



Caracterización clínica de injertos autólogos a partir de fibroblastos gingivales crecidos sobre una matriz biológica para el tratamiento de recesiones gingivales: Reporte de un caso clínico

Carlos Alberto Monteagudo Arrieta,* María Guadalupe Marín González,[§] Filiberto Enriquez Habib,^{||} Izazkun Penilla Acasuso,[¶] Edgar Krötzsch,[‡] Saúl Cano Colín**

RESUMEN

Antecedentes: La ingeniería tisular ha sido utilizada en diferentes campos de la odontología y medicina contemporánea. La propuesta de este estudio es el desarrollo de injertos autólogos a partir del cultivo de fibroblastos gingivales en una matriz biológica para la cobertura radicular como opción para el tratamiento de recesiones gingivales. **Método:** Un paciente del sexo masculino sistemáticamente sano, no fumador con recesiones gingivales en primer premolar, segundo premolar y primer molar superior derecho. Al paciente se le realizó una excisión de una porción del tejido blando del paladar para desarrollar la línea celular del tejido gingival, mismo que se transportó en un tubo estéril de 50 mL con medio de cultivo (D-MEM). Las células crecieron en botellas de cultivo de 75 cm² durante ocho días. A la confluencia, se obtuvo un conteo de más de 1 millón de células por cm², se sembraron sobre una membrana de submucosa intestinal de cerdo (OASIS®). El bioimplante se injertó quince días después de haberse tomado la muestra. Se preparó como lecho receptor la zona de las tres recesiones a través de un colgajo mucoperiostico de espesor parcial, para recibir el injerto. El injerto se fijó con puntos simples usando sutura cinco ceros de ácido poliglicólico cinco ceros, posteriormente se desplazó el colgajo coronalmente. **Resultados:** El seguimiento del primer al segundo mes mostró una buena epitelización y estabilización del tejido en la cobertura radicular del tercio apical de las raíces mesial y disto-vestibulares en el diente 16. Las recesiones gingivales de los dientes 14 y 15 no mostraron ganancia.

ABSTRACT

Background: Tissue engineering has been developed and used in different fields of contemporary medicine and dentistry. The purpose of this study was to develop autologous grafts based on the culture of gingival fibroblasts supported in a biological matrix for the coverage of root exposure in gingival recessions. **Methods:** A healthy patient with generalized gingival recessions and limited prognosis for mucogingival conventional procedures was treated in this study. A palatal biopsy was carried out to develop a cellular line, the gingival tissue was transported in a sterile 50 mL tube with culture medium (D-MEM). Gingival fibroblasts grew in 75 cm² culture bottles during eight days. In confluence 1 million cells per cm² were counted. Subsequently, they were scattered in a submucosal intestinal pig membrane (OASIS®). The bioimplant was grafted fifteen days after biopsy was taken. The receptor site was prepared with a mucoperiosteal flap design. The graft was fixed with polyglycolic acid suture, later the flap was coronally displaced. **Results:** It was observed a stable wound healing during the monitoring of the first and second month, with mature gingival epithelium on the apical third of the root coverage in the first upper right molar. No coverage was observed in the first and second upper premolars.

Palabras clave: Recesión gingival, bioimplante injerto autólogo, ingeniería tisular.

Key words: Gingival recessions, bioimplant, autologous graft, tissue engineering.

www.medigraphic.com

* Cirujano Dentista, Residente de la Especialidad de Periodoncia de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

§ Coordinadora de la Especialidad de Periodoncia e Implantología de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

|| Profesor Titular de la materia de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNAM.

¶ Cirujano Dentista, residente de la Especialidad de Periodoncia de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

‡ Jefe de la División de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE, México, D.F.

** Jefe del Laboratorio de Medicina Regenerativa y Terapia Celular del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE, México, D.F.

INTRODUCCIÓN

La recesión gingival se define como la migración del margen gingival apical a la unión cemento-esmalte,¹ por lo regular se localizan en las caras vestibulares de dientes sanos o periodontalmente comprometidos.²⁻⁵ En relación a su etiología, se han reportado tres causas de recesiones gingivales: 1) Asociadas a factores mecánicos como el cepillado traumático y vigoroso, 2) Asociadas a depósitos bacterianos y cálculo, así como también, 3) Formas generalizadas de enfermedad periodontal destructiva.^{2,6} Con el objetivo de lograr la cobertura radicular única o múltiple, se han reportado innumerables tipos de injertos para el tratamiento de las recesiones gingivales, tales como: el uso de injertos desplazados, injerto libre, injerto de tejido conectivo subepitelial, membranas para la regeneración tisular guiada y aloinjertos de tejido blando (matriz dérmica acelular).⁷⁻¹² En este sentido, cada uno de los métodos o alternativas de tratamiento tienen sus ventajas, desventajas, alcances y limitaciones;¹³ sin embargo, actualmente la medicina regenerativa es una de las áreas más prometedoras, no sólo para el tratamiento de estos padecimientos, sino también para aquéllos conocidos como crónico-degenerativos.

La medicina regenerativa ha ido ganando gran impacto conforme aumenta el conocimiento de los mecanismos naturales de la regeneración de los tejidos y así para su aplicación se diseñan e implementan métodos que permitan la regeneración de tejidos dañados que de otra manera, serían reparados por fibrosis (cicatrización).¹⁴

Existen tres estrategias básicas en la medicina regenerativa:

1. La inyección o trasplante de células para reemplazar el tejido dañado (terapia celular).
2. La construcción de un tejido bioartificial u órgano para reemplazar el original (ingeniería de tejidos).
3. La inducción farmacológica de la regeneración a partir de los tejidos propios del organismo.

La ingeniería tisular es una disciplina que ha sido desarrollada y utilizada como alternativa de tratamiento en diferentes campos de la medicina y odontología contemporánea.

Se han podido cultivar células con muestras mínimas de tejido, que pueden ser utilizadas en el paciente junto con biomateriales derivados de tejidos naturales (submucosa intestinal de cerdo) para la reparación o regeneración de un tejido dañado.^{14,15}

La producción de dispositivos originados de células autólogas y acarreadores naturales han incrementado

el pronóstico de cicatrización de heridas que difícilmente cerrarían de manera natural; uno de los acarreadores naturales más utilizados son las membranas de submucosa intestinal de cerdo, las cuales estimulan la producción de tejido de granulación y la reepitelización de heridas de la dermis, ofreciendo grandes ventajas para tratamientos como el manejo de úlceras en las venas.^{14,16,18}

La reparación y regeneración de tejidos a través de andamios naturales como la membrana de submucosa intestinal de cerdo han sido analizadas desde el punto de vista bioquímico, porque contienen dentro de sus propiedades factores de crecimiento (FGF, TGF- β y VEGF) que proporcionan un ambiente conductivo para la angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular.¹⁷⁻²⁰

Asimismo, la periodoncia ha evolucionado en los tratamientos regenerativos, desde el uso de membranas de regeneración tisular guiada, la aplicación de injertos y hasta el cultivo celular en matrices de ácido hialurónico.²¹

La propuesta de este estudio es el desarrollo de injertos autólogos basados en el cultivo de fibroblastos gingivales sembrados en una matriz biológica (submucosa intestinal de cerdo) para la cobertura de recesiones gingivales.

La utilización de estos injertos podría ser una opción de tratamiento para las deformidades mucogingivales, intentando buscar alternativas en la terapia regenerativa debido a las limitaciones que existen para el tratamiento de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un paciente del sexo masculino de 42 años sistémicamente sano, no fumador, con tres recesiones gingivales clase III de Miller⁵ en los dos premolares y primer molar superiores derecho, cuyo pronóstico para el tratamiento con terapia mucogingival convencional fue limitado (*Figura 1*).

Al paciente se le informó la metodología y finalidad del estudio y firmó un consentimiento informado con base en la Declaración de Helsinki de Estudios de Experimentación en Humanos de 1996.

Se realizaron mediciones de niveles de inserción (NI), unión cemento esmalte (UCE), profundidad al sondeo (PS) y tejido queratinizado (TQ) del sitio de la recesión (*Cuadro I*).

Para calcular el área expuesta de los sitios de las recesiones gingivales y sacar una proporción adecuada de los materiales que serían utilizados, se le tomaron al paciente modelos de estudio en yeso tipo III.

Se le extrajeron al paciente 20 mL de sangre, dejándola coagular a temperatura ambiente para la ob-

tención del suero sanguíneo, la cual se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min para separar el suero y recolectarlo (aprox. 10 mL). Este suero se utilizó para suplementar el medio de cultivo para la derivación celular y su mantenimiento, en condiciones autólogas.

El procedimiento consistió en 4 fases:

- 1) Excisión gingival.
- 2) Cultivo celular y siembra de fibroblastos en la matriz biológica.
- 3) Procedimiento quirúrgico.
- 4) Fase de seguimiento postquirúrgico.



Figura 1. Recesiones gingivales en dientes 14, 15 y 16.

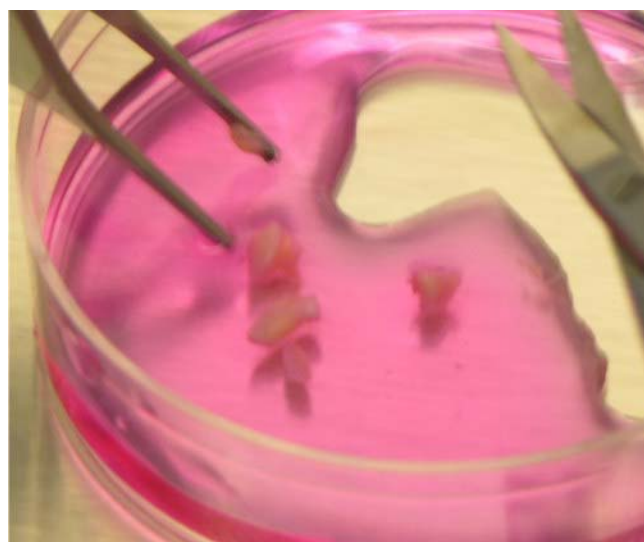


Figura 2. Fragmentación del tejido gingival.

1) Excisión gingival. Bajo anestesia local se tomó una biopsia excisional de 5.5 mm de diámetro a 3.3 mm de profundidad de la zona del paladar al nivel de los premolares derechos.

El tejido gingival obtenido en condiciones de asepsia se transportó en un tubo estéril de 50 mL con medio de cultivo (D-MEM) que contenía 10% de suero del paciente y una mezcla de antibióticos (penicilina 100 IU sobre mL y estreptomycin 100 microgramos sobre microlitro).

2) Cultivo celular y siembra de fibroblastos en la matriz biológica. El tejido gingival tomado en la biopsia se fragmentó en porciones de 1 mm³, aproximadamente, con tijeras para encía (Figura 2), dentro de una campana de flujo laminar tipo II A; derivándose dos cultivos celulares, uno para la preparación del injerto que se utilizó en la terapia y otra para su criopreservación a -80 °C y tener células del paciente como respaldo.

Durante tres días las células se trataron con una solución de 80 U/mL/colagenasa tipo 1 a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de aire.

Las células se mantuvieron en D-MEM que contenía 10% de suero del paciente y el medio de cultivo se cambió 2 veces a la semana. Los fibroblastos crecieron en botellas de cultivo de 75 cm² durante ocho días.

Cuando las células alcanzaron la confluencia (Figura 3) se subcultivaron por tripsinización y se sembraron a una dilución de 1:3 durante uno a tres pases subsecuentes. Los fibroblastos se desprendieron por tripsinización, se contaron en un hemocitómetro y se resuspendieron en un medio para criopreservación (5% de DMSO y 95% de SFB), a una densidad de un millón de células por mililitro en cada vial. Se congelaron tres viales en un ultracongelador a una temperatura de -80 °C.

A los 8 días después del sembrado de los fibroblastos cuando se alcanzó la confluencia y se obtuvo un conteo de más de 1 millón de células por centímetro cuadrado, se sembraron en cajas de Petri P-60 calidad para cultivo celular, sobre una matriz biológica, la cual es una membrana de submucosa intestinal de

Cuadro I. Medidas de los sitios a tratar.

Diente	PS (mm)	NI (mm)	TQ (mm)	Tipo de recesión
14	1	3	2	III
15	0.5	4	3	III
16	1	9	1	III

cerdo (OASIS®), a una densidad de 8.0 a 10×10^4 células/cm² en DMEM que contenía 10% de suero del paciente y se incubaron durante 24 horas en condiciones de cultivo (Figura 4).

Una vez transcurrido este tiempo, 15 días después de obtenida la biopsia, el bioimplante se preparó para ser transportado e injertado.

3) Procedimiento quirúrgico. El bioimplante de cultivo de fibroblastos sembrado en la membrana, ya preparado y listo para su transportación en cajas de Petri selladas estériles se injertó en el lapso de una hora.

Previo a la colocación del injerto se realizó una fase de desinfección del paciente en la que se controlaron los niveles de placa dentobacteriana, se modifi-

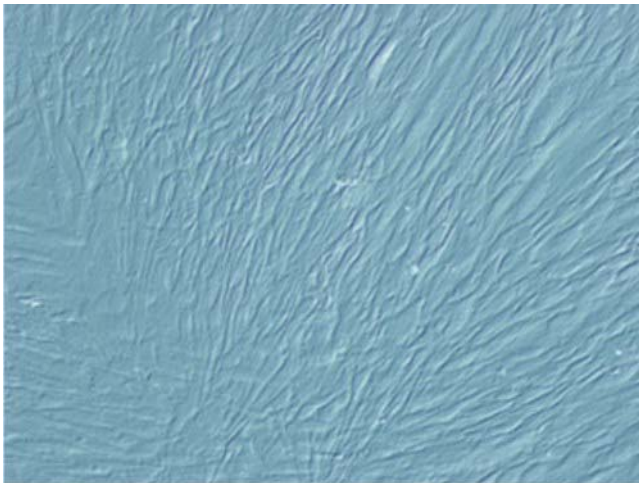


Figura 3. Células en confluencia.

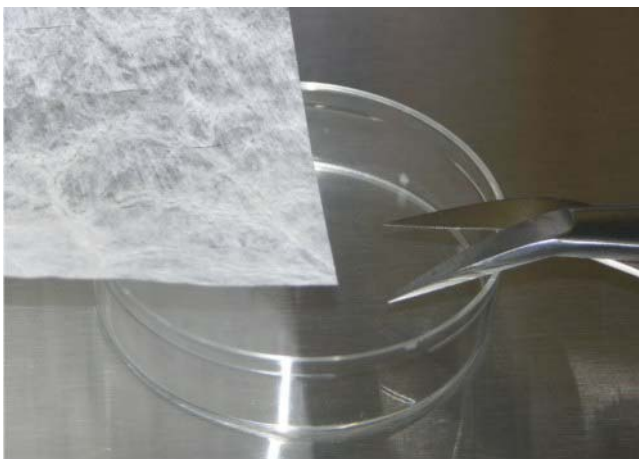


Figura 4. Membrana de submucosa intestinal de cerdo (OASIS®).

caron hábitos de higiene, eliminación de cálculo y pulido dental. Posteriormente, previa anestesia (lidocaína con epinefrina) se procedió a raspar y alisar las superficies radiculares de las raíces expuestas de los dientes: primer premolar, segundo premolar y primer molar superiores derechos, se preparó como lecho receptor para el injerto, con un colgajo mucoperióstico de espesor parcial con incisiones intrasurcales, horizontales (respetando las papilas interdentes, que posteriormente se desepitelizaron para exponer el tejido conectivo) y también incisiones liberatrices verticales.

El injerto se lavó con suero fisiológico antes de la aplicación y se recortó al tamaño de las recesiones, posteriormente se fijó con puntos simples utilizando sutura de ácido poliglicólico (vicryl).

Para desplazar el colgajo, y que al mismo tiempo cubriera el injerto se utilizaron suturas de ácido poliglicólico y de politetrafluoretileno expandido 5 ceros (Figura 5).

4) Fase postquirúrgica y de seguimiento. La cicatrización de la zona operada fue valorada a la semana, a los catorce días, al mes, al segundo y tercer mes de haberse colocado el injerto.

El paciente siguió los siguientes cuidados postoperatorios: enjuague de clorhexidina cada 12 horas por 15 días, la utilización de un cepillo ultrasuave, no fumar y analgésico.

RESULTADOS

El procedimiento quirúrgico se efectuó sin ningún contratiempo, el postoperatorio fue con inflamación ligera en los primeros 3 días. Los parámetros clínicos a medir, niveles de inserción (NI), unión cemento esmalte (UCE), profundidad al sondeo (PS), tejido queratinizado (TQ) se mantuvieron en control tres meses después de la cirugía y éstos se muestran en el cuadro II.

Los resultados a los primeros días de realizado el bioimplante fueron de una buena cicatrización (similar a una de dos semanas de evolución).

A las 72 horas de cicatrización, el injerto se encontraba estable y tenía la apariencia de llevar se-

Cuadro II. Resultados a la cicatrización tres meses después de la cirugía.

Diente	PS (mm)	NI (mm)	TQ (mm)	Tipo de recesión
14	1	3	1	III
15	0.5	4	2	III
16	1	5	2	III

manas en su integración, pero al quinto día el paciente reportó que con la higiene rutinaria uno de los puntos de sutura del diente 15 se había caído, así que al control de la primera semana se pudo constatar que la sutura no estaba y que además había presencia de depósitos de placa dentobacteriana y materia alba.

A la segunda semana se observó un incremento en la contracción del tejido en el sitio en que se perdió la sutura, así como depósitos de placa dentobacteriana.

A los veintiún días la contracción se estabilizó, dejando expuestas las resecciones gingivales de los dientes 14 y 15, no así en el 16 que mostró una ligera cobertura en la raíz mesiovestibular.

El seguimiento realizado del primer al segundo mes denotó una maduración en la epitelización y una estabilización del tejido en la cobertura radicular del tercio apical de las raíces mesio y distovestibulares en el diente 16.

Las recesiones gingivales de los dientes 14 y 15 no mostraron ganancia (*Figura 6*).

DISCUSIÓN

La ingeniería tisular representa en nuestros días una de las áreas con mayores expectativas en la medicina y la odontología. La posibilidad de generar nuevos tejidos y órganos no está en duda, pero hay que considerar diferentes factores, desde los técnicos hasta los éticos.

Una de las más comunes aplicaciones de estas novedosas técnicas es en la dermatología. En estos casos el cultivo celular autólogo con el uso de acarreadores, membranas o matrices, han incrementado el pronóstico favorable de lesiones con grandes exposiciones de tejido de granulación en heridas dermatológicas, para acelerar, favorecer y obtener una regeneración del tejido dañado, en lugar de derivar en un proceso normalmente esperado de cicatrización.

En periodoncia suele representarse esta situación clínica con las recesiones gingivales, pero a diferencia de las lesiones en piel en las que queda expuesta una lesión vascularizada, la superficie radicular es avascular. Por lo tanto, el uso de dispositivos regenerativos para alcanzar la cobertura radicular son limitados, como se han mostrado en diferentes estudios clínicos, en los que se ha llegado a utilizar el cultivo de fibroblastos sobre una membrana de ácido hialurónico para el aumento de tejido queratinizado preparando un sitio receptor sangrante que pueda nutrir el injerto.²¹

En este trabajo, se encontraron muchas limitaciones que redujeron las posibilidades de éxito en cuanto

a la cobertura radicular se refiere, como lo fue el tiempo reducido para el transporte del biomplante, el tipo de recesión, que fue determinante para que se realizara este estudio y que la sutura se desplazó al quinto día de haberse injertado el bioimplante, lo cual redujo el tiempo de estabilización del mismo afectando su integración.

A pesar de que en la primera semana hubo una óptima evolución del injerto, presentándose una buena cicatrización e integración a los tres días, esto se pudo ver perturbado por la presencia de contaminación del sitio quirúrgico con depósitos de materia alba, la cual pudo afectar directamente al proceso de cicatrización de la herida, poniendo de manifiesto la necesidad de una buena higiene bucal del paciente tanto química y mecánica.



Figura 5. Colocación del injerto en el sitio receptor.



Figura 6. Al segundo mes de cicatrización.

Cabe señalar que la contaminación por bacterias de un injerto y la remoción inesperada de la sutura que estabilizaba el mismo, se reconocen como factores que pueden afectar el proceso reparativo o regenerativo de una lesión tratada de una manera convencional,²² así que el resultado obtenido en la cobertura radicular con esta técnica de ingeniería tisular (injerto de fibroblastos autólogos crecidos sobre una membrana de submucosa intestinal de cerdo) se vio afectada de la misma manera, como también se observa en las técnicas empleadas regularmente.

Es necesario mencionar que también se justifica el que se deban realizar más estudios, tanto *in vitro* como clínicos, respecto a la preparación y colocación del injerto, ya que se conocía el número aproximado de células que llevaba, pero no se probaron distintas densidades celulares, para encontrar aquella que promoviera óptimamente la regeneración del tejido gingival.

Es importante determinar la viabilidad de las células injertadas, puesto que en la fisiología de una herida periodontal los fibroblastos juegan un papel importante en la producción de múltiples moléculas de señalización, degradación y formación de matriz extracelular, necesaria para la proliferación celular en un proceso reparativo, pero también se sabe que los fibroblastos después de haber participado en este proceso, del séptimo al décimo día llegan a diferenciarse en miofibroblastos, responsables de la contracción de la herida. En las etapas finales de fibroplasia, el número de fibroblastos y miofibroblastos disminuye y mueren por apoptosis.^{23,24}

CONCLUSIÓN

Es necesario poder probar diferentes densidades celulares de los bioimplantes injertados, ya que como se ha demostrado en otros modelos, la repoblación con nuevas células activas favorece los procesos de regeneración y/o cicatrización²⁵ siendo también de suma importancia asegurarse del fenotipo de estos fibroblastos para poder reconocer y determinar qué tipo de actividad celular se puede llevar a cabo en los sitios en los que se injerten las células, ya que la contracción del tejido obtenido en el sitio donde se injertó el bioimplante pudo haberse favorecido por el estadio en el que se encontraban los fibroblastos gingivales.

Clínicamente el bioimplante se integró al organismo satisfactoriamente aun cuando no hubo ganancia en la cobertura radicular.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Georgina Álvarez que apoyó este trabajo como investigadora participante, a la C.D. Alejandra Cabrera Coria que ayudó al reclutamiento del paciente y al Mtro. Juan Francisco Salcido García que contribuyó como consejero científico.

REFERENCIAS

1. *The American of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms*. 3rd ed. Chicago: The American Academy of Periodontology, 1992:41.
2. Sagnes G, Gjermo P. Prevalence of oral soft and hard tissue lesions related to mechanical tooth cleaning procedures. *Community Dent Oral Epidemiol* 1976; 4: 77-83.
3. Anerud KE, Robertson PB, Løe H. Periodontal disease in three young adult populations. *J Periodont Res* 1983; 18: 655-668.
4. Miller PD. A classification of marginal tissue recession. *Int J Periodontics Res Dent* 1985; 5: 8-13.
5. Miller PD. A classification of marginal tissue recession. *Int J Periodontics Res Dent* 1985; 5: 8-13.
6. Vehkalahti M. Occurrence of gingival recession in adults. *J Periodontol* 1989; 60: 599-603.
7. Oates T. Surgical Therapies for the Treatment of Gingival Recession. A Systematic Review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 303-320.
8. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 1985; 56: 715-720.
9. Sato N. Chap 6 Periodontal Plastic Surgery. In: Sato N. *Periodontal surgery: A clinical atlas*. Quintessence Publishing Co, Illinois USA, 2000: 343-355.
10. Tarnow DP. Semilunar coronally repositioned flap. *J of Clin Periodontol* 1986; 13: 182-185.
11. Kazunari A. Improvement of multiple facial gingival recession by non-surgical and supportive periodontal therapy: A case report. *J Periodontol* 1999; 70: 909-913.
12. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th ed. Copenhagen: Munksgaard, 2004: 569-591.
13. Friedman, N. Mucogingival surgery. *Texas Dental Journal* 1957; 75: 358-362.
14. Hode. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Int Health Science Cente* 2002: 295-308.
15. Myers, A hyaluronic acid membrane delivery system for cultured keratinocytes: Clinical take rates in the porcine keratodermal model. *J Burn Care Rehabil* 1997; 18: 214-222.
16. Demling R, Niezgod J, Haraway D, Mostow E. Small Intestinal submucosa Wound Matrix and Full-thickness Venous Ulcers: Preliminary Results. *Wounds* 2004; 16(1): 18-22.
17. Momose M, Masashi M. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- α and - β 1 are released from human cultured gingival epithelial sheets. *J Periodontol* 2002; 73: 748-753.
18. Brown-Etris M, Cutshall W. A new biomaterial derived from small intestine submucosa and developed into a wound matrix Device. *Wouns* 2002; 14(4): 150-166.
19. McPherson T, Badylak S. Characterization of fibronectin derived from porcine small intestinal submucosa. *Tissue Engineering* 1998; 4(1): 75-82.
19. Hode J, Badylak S. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: A bioscaffold for tissue replacement. *Tissue Engineering* 1996; 2(3): 209-217.

20. Lindberg K, Badylak S, Porcine small intestine submucosa (SIS): a bioscaffold supporting *in vitro* primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns* 2001; 254-266.
21. Piniprato. Tissue engineering tech for gingival augmentation procedures. A case report. *Int J Perio and Rest Dentistry* 2000; 20: 553-559.
22. Wikesjö U, Selvig K, Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000; 19, 1999, 21-39.
23. Martin P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75–81.
24. Aukhill I. Biology of wound healing. *Periodontology* 2000; 22: 44-50.
25. Cavallini M. Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients. *Wound Rep Reg* 2007; 15: 35-38.

Dirección para correspondencia:

Carlos Monteagudo Arrieta

Luz Saviñón Núm. 13-504

Col. Del Valle

Deleg. Benito Juárez

03100

México, D.F.

cmonteagudoa@yahoo.com