/8. A pesar

de que, Smad1 y Smad5/8 se expresaron más en el grupo 0,8 mM que en el grupo control (0 mM), esta expresión fue menor que en 1,6 mM y OIM. Smad1/5/8 fosforilada (pSmad1/5/8) se observó presente en todos los grupos, pero se evidenció mayor intensidad en el grupo tratado con 0,8 mM de FA. A los 21 días, se detectó expresión de Smad1 en proporciones similares en todos los grupos y Smad5/8 ligeramente sobreexpresada en los grupos 0,8 mM y 1,6 mM de FA y OIM. A los 21 días Smad1/5/8 se observó fosforilada en todos los grupos, sin embargo, el grupo de 1,6 mM presentó los niveles más bajos de esta proteína y OIM los más altos; por su parte, en los grupos 0 y 0,8 mM se expresó en proporciones similares (Figura 22 A y B).

Con respecto a la vía de p38/MAPK, a los siete días de tratamiento, se observó aumento en la expresión de la proteína p38 no fosforilada en el grupo 0,8 mM, comparada con los demás grupos de tratamiento. p38 fosforilada (pp38) se expresó en todos los grupos, pero se observó aumentada en los grupos 0,8 mM, 1,6 mM y OIM con respecto al control, a los siete días de tratamiento. A los 21 días, los niveles de expresión de esta proteína disminuyeron en los grupos tratados con FA 0,8 y 1,6mM y en OIM al compararlos con los observados a los 7 días de tratamiento. Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de haberse reducido la expresión de p38 en el grupo de 0,8 mM fue similar a la del grupo OIM. p38 permaneció fosforilada a los 21 días en todos los grupos y aunque disminuyó sus niveles en los grupos 0,8 mM, 1,6 mM de FA y OIM en comparación con el día 7, el grupo tratado con 0,8mM presentó la mayor expresión de esta proteína en su estado fosforilado (Figura 22 A y C).

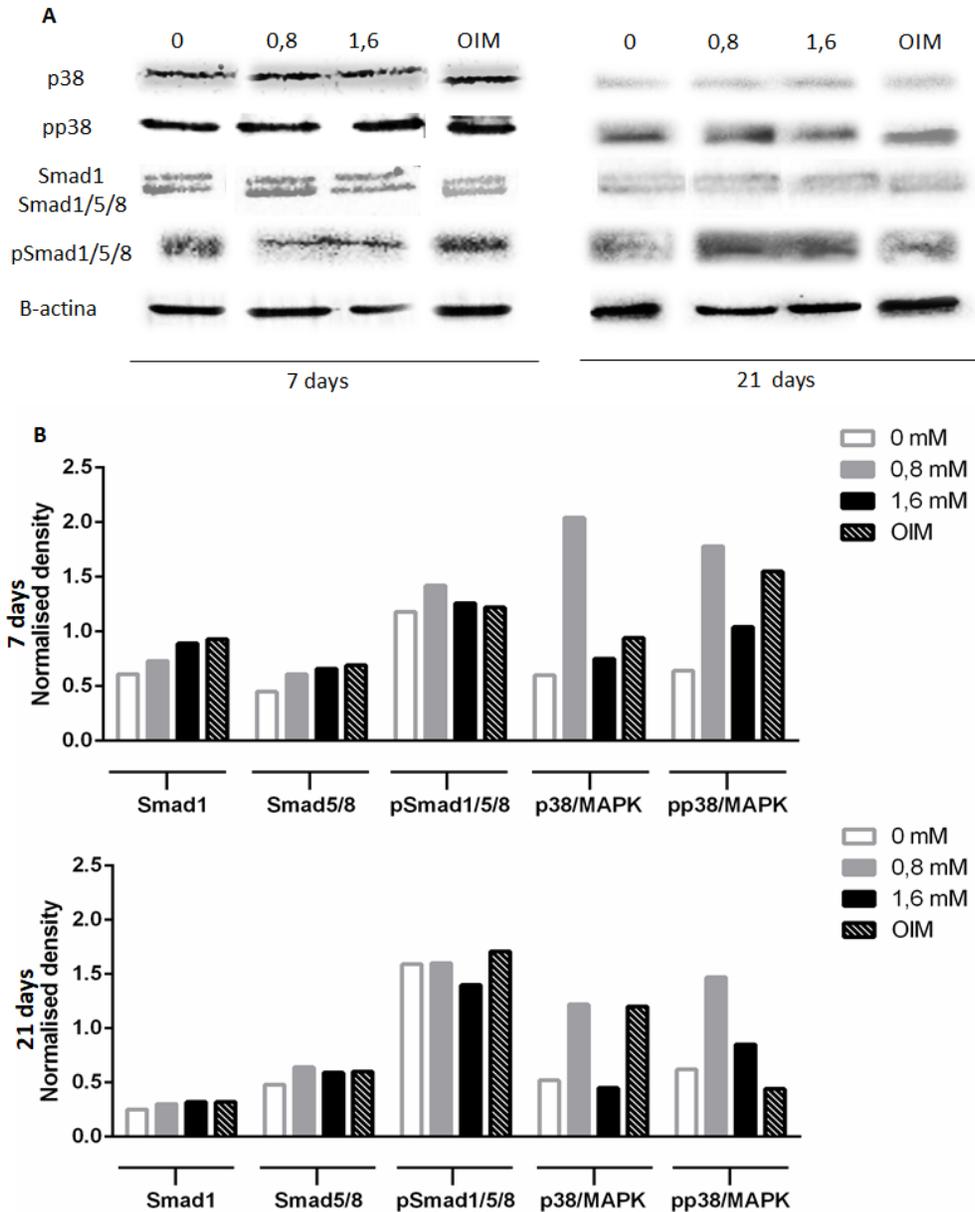


Figura 22. Efecto del FA en la expresión y fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 y p38. A los siete días, Smad1 se expresó con mayor intensidad que Smad5/8, y se observó ligeramente más expresadas en 1,6 mM y OIM. pSmad1/5/8 se observó presente en todos los grupos, pero se evidenció mayor intensidad en el grupo tratado con 0,8 mM de FA. A los 21 días, Smad5/8 se expresó ligeramente más en los grupos 0,8 mM y 1,6 mM de FA y OIM. A los 21 días pSmad1/5/8 presentó los niveles más altos en OIM y en los grupos 0 y 0,8 mM se expresó en proporciones similares. p38/MAPK, a los siete días de tratamiento, se observó aumentada en el grupo 0,8 mM; en su estado fosforilado (pp38) se observó aumentada en los grupos 0,8 mM, 1,6 mM y OIM con respecto al control. A los 21 días, la expresión de p38 en el grupo de 0,8 mM fue similar a la del grupo OIM y permaneció fosforilada en todos los grupos, expresándose con mayor intensidad en el grupo 0,8 mM FA. Fotos realizadas por Zita Bendahan, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque. Análisis estadístico realizado por Zita Bendahan.

Todos los grupos de tratamiento expresaron las proteínas Smad1/5/8 y p38/MAPK en su estado fosforilado. En el grupo control, pSmad1/5/8 se expresó más que pp38. Los grupos 0,8 mM FA y OIM evidenciaron patrones de expresión similares para ambas proteínas a los siete días de tratamiento, con excepción de pp38 que disminuyó considerablemente su expresión a los 21 días de tratamiento en el grupo OIM. El tratamiento con 1,6 mM de FA también promovió la activación de ambas proteínas, aunque su expresión fue ligeramente inferior comparada con 0,8 mM. Comparando los dos grupos de tratamiento de FA cabe resaltar que, a los siete días de tratamiento, 0,8 mM favoreció la fosforilación de p38/MAPK más que la de Smad1/5/8, contrario a lo observado con el tratamiento con 1,6 mM de FA.

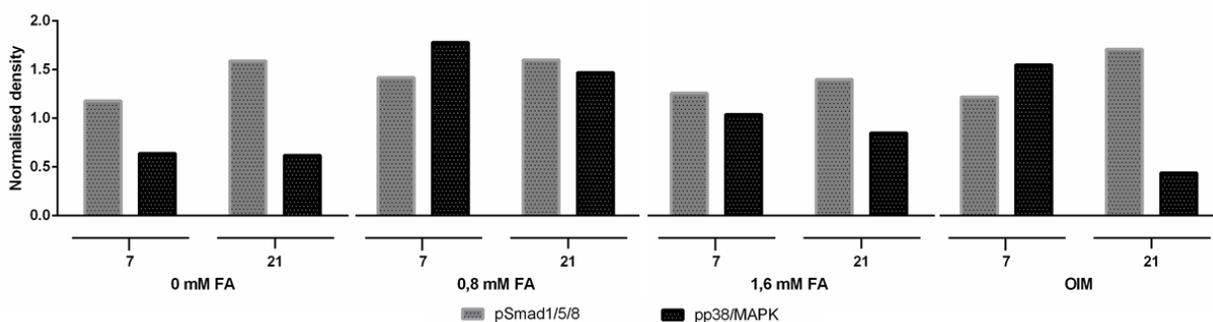


Figura 23. Patrón de expresión de las proteínas Smad1/5/8 y p38 en su estado fosforilado según el grupo de tratamiento. En el grupo control, pSmad1/5/8 se expresó más que pp38. Los grupos 0,8 mM FA y OIM evidenciaron patrones de expresión similares para ambas proteínas, con excepción de pp38 que disminuyó considerablemente su expresión a los 21 días de tratamiento en el grupo OIM. El tratamiento con 0,8 mM de FA favoreció la fosforilación de p38/MAPK más que la de Smad1/5/8 a los siete días de tratamiento, contrario a lo observado con el tratamiento con 1,6 mM de FA. Análisis estadístico realizado por Zita Bendahan.

10. DISCUSIÓN.

La deficiencia de FA se ha relacionado con una variedad de trastornos, incluyendo los DTN (Barua *et al.*, 2014), los cuales pueden ser prevenidos entre 50-70% mediante el consumo de FA antes del embarazo (Kobus *et al.*, 2009).

Sin embargo, el efecto del FA sobre la formación de hendiduras orofaciales es aún controversial. Revisiones sistemáticas realizadas recientemente (Blanco *et al.*, 2016; Millacura *et al.*, 2017; Jahanbin *et al.*, 2018) sugieren que el FA puede tener un efecto benéfico sobre la prevención del LPH no sindrómico. Otras revisiones sistemáticas concluyeron que el FA, solo o combinado con otras vitaminas, previene los DTN (De-Regil *et al.*, 2015), pero no existe fuerte evidencia sobre la asociación entre el LPH y la ingesta de FA aislado o en multivitamínicos (Johnson y Little, 2008).

El FA es necesario para la división celular, específicamente en condiciones donde las células requieren rápida proliferación celular y contribuye con el estado de metilación de moléculas celulares esenciales como el ADN, ARN y proteínas (Goh y Koren, 2008). Adicionalmente, se conoce que las células son muy susceptibles al déficit de folatos en periodos de gran actividad metabólica, como el de la embriogénesis (López-Camelo *et al.*, 2010), pero se conoce muy poco con respecto a la diferenciación de las células mesenquimales del paladar hacia osteoblastos después de la fusión de los procesos palatinos.

Estudios previos han determinado el efecto del FA en la proliferación y diferenciación osteogénica sobre osteoblastos y osteoclastos humanos *in vitro* (Herrmann *et al.*, 2007; Herrmann *et al.*, 2007), huevos fértiles de gallo (Kobus *et al.*, 2009), células de placenta humana (Ahmed *et al.*, 2016), de cresta neural de embriones de ratón (Melo *et al.*, 2017) y MSC de paladar de embrión de ratón (Xiao *et al.*, 2006) y de médula ósea (Santos *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta la fecha éste es el primer reporte sobre el efecto del FA sobre hDPSC y su diferenciación hacia el linaje osteoblástico y resulta importante teniendo en cuenta que estas células representan un modelo de gran relevancia para el estudio de todos los estadios de diferenciación osteogénica.

Comparar directamente los resultados obtenidos en esta investigación con otros estudios no es posible debido a las diferencias metodológicas que incluyen tipo celular, método de administración de la vitamina, concentraciones y tiempos de tratamiento. No obstante, se analizaron y compararon las tendencias de respuesta celular entre éste y los demás estudios reportados.

10.1 Efecto del FA sobre la proliferación celular.

Los estudios *in vitro* publicados hasta la fecha emplearon concentraciones de FA muy diversas, desde 10^{-7} mM hasta 1,1 mM (Xiao *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2007; Kobus *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). En este estudio se realizaron ensayos de proliferación celular con concentraciones desde 0,1 mM hasta 1,6 mM de FA durante seis días, con el propósito de evaluar cambios en la proliferación y la morfología celular. Los grupos tratados con 1,6 mM y 0,8 mM mostraron una reducción en su proliferación celular de 12,5% y 14,8%, respectivamente, en relación con el grupo control a los seis días de tratamiento; sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Además, estas concentraciones mostraron menor densidad celular y cambios en la morfología de las hDPSC comparadas con el grupo control, por lo que fueron escogidas como las concentraciones de trabajo.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Santos *et al.*, (2017), quienes evaluaron la proliferación de MSC de médula ósea tratadas con nanopartículas de hidroxiapatita cargadas con FA en un rango de concentración de 0,1 a 1,1 mM durante 7 días, sin encontrar cambios significativos en la proliferación y viabilidad de estas células (Santos *et al.*, 2017). Por otro lado, Ahmed *et al.* [2016] evaluó dos líneas celulares de placenta humana tratadas con FA de 10^{-12} a 10^{-2} mM y encontró que las células BeWo del trofoblasto vellosos tratadas con la mayor concentración de FA disminuyeron su viabilidad, probablemente asociado a inducción de necrosis. Adicionalmente, las células HTR-8/SVneo del trofoblasto extraveloso tratadas con las mismas concentraciones de FA aumentaron su proliferación posiblemente debido al efecto del FA en la replicación de ADN y la división celular (Ahmed *et al.*, 2016).

Xiao *et al.* [2006] evaluó MSC de paladar de embrión de ratón tratadas con FA de 0,02 a 0,23 mM y evidenció un aumento en la proliferación celular, sin significancia estadística, en células con silenciamiento del gen MTHFR.

Por su parte Kobus *et al.* [2009] encontró alteraciones en las etapas iniciales de la diferenciación de células neurales en embriones fértiles de huevos de gallo tratados con FA 10^{-7} mM (Kobus *et al.*, 2009). Por último, en estudios realizados por Courtemanche *et al.*, (2004) en linfocitos T CD8⁺ cultivados con 30 nM, 12 nM, 6 nM ó 0 nM de folato se encontró disminución en

la proliferación celular, proporcional con la dosis a la cual fueron cultivados, en comparación con el grupo de células tratadas con 3000 nM de folato (Courtemanche *et al.*, 2004).

La mayoría de los estudios adicionaron el FA directamente a los cultivos celulares a través del medio de cultivo, tal como se realizó en esta investigación. Sin embargo, Santos *et al.* [2017] expuso los cultivos celulares a nanopartículas de hidroxiapatita cargadas con FA y por su parte, Kobus *et al.* [2009] inyectó las sustancias en el saco vitelino de gallos. Estos dos estudios tampoco encontraron que el FA afectará la proliferación y la viabilidad celular (Kobus *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2017), lo que demuestra que la variabilidad de los efectos del FA depende del tipo de célula y sugiere que concentraciones elevadas de la vitamina pueden favorecer la proliferación de ciertos tipos celulares.

En el presente estudio, las concentraciones de 0,8 y 1,6mM de FA redujeron la proliferación de las hDPSC, aunque sin significancia estadística. Este efecto fue más notorio en el grupo tratado con 0,8 mM de FA. Es importante resaltar que el efecto de esta vitamina, además de ser dosis dependiente, también depende del tipo de célula tratada y de la forma de administración.

Poco se conoce en cuanto a la distribución de las células tratadas con FA en las diferentes fases del ciclo celular. Dentro de los estudios que reportan cambios en la distribución de las células en ciclo celular se encuentra el estudio de Hwang *et al.* (2018), quienes evaluaron células C2C12 de mioblasto de ratón inmortalizadas mantenidas en condiciones deficientes de folatos y encontraron que se inhibe parcialmente la diferenciación de las mismas, ya que se observó un aumento del porcentaje de células en la fracción sub-G1 del ciclo celular, lo cual es característico de células apoptóticas (Hwang *et al.*, 2018). Adicionalmente, Xiao *et al.* [2006] determinó que los suplementos de FA permitieron el paso del punto de restricción a nivel de G1/S y promovieron la proliferación celular normal en las MSC de paladar de ratón, que se encontraba disminuida por la inhibición del gen de la MTHFR (Xiao *et al.*, 2006). En el presente estudio, la evaluación del contenido de ADN, mostró una tendencia a mantener un mayor porcentaje de células en la fase de reposo (G0/G1) en el grupo tratado con 0,8 mM luego siete días de tratamiento, mientras que en el grupo tratado con 1,6 mM el mayor porcentaje de células se observó en la fase S, sugiriendo que el FA a la concentración de 0,8 mM podría estar favoreciendo la detención de las células en Go-G1 para la posterior inducción del proceso de diferenciación de las hDPSC.

10.2 Efecto del FA sobre la morfología celular.

El efecto del FA también fue evidente en la morfología celular. Las hDPSC tratadas con 0,8 mM y 1,6 mM se mantuvieron adheridas al plástico y se observaron más alargadas, con mayores prolongaciones y citoplasma de mayor tamaño que las células no tratadas (0 mM), desde los cuatro días de tratamiento. Cambios en la morfología de MSC inducidas a diferenciación hacia el linaje osteoblástico han sido previamente reportados, observándose células de morfología con forma de huso y aumento en prolongaciones celulares (Yu *et al.*, 2009). Santos *et al.* [2017] también obtuvo resultados similares en células MSC de médula ósea tratadas con partículas de hidroxiapatita cargadas con FA, observándose células más alargadas y mayores contactos célula a célula (Santos *et al.*, 2017).

No obstante, células de la cresta neural de embriones de ratón tratadas con 10^{-2} a 10^{-4} mM de FA no presentaron cambios evidentes en su morfología después de 48 horas (Melo *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que los cambios a nivel de la morfología celular dependen del tipo celular estudiado y del tipo y dosis de FA administrada.

10.3 Efecto del FA sobre la diferenciación celular.

El efecto del FA como factor inductor de diferenciación osteogénica aún no está bien establecido.

Se conoce que la actividad de ALP es un marcador temprano de diferenciación osteoblástica, en tanto que, la formación de matriz mineralizada es una característica de la fase tardía de esta diferenciación (Chen *et al.*, 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos por Santos *et al.* (2017), la actividad de ALP se incrementó en las MSC de médula ósea tratadas con partículas de hidroxiapatita y FA en un 150% a los tres días y 80% a los siete días de tratamiento (Santos *et al.*, 2017). En el presente estudio se observó formación de nódulos de mineralización y marcaje de ALP en ambos grupos tratados con FA (0,8 y 1,6mM), tanto a los 7 días como a los 21 días de tratamiento; sin embargo, la evaluación de estos cambios no se realizó a los 3 días de tratamiento como lo reportó Santos *et al.* (2017) en su estudio. El marcaje con ALP se observó simultáneamente en los grupos tratados con FA 0,8 mM, 1,6 mM y OIM, aunque en este último se evidenció con mayor intensidad. En cuanto a la formación de nódulos de mineralización estos fueron evidentes de forma más temprana en los grupos tratados con FA (7 días) en comparación con el grupo no tratado y el tratado con OIM, aunque la cantidad e intensidad de la coloración fue mayor en el grupo OIM después de 21 días de tratamiento. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que

el FA podría promover la diferenciación de las hDPSC hacia el fenotipo osteogénico, aumentando la formación de nódulos mineralizados y la actividad de ALP.

Posteriormente se evaluó la expresión de marcadores de diferenciación, por medio de RTqPCR, en las células tratadas con FA, OIM y sin tratamiento.

RUNX2 es el factor de transcripción más temprano de la vía de señalización para la diferenciación hacia osteoblastos (Lee *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2017), así como el principal regulador de la expresión de varios genes asociados con formación ósea y la mineralización de la matriz ósea (Santos *et al.*, 2017). A pesar de que en este estudio la expresión de este gen fue tardía, a los 21 días del tratamiento con 0,8 mM de FA se observó un aumento significativo, equivalente a tres veces más que el control. Santos *et al.* [2017] determinó que el aumento en la expresión de *RUNX2* se explica porque el FA mejora el estado de metilación celular, ya que en estudios previos fue reportado que la reducción global del estado de metilación celular inhibe la diferenciación celular y eso se refleja reduciendo la expresión de *RUNX2* (Santos *et al.*, 2017).

Otro gen considerado un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica es *ALP*, sin embargo, el FA no promovió cambios significativos en la expresión de este marcador en este estudio, contrario a lo observado en las MSC de médula ósea tratadas con partículas de hidroxiapatita cargadas con FA observado desde los 3 días de tratamiento (Santos *et al.*, 2017).

OSX es un factor de transcripción específico para la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea (Cao *et al.*, 2005), que generalmente se expresa durante las etapas tempranas del proceso de diferenciación celular (Baldión *et al.*, 2018). Esos reportes coinciden con los de este estudio, en el cual se registró un aumento de 2,3 veces la expresión de *OSX* a los siete días de tratamiento con 0,8 mM de FA.

OCN, *OP* y *BMP2* son los principales marcadores de la etapa final de diferenciación del linaje osteogénico (Chen *et al.*, 2013). Analizando independientemente cada uno de estos marcadores, *OP*, es una glicoproteína fosforilada, involucrada en la formación y calcificación ósea, por lo que también puede expresarse en etapas tempranas de la diferenciación osteogénica (Chen *et al.*, 2013). En este estudio, *OP* se expresó en igual proporción en los grupos tratados con FA y el control a los siete días de tratamiento y su expresión se vio desregulada a los 21 días. Según estos resultados, el FA no influyó sobre la expresión de este marcador en ninguno de los tiempos evaluados.

OCN es la proteína no colágena más abundante del tejido óseo, es liberada por el tejido calcificado y es un marcador de la fase final de la diferenciación osteogénica (Chen *et al.*, 2013).

En este estudio *OCN* aumentó su expresión progresivamente en el tiempo en el grupo OIM hasta expresarse cinco veces más que en el grupo no tratado. Este mismo patrón se evidenció en el grupo de 0,8 mM de FA, alcanzando una expresión 3,5 veces más que en el control. En cambio, el grupo tratado con 1,6 mM de FA presentó un patrón de expresión inverso, en el cual este gen se vio sobreexpresado 3,9 veces más que el control a los siete días de tratamiento, pero decayó hasta verse reprimido a los 21 días de tratamiento.

BMP2 induce la diferenciación de las MSC hacia osteoblastos actuando directamente sobre ellas, pudiendo ser secretada de forma autocrina o paracrina (Yang *et al.*, 2014). La expresión de *BMP2* aumentó progresivamente en el tiempo hasta alcanzar valores 2,6 veces superiores al control, exclusivamente en el grupo de 0,8 mM de FA a los 21 días. En el grupo tratado con 1,6 mM de FA, *BMP2* alcanzó una expresión similar a la observada en el grupo control a los 21 días de tratamiento.

Estos resultados demuestran que la concentración de 0,8 mM de FA aumenta significativamente la expresión de *OSX*, *OP*, *OCN*, *RUNX2* y *BMP2* en los tiempos analizados, mientras que la concentración de 1,6 mM de FA promueve únicamente la expresión de *OCN* y *RUNX2* a los siete días de tratamiento. Adicionalmente, sugieren que *OSX* participa en los estadios iniciales de la diferenciación osteogénica inducida por el FA 0,8 mM, pero no participa en las fases tardías de la mineralización osteoblástica; y, el aumento de la expresión de *OP*, *OCN*, *RUNX2* y *BMP2* a los 21 días de tratamiento con la misma concentración de FA muestra la estrecha relación de estos marcadores con la biomineralización ósea o cristalización de la hidroxiapatita, es decir que participan durante la etapa de calcificación ósea (Chen *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017). En el presente estudio, el FA regula positivamente los genes *OP*, *OCN*, *RUNX2* y *BMP2*, lo cual coincide con los resultados de Santos *et al.* (2017), quienes también describieron la considerable sobreexpresión de *RUNX2* y ALP en las MSC tratadas con partículas de hidroxiapatita cargadas con FA (Santos *et al.*, 2017).

Por lo tanto, los resultados en conjunto sugieren que el tratamiento *in vitro* de las hDPSC con FA a una concentración de 0,8 mM promueve la mineralización de la matriz extracelular, la actividad de ALP y estimula la señalización osteoinductiva para promover la diferenciación osteogénica, lo cual, muestra un efecto positivo del FA *in vitro* sobre la diferenciación de este linaje celular hacia osteoblastos.

10.4 Vía de señalización del FA.

Estudios previos en modelos animales reportaron posibles vías de acción del FA que convergen en la activación del *TGF β* (Yao *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2011; López-Gordillo *et al.*, 2019; Sarper *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado el efecto del FA sobre la activación de proteínas cascada abajo del *TGF β* .

Debido a que las BMP son un subgrupo perteneciente a la superfamilia del Tgf β (Wang *et al.*, 2014; Nickel y Mueller, 2019) y la señalización mediada por BMP es esencial para la palatogénesis (Lu *et al.*, 2000) fue de interés evaluar cambios en la expresión y fosforilación de proteínas cascada abajo de esta vía de señalización.

La vía de señalización de las BMP ha sido muy estudiada y se conoce a profundidad. Después de la formación del complejo BMP-BMPRI-BMPRII se activan dos vías de señalización, una de ellas es mediada por proteínas Smad y la otra por la p38/MAPK (Granjeiro *et al.*, 2005).

En la vía canónica de las BMP, los receptores heterotetraméricos con actividad serina/treonina cinasa catalizan la fosforilación de las serinas del extremo terminal carboxilo del grupo de Smad reguladas por receptores (R-Smad), al cual pertenecen las Smad1/5/8, ocasionando cambios conformacionales en estas proteínas. Posteriormente, las proteínas Smad fosforiladas se unen con Smad4 y son translocadas al núcleo donde participan en la regulación de sus genes diana (Funaba y Murakami, 2008; Smith *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Beederman *et al.*, 2013; Nickel y Mueller, 2019). Además, Smad1/5 se unen directamente al ADN, pero tienen relativamente baja afinidad y su interacción con las proteínas de unión es crucial para la formación de un complejo de unión estable (Funaba y Murakami, 2008).

La fosforilación endógena de Smad por las proteínas de la familia del TGF β , puede no ser detectada debido a su baja probabilidad de fosforilación y a la baja sensibilidad de los sistemas de detección para estas proteínas, o probablemente debido a ambas causas (Funaba y Murakami, 2008). Sin embargo, en este estudio fue posible detectar la expresión de Smad1/5/8, tanto en su estado activo como inactivo, desde los siete días de tratamiento. La expresión de pSmad1/5/8 aumentó en respuesta al tratamiento con 0,8 mM FA a los siete días, en contraste con lo observado a los 21 días donde se expresó incluso en ausencia de FA. Esto sugiere que Smad1/5/8 puede estar fosforilada constitutivamente en las hDPSC y que el tratamiento con 0,8 mM FA promueve un aumento leve en la activación de esta proteína. Un hallazgo similar fue reportado previamente, cuando se identificó la activación constitutiva de la vía de señalización de BMP, mediante la

detección del aumento en los niveles basales de pSmad1/5/8 en osteoblastos de calvaria (Rath *et al.*, 2011).

Por otra parte, la vía de p38/MAPK independiente de Smad tiene una importante contribución en la diferenciación de los osteoblastos (Chen *et al.*, 2004; Cong *et al.*, 2017) y la formación ósea *in vivo* (Chen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que BMP2 activa a p38, a las cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, por sus siglas en inglés) y a las cinasas c-Jun N-terminal 1/2 (JNK) para promover la diferenciación osteoblástica (Guicheux *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2015). La activación de p38/MAPK se produce específicamente por el receptor tipo I del TGF β (TGF β I), a través de la fosforilación dual de los residuos Thr180 y Tyr182, por medio de las MKK3 y MKK6 y de la actividad cinasa del receptor (Yu *et al.*, 2002).

En este estudio, se observó expresión de p38 fosforilada y no fosforilada en todos los tiempos del grupo control, lo cual indica que la misma se encuentra presente y activa constitutivamente en las hDPSC. Adicionalmente, el aumento en la expresión de los dos estados de la proteína p38 (fosforilada y no fosforilada) en el grupo de 0,8 mM comparado con los otros grupos, sugiere un efecto del FA sobre la expresión y la fosforilación de esta proteína, el cual, además, es dependiente de la dosis de FA y superior al efecto inducido por el OIM.

En conjunto, Smad1/5/8 y p38/MAPK se activaron luego de estimular las hDPSC con 0,8 mM FA durante siete días. Entonces, en estas células, la concentración 0,8 mM FA indujo el aumento temprano de p38 y por consiguiente su activación temprana. La vía de Smad1/5/8 también se vio estimulada pero su fosforilación fue de menor intensidad que la observada en p38. El tratamiento con FA indujo la fosforilación de Smad1/5/8 y p38/MAPK, lo que indica la activación de la cascada de señalización de las BMP; además, también promovió la activación de genes osteoblásticos.

Guicheux *et al.* [2003] reportó que p38/MAPK participa principalmente en la activación de ALP inducida por BMP2 y modula la producción de OCN. Estos hallazgos son similares a los encontrados en el presente estudio donde las hDPSC tratadas con 0,8 mM de FA presentaron mayor expresión de la proteína pp38 y regulación positiva de OCN y BMP2.

Previamente, se demostró que Smad1 interactúa directamente con Homeobox C8 (Hoxc8) y activa el gen de la OP (Cao y Chen, 2005) y que la fosforilación de Smad1/5/8 promueve la regulación positiva de OPG, RUNX2 y Msh Homeobox 2 (MSX2) (Rath *et al.*, 2011). En este estudio, se observó el aumento en la expresión de RUNX2, OP y pSmad1/5/8 en el grupo tratado con 0,8 mM de FA, lo cual muestra la activación de la vía canónica de las BMP como consecuencia del tratamiento con FA utilizando la dosis de 0,8 mM.

Estos resultados sugieren que la cooperación de Smad1/5/8 y p38/MAPK juega un papel crucial en la fase inicial de la diferenciación de las hDPSC hacia osteoblastos inducida por FA y, por lo tanto, sugiere un posible mecanismo de acción de esta vitamina en los procesos de diferenciación osteoblástica.

De acuerdo con lo descrito previamente, el FA participa en la activación de la vía de las BMP, miembro importante de la familia del *TGFβ*. Estos resultados muestran por primera vez que el FA participa en la activación de ambas vías de señalización, la vía asociada a Smad y la asociada a p38/MAPK, las cuales indujeron la expresión de los marcadores de diferenciación osteogénica: *RUNX2*, *OP*, *BMP2* y *OCN* (Figura 24).

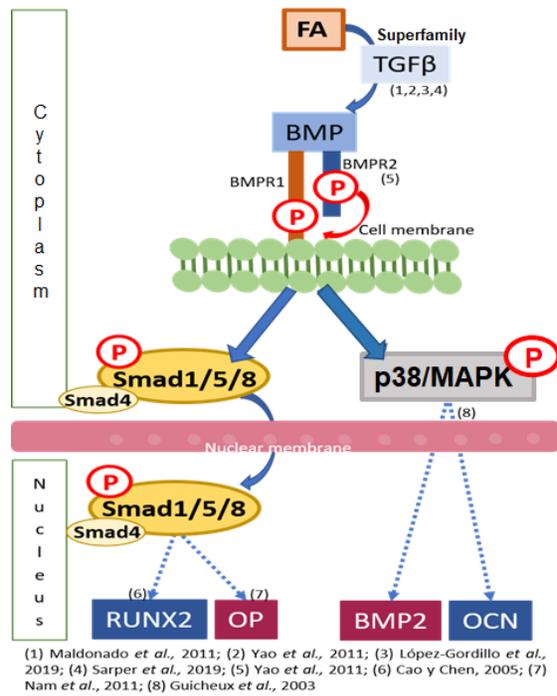


Figura 24. Vía de señalización del FA. El FA participa en la activación de la vía de las BMP, miembro importante de la familia del *TGFβ*. En este estudio se identificó que luego de la formación del complejo BMP-BMPR1-BMPR2, se activan ambas vías de señalización, la vía asociada a Smad y la asociada a p38/MAPK, las cuales inducen la expresión de los marcadores de diferenciación osteogénica: *RUNX2*, *OP*, *BMP2* y *OCN*. Figura realizada por Zita Bendahan.

11. CONCLUSIONES.

- El tratamiento de células hDPSC con FA indujo cambios morfológicos y redujo la proliferación celular a partir del cuarto día de tratamiento.
- Los efectos encontrados en las células hDPSC fueron directamente dependientes de la concentración de FA utilizada.
- La concentración 0,8 mM de FA promovió la diferenciación de las células hacia el linaje osteoblástico, como se comprobó con el incremento en el marcaje de ALP y la expresión de genes específicos de diferenciación: *OSX*, *OP*, *OCN*, *RUNX2* y *BMP2*.
- El tratamiento con FA indujo activación y fosforilación de p38 y Smad1/5/8, aunque esta última vía fue estimulada con menor intensidad.

12. PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir un efecto inductor de diferenciación osteoblástica estimulada por el tratamiento con FA de células hDPSC. Adicionalmente, estos hallazgos permitieron describir la participación del FA en la activación de las vías de señalización de Smad1/5/8 y p38/MAPK, que convergen en la activación de genes de diferenciación osteoblástica.

Desde el punto de vista clínico, se podría pensar que el FA puede estar participando en la prevención del PH, como lo sugieren previos estudios, por medio de la inducción de la diferenciación de las MSC hacia el linaje osteogénico, favoreciendo así la formación ósea y la fusión de los procesos palatinos. Por lo tanto, estos hallazgos refuerzan la importancia de los suplementos de FA en mujeres durante las etapas pre y periconcepcional. Sin embargo, teniendo en cuenta la etiología multifactorial del LPH, es probable que el FA ejerza un efecto sinérgico con otros mecanismos que converjan en la prevención de la hendidura.

A pesar de que el potencial osteoinductor del FA a nivel *in vitro* no fue equivalente al del OIM, esta vitamina podría ser considerada como una promisoriosa estrategia potencializadora de la formación ósea. Por lo tanto, en el marco de la ingeniería de tejidos, resulta interesante continuar estudiando el efecto del FA en conjunto con otros factores con potencial osteogénico demostrado, como la BMP2 o BMP9, en modelos *in vitro* e *in vivo*, lo cual podría ayudar a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para promover la formación ósea a través de la diferenciación osteogénica.

13. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ahmed T, Fellus I, Gaudet J, MacFarlane AJ, Fontaine-Bisson B, Bainbridge SA. Effect of folic acid on human trophoblast health and function in vitro. *Placenta*. 2016 Jan;37:7–15.
2. Akpınar A, Karakan NC, Alpan AL, Dogan SSA, Goze F, Poyraz O. Comparative effects of riboflavin, nicotinamide and folic acid on alveolar bone loss: A morphometric and histopathologic study in rats. *Srp Arh Celok Lek*. 2016;144:273–9.
3. American Cleft Palate-Craniofacial Association. Parameters for Evaluation and Treatment of Patients with Cleft Lip/Palate or other Craniofacial Anomalies [Internet]. Chapel Hill: American Cleft Palate-Craniofacial Association; 2009 [citado 15 de enero 2020]. p. 7. Disponible en: <http://www.acpa-cpf.org>.
4. Bailey L; Berry R. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage. *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):1213S–7S.
5. Baldi3n P, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int. J. Cell Biol*. 2018.
6. Barua S, Chadman KK, Kuizon S, Buenaventura D, Stapley NW, Ruocco F, et al. Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. *PLoS One*. 2014;9:e101674.
7. Beederman M, Lamplot J, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng*. 2013;6(8A):32–52.
8. El Bialy I, Jiskoot W, Reza M. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharm Res*. 2017;34:1152–70.
9. Bienengraber V, Malek FA, M3rirtz KU, Fanghanel J, Gundlach KK, Weingartner J. Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. *Cleft Palate Craniofac J*. 2001;38:393–8.
10. Blanco R, Colombo A, Pardo R, Suazo J. Maternal biomarkers of methylation status and non-syndromic orofacial cleft risk: a meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016;45:1323–1332.
11. Brederlau A, Faigle R, Elmi M, Zarebski A, Sjöberg S, Fujii M, Miyazono K, Funa K. The bone morphogenetic protein type Ib receptor is a major mediator of glial differentiation and cell survival in adult hippocampal progenitor cell culture. *Mol Biol Cell*. 2004;15(8):3863-75.
12. Brown NL; Sandy JR. Basic sciences in normal and abnormal palate development. *Braz J Oral Sci*. 2002;1:60-70.
13. Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, Sadler TW. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology*. 2002;65:219–27.

14. Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS, et al.. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73:679–89.
15. Cao Y, Zhou Z, De Crombrughe B, Nakashima K, Guan H, Duan X. Osterix, a Transcription Factor for Osteoblast Differentiation, Mediates Antitumor Activity in Murine Osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005;65(4):1124-8.
16. Cong Q, Jia H, Li P, Qiu S, Yeh J, Wang Y. p38 α MAPK regulates proliferation and differentiation of osteoclast progenitors and bone remodeling in an aging-dependent manner. *Scientific Reports.* 2017;7:45964.
17. Courtemanche C, Elson-Schwab I, Mashiyama ST, Kerry N, Ames BN. Folate Deficiency Inhibits the Proliferation of Primary Human CD8_ T Lymphocytes In Vitro. *J Immunol.* 2004;173:3186–92.
18. Chen D; Zhao M; Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-41.
19. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272-88.
20. Chen C, Ke J, Zhou E, Yi W, Brunzelle J, Li J, *et al.* Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature.* 2013;500:486–9.
21. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992;327:1832–5.
22. Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *Am J Med Genet.* 1996;62:179–83.
23. Czeizel AE, Tímár L, Sárközi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics.* 1999 Dec;104(6):e66.
24. De-Regil LM, Fernández-Gaxiola AC, Dowswell T, Peña-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;10:CD007950.
25. De-Regil LM, Peña-Rosas JP, Fernández-Gaxiola AC, Rayco-Solon P. Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;14:CD007950.
26. Dixon, MJ; Marazita, ML; Beaty, TH; Murray, JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):167-78.
27. Ebioscience. Thermo Fisher Scientific. Estados Unidos: ebioscience.com. 2012. -[acceso el 27 de septiembre de 2019] Disponible en: <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/bmp-pathway.htm>

28. Escobar LM, Rivera A, Aristizábal F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2010;17(1):67-74.
29. Escobar L, Prada-Arismendy J, Téllez C, Castellanos J. Bases genéticas de la formación de fisuras labiales y/o palatinas en humanos. *Rev. CES Odont* 2013;26(1) 57-67.
30. European Surveillance of Congenital Anomalies. (Eurocat) Prevention of neural tube defects by periconceptional folic acid supplementation in Europe. Special report. Northern Ireland: 2009.
31. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin*. 2006;58(5):498-511.
32. Fritz DT; Jiang S; Xu J; Rogers MB. A polymorphism in a conserved posttranscriptional regulatory motif alters Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) RNA: Protein Interactions. *Molec Endocrinol*. 2006;20(7):1574-86.
33. Funaba M, Murakami M. A sensitive detection of phospho-Smad1/5/8 and Smad2 in Western blot analyses. *J. Biochem Biophys. Methods*. 2008;70:816–9.
34. Gajdos V; Bahuau M; Robert-Gnansia E; Francannet C; Cordier S; Bonaïti-Pellié C. Genetics of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: is there a Mendelian subentity? *Ann Genet*. 2004;47:29–9.
35. Goh IY, Bollano E, Einarson TR, Koren G. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006;28:680–689.
36. Goh YI, Koren G. Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *J Obstet Gynaecol*. 2008;28:3–13.
37. Gómez de Ferraris ME; Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. Ed. Panamericana (ebook). México;2009.
38. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1463-73.
39. Gratacós E; Gómez E; Nicolaides E; Romero R; Cabero R. *Medicina fetal (ebook)*. Primera edición. Ed. Médica Panamericana. España; 2009:255-6.
40. Green NS. Folic acid supplementation and prevention of birth defects. *J Nutr*. 2002;132:2356S–2360S.
41. Gregory C, Grady W, Peister A, Prockop D. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem*. 2004;77.
42. Gronthos S¹, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(25):13625-30.

43. Guarnizo, S. Caracterización geoespacial de personas con labio y paladar hendido en el territorio colombiano en el periodo 2010 – 2015 [tesis de especialización]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2017. 106p.
44. Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor J, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun-NH2-Terminal Kinase by BMP-2 and Their Implication in the Stimulation of Osteoblastic Cell Differentiation. *J Bone Miner Res.* 2003;18(11):2060-8.
45. Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol.* 1996;143:1229–34.
46. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2000;343:1608–14.
47. Herrera MJ, Muñoz AM, Parra BE. Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). *Rev Chil Nutr.* 2016;43:336–345.
48. Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Schmidt J, Widmann T, et al. Accumulation of homocysteine by decreasing concentrations of folate, vitamin B12 and B6 does not influence the activity of human osteoblasts in vitro. *Clin Chim Acta.* 2007 Sep;384(1-2):129–34.
49. Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni G, Al Marrawi F, Widmann T, et al. Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone.* 2007 Oct;41(4):584–91.
50. Hwang SY, Kang YJ, Sung B, Jang JY, Hwang NL, Oh HJ. Folic acid is necessary for proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):736-47.
51. Jahanbin A, Shadkam E, Miri HH, Shirazi AS, Abtahi M. Maternal Folic Acid Supplementation and the Risk of Oral Clefts in Offspring. *J Craniofac Surg.* 2018;29: e534–e541.
52. Jia ZL; Shi B; Chen CH; Shi JY; Wu J; Xu X. Maternal nutrition, environmental exposure during pregnancy and the risk of non-syndromic orofacial cleft. *Oral Dis.* 2011;17:584-9.
53. Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008;37:1041–58.
54. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, Kim Y, Woo HM, Kim W. Effect of Matrigel on the Osteogenic Potential of Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Vet Med Sci.* 2012;74(7):827-36.
55. Kobus K, Nazari EM, Müller YM. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. *Histochem Cell Biol.* 2009;132:525–32.
56. Kriangkrai R, Chareonvit S, Iseki S, Limwongse V. Pretreatment Effect of Folic Acid on 13-Cis-RA-Induced Cellular Damage of Developing Midfacial Processes in Cultured Rat Embryos. *Open Dent J.* 2017;11:200–212.

57. Krivicka B, Pilmane M, Akota I. Expression of growth factors and growth factor receptors in human cleft-affected tissue. *Baltic Dental and Maxillofacial Journal*. 2013;15:111-8.
58. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):8783-92.
59. Linus Pauling Institute, Oregon State University [acceso el 19 de diciembre de 2019)].]. Disponible en:<https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/folate>.
60. Liu W; Sun X; Braut A; Mishina Y; Behringer R; Mina Mina M; Martin J. Distinct functions for BMP signaling in lip and palate fusion in mice. *Development* 2005;132:1453-61.
61. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM. Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet Part A*. 2010;152A:2444–58.
62. López-Gordillo Y, Maldonado E, Nogales L, Del Río A, Barrio MC, Murillo J, et al. Maternal folic acid supplementation reduces the severity of cleft palate in Tgf- β 3 null mutant mice. *Pediatric Research*. 2019;85:566–73.
63. Lu H; Jin Y; Tipoe GL. Alteration in the expression of bone morphogenetic protein-2,3,4,5 mRNA during pathogenesis of cleft palate in balb/c mice. *Arch Oral Biol*. 2000;45:133-40.
64. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;3:CD001056. Review.
65. Maldonado E, Murillo J, Barrio C, Del Río A, Pérez-Miguelsanz J, López-Gordillo Y. Occurrence of Cleft-Palate and Alteration of *Tgf- β 3* Expression and the Mechanisms Leading to Palatal Fusion in Mice following Dietary Folic-Acid Deficiency. *Cells Tissues Organs*. 2011;194:406–20.
66. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet*. 2001;98:357–60.
67. Melo FR, Bressan RB, Costa-Silva B, Trentin AG. Effects of Folic Acid and Homocysteine on the Morphogenesis of Mouse Cephalic Neural Crest Cells In Vitro. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37:371–6.
68. Millacura N, Pardo R, Cifuentes L, Suazo J. Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: a meta-analysis. *Public Health Nutr*. 2017;20:2260–2268.
69. Montenegro MA, Rojas MA. Transformación epitelio-mesenchimal durante el desarrollo embrionario. *Rev Chil Anat*. 2001;19(3).

69. Munz SM; Edwards SP; Inglehart MR. Oral health-related quality of life and satisfaction with treatment and treatment outcomes of adolescents/young adults with cleft lip/palate: an exploration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40:790-6.
70. Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J. Clin. Invest*. 2004;113:1676–8.
71. NanoDrop Spectrophotometers T042 Technical Bulletin, ThermoFisher. Estados Unidos. 2020. -[acceso el 19 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/253489716/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios-pdf>
72. Nickel J, Mueller TD. Specification of BMP Signaling. *Cells*. 2019 Dec 5;8(12).
73. Obican SG, Finnell RH, Mills JL, Shaw GM, Scialli AR. Folic acid in early pregnancy: a public health success story. *FASEB J*. 2010;24:4167–74.
74. Parada C, Chai Y. Roles of BMP Signaling Pathway in Lip and Palate Development. *Front Oral Biol*. 2012;16:60–70.
75. Park SY, Kim KH, Kim S, Lee YM, Seol YJ. BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. *Pharmaceutics*. 2019;11(8)393.
76. Paros A, Beck S. Folinic Acid Reduces Cleft Lip [CL(P)] in A/WySn Mice. *Teratology*. 1999; 60:344–7.
77. Phillips G. Bone morphogenetic protein and cartilage. Volume 2. (ebook). World Scientific. EEUU; 2003.
78. PubChem, NIH, US National Library of Medicine. [acceso el 19 de diciembre de 2019]. Disponible en: [https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/folic acid](https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/folic%20acid).
79. Rath B, Nam J, Deschner J, Schaumburger J, Tingart M, Grassel S. Biomechanical forces exert anabolic effects on osteoblasts by activation of SMAD 1/5/8 through type 1 BMP receptor. *Biorheology*. 2011;48:37–48.
80. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Wyatt PR, Cole DE. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *J Pediatr*. 2003;143:805–7.
81. Reyes Velázquez JO; Osorio GR. Manejo integral de pacientes con labio y paladar hendido. *Med Oral*. 2011;13(1):22-25.
82. Reynolds P, Schaalje GB, Seegmiller RE. Combination Therapy with Folic Acid and Methionine in the Prevention of Retinoic Acid-Induced Cleft Palate in Mice. *Birth Defects Res*. 2003;67:168–73.
83. Rodríguez-Carballo E, Gámez B, Ventura F. p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation. *Front. Cell Dev. Biol*. 2016;4:40.

84. Sadler. Embriología Médica de Langman. Con orientación clínica. 10ma edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina; 2007:283-9.
85. Santos C, Gomes P, Duarte JA, Almeida MM, Costa ME, Fernandes MH. Development of hydroxyapatite nanoparticles loaded with folic acid to induce osteoblastic differentiation. *Int J Pharm.* 2017;10:516(1–2):185–95.
86. Sarper S, Inubushi T, Kurosaka H, Minagi H, Murata Y, Kuremoto K. Anterior cleft palate due to Cbfb deficiency and its rescue by folic acid. *Dis Model Mech.* 2019;12(6).
87. Scheller K, Röckl T, Scheller C, Schubert J. Lower concentrations of B-vitamin subgroups in the serum and amniotic fluid correlate to cleft lip and palate appearance in the offspring of A/WySn mice. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1601.e1–7.
88. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally. *Lancet.* 1995;346:393–6.
89. Smith T; Lozanoff S; Lyannar P; Nazarali A. Molecular signaling along the anterior-posterior axis of early palate development. *Craniofacial Biol.* 2013;3(488):1-14.
90. Suárez-Obando F, Ordóñez-Vásquez A, Zarante I. Defectos del tubo neural y ácido fólico: patogenia, metabolismo y desarrollo embriológico: Revisión de la literatura. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010;61:49–60.
91. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after preconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology.* 1995;51:71–8.
92. Van Gool JD, Hirche H, Lax H, De Schaepdrijver L. Folic acid and primary prevention of neural tube defects: A review. *Reprod Toxicol.* 2018;80:73–84.
93. Van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol.* 2003;157:583–91.
94. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(1):87-105.
95. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughy DR, Abyholm F, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population-based case–control study. *Br Med J.* 2007;334:433–434.
96. Wu Y, Zhou J, Li Y, Zhou Y, Cui Y, Yang G, et al. Rap1A Regulates Osteoblastic Differentiation via the ERK and p38 Mediated Signaling. *PLoS ONE.* 2015;10(11).
97. Xiao WL, Wu M, Shi B. Folic acid rivals methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene-silencing effect on MEPM cell proliferation and apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2006 Nov;292(1–2):145–54. Epub 2006 Jul 11. Erratum in: *Mol Cell Biochem.* 2006 Feb;296(1–2):203–4.

98. Yang J, Shi P, Tu M, Wang Y, Liu M, Fan F, et al. Bone morphogenetic proteins: Relationship between molecular structure and their osteogenic activity. *Food Science and Human Wellness*. 2014;3:127–35.
99. Yao Z, Chen D, Wang A, Ding X, Liu Z, Ling L, et al. Folic acid rescue of ATRA-induced cleft palate by restoring the TGF- β signal and inhibiting apoptosis. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:433–9.
100. Yu L, Hébert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J*. 2002;21(14):3749-59.
101. Yu H, Wooley P, Yang SY. Biocompatibility of Poly--caprolactone-hydroxyapatite composite on mouse bone marrow-derived osteoblasts and endothelial cells. *J. Orthop. Surg. Res*. 2009; 4:5.
102. Zaganjor I, Sekkarie A, Tsang BL, Williams J, Razzaghi H, Mulinare J, et al. Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review. *PLoS ONE*. 2016;11(4).