



# Sustitutos de mucosa oral creados mediante ingeniería tisular: una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral

Samir Alejandro Bello<sup>1</sup>, Julieta Peña<sup>2</sup>, Luz Eliyer Estrada<sup>3</sup>, Marta Raquel Fontanilla<sup>4</sup>

## Resumen

Varias lesiones que tienen como resultado pérdida de mucosa oral (malformaciones, enfermedad periodontal, trauma y tumores entre otras) pueden afectar la integridad de la cavidad oral humana. La vida de quienes las sufren, se altera clínica-psicosocial y económicamente debido a la estética y funcionamiento defectuosos, mayor riesgo de infecciones, dolor y molestia severa. Reemplazar la mucosa oral puede llegar a ser difícil, debido a la cantidad limitada de tejido disponible para el autoinjerto y a la morbilidad en el sitio donante. Cuando la mucosa oral es escasa, se emplean como injertos piel autóloga o mucosa gástrica. Infortunadamente, estas aproximaciones no siempre dan buenos resultados debido a la aparición de secreciones, crecimiento de anexos de la piel y patrones diferentes de queratinización. Por lo anterior, se hace necesario buscar nuevas fuentes de tejido oral. En otros países se adelantan investigaciones para desarrollar, con células vivas unidas a un sustituto de matriz, un tejido de mucosa oral funcional. De hecho, cultivos de epitelio gingival y láminas de mucosa artificiales han sido probados con algún éxito como injertos en ensayos preclínicos y clínicos. Este artículo presenta una revisión de los modelos de tejido mucoso oral desarrollados *in vitro* y las valoraciones de estos productos efectuadas hasta el momento. **Palabras claves:** Sustituto de mucosa oral, ingeniería tisular, queratinocitos, fibroblastos, análogo de matriz extracelular.

## Abstract

In the oral cavity, replacement of specialized mucosal tissue is required when tissue has been lost as a result of trauma, surgical resection, tumor extirpation and correction of malformations, periodontal diseases and pre-prosthetic surgery. Though these lesions do not threaten patient life fundamental medical, psychosocial and economic issues accompany them due to malfunction, increased risk of infections, pain and severe discomfort. Therefore, treatment of these defects with an oral mucosa like tissue should be of great benefit to patients. Unfortunately, replacing oral mucosa can be difficult because its limited supply. To overcome this constrain, either intestinal mucosa or skin transplants have been used to replace lost tissue. Since these attempts seldom give good results because the appearance of secretion, keratinization and hair growth, researchers are working in developing three-dimensional oral substitutes. Currently, research efforts in other countries are devoted to develop an artificial functional oral mucosa using living cells attached to a matrix substitute. Indeed, gingival epithelium cultures and cultured mucosa cell sheets have been assayed as graft material in clinical trials with some success. The present work reviews these attempts and the trials of these substitutes that have been carried out until now. **Key words:** oral mucosa substitutes, tissue engineering, fibroblasts, extra celular matrix.

## Introducción

Enfermedades de la cavidad oral de origen Neoplásico, inflamatorio, congénito y traumático resultan en defectos de mucosa oral.

Cuando las lesiones orales no son muy grandes el tratamiento ideal es el autoinjerto, tomado principalmente de mucosa bucal (yugal) y

1. Odontólogo U.N. Estudiante Maestría en Microbiología Universidad Nacional de Colombia

2. Odontóloga ECM. Investigadora Laboratorio Biología Molecular, Universidad El Bosque

3. Odontóloga U.N. Especialista en Cirugía Oral y Maxilofacial, Universidad El Bosque

4. Química Farmacéutica U.N., PhD Boston University School of Medicine. Directora Laboratorio de Biología Molecular, Universidad El Bosque

Paladar.<sup>1</sup> Las diferencias fenotípicas de la mucosa oral hacen que el tejido disponible para trasplante sea limitado.<sup>1-5</sup> Adicionalmente, la obtención del injerto aumenta la morbilidad del paciente, ya que en el proceso se originan heridas en los sitios donantes que cicatrizan por segunda intención.<sup>6</sup>

Cuando es necesario reconstruir lesiones extensas, el tejido mucoso se vuelve insuficiente creándose la necesidad de acudir a fuentes adicionales, como la piel. Sin embargo, el uso de piel no ha tenido buenos resultados debido a los problemas que implica el injertar un tejido diferenciado sobre otro con características distintas. Varias investigaciones han demostrado que la piel en la cavidad oral conserva estructurales originales, así como su textura y apariencia independientemente de los cambios que ocurren en el medio circundante aún años después de ser injertada.<sup>1,6,7</sup> Adicionalmente, existen reportes que señalan que estos injertos tienen menor resistencia a las fuerzas generadas por el uso de prótesis y mayor susceptibilidad a las infecciones micóticas que la mucosa oral masticatoria.<sup>8,9</sup> Lo descrito hasta ahora indica que las dos modalidades terapéuticas disponibles, implante de mucosa o de piel, presentan limitaciones e inconvenientes que justifican la exploración de nuevas alternativas de tratamiento.

Un nuevo campo, el de la ingeniería tisular, aplica los principios de la biología y la ingeniería para desarrollar substitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos.<sup>10</sup> Las técnicas de la ingeniería tisular incluyen el uso de matrices biológicas o aloplásticas reabsorbibles, solas o sembradas con células vivas, para fabricar estructuras tridimensionales que sirvan como material de injerto.<sup>7</sup>

Actualmente, una amplia variedad de células autólogas obtenidas mediante procedimientos quirúrgicos pueden ser cultivadas y expandidas en varios órdenes de magnitud *in vitro*. De hecho, el cultivo de células epiteliales y dérmicas para elaborar coberturas de heridas ha sido estudiado desde hace muchos años, lográndose obtener cultivos tridimensionales que imitan órganos como piel o mucosa oral.<sup>11-21</sup> Hasta el

momento, para producir mucosa oral artificial se han empleado varios procedimientos, desarrollados gracias a la habilidad de cultivar *in vitro* las células (queratinocitos y fibroblastos) que la constituyen.

El presente trabajo contiene un resumen de los resultados obtenidos, por diversos investigadores, en el área de la Ingeniería Tisular de mucosa oral. Si se logra que después de su lectura, mentes inquietas entiendan que es posible un mañana en el que a partir de la vida se construya la vida, habremos dado un paso en el largo camino que busca elaborar substitutos artificiales de mucosa.

## Desarrollo de substitutos de mucosa oral

### Substitutos basados en monocapas

En el proceso de elaboración de substitutos de mucosa oral diversas aproximaciones han sido tomadas, las cuales en gran medida dependen del estado de conocimiento de los procesos de reparación y de la tecnología de cultivo celular disponible. Al describir Rheinwald y Green<sup>15</sup> un método de cultivo de queratinocitos, se abrió la posibilidad de generar láminas de estas células para ser usadas como cobertura de heridas. Así, los primeros intentos de reemplazar tejido oral perdido con tejido artificial, se basaron en el uso de láminas de queratinocitos como injertos. Los métodos de elaboración de esta clase de substitutos se describen a continuación.

#### Láminas de epitelio oral cultivado.

En general, se utilizan dos métodos para la obtención de monocapas de queratinocitos de mucosa oral: el tejido disgregado con enzimas (dispasa, tripsina y/o colagenasa) y el tejido epitelial cortado en pedazos pequeños o explantes. Las fuentes de material para uno u otro procedimiento han sido tejido gingival, paladar duro y otras regiones de la mucosa oral.<sup>11,12,19,20,22-28,33-35,37-44</sup>

En la obtención de láminas de queratinocitos a partir de células disgregadas, la técnica más efectiva y conocida es la de Rheinwald y Green<sup>15</sup>.

En esta, los queratinocitos se cultivan sobre una capa alimentadora de fibroblastos murinos 3T3, irradiados subletalmente para evitar su proliferación. Sin embargo, versiones modificadas del método en donde las células son tratadas con mitomicina C o los fibroblastos 3T3 son reemplazados por fibroblastos humanos también se han reportado<sup>26</sup>. Aunque algunas de las láminas epiteliales obtenidas, no exhiben signos de diferenciación terminal algunos autores reportan queratinización. Las láminas epiteliales una vez formadas, son desprendidas de la superficie del plato de cultivo y llevadas al lecho de la herida, donde son suturadas e inmovilizadas mediante una placa acrílica protectora. El traslado de la lámina de queratinocitos al lecho de la herida, necesita de un acarreador debido a su fragilidad.<sup>17</sup>

Las aplicaciones clínicas de estas láminas han sido varias: cicatrización de heridas de paladar asociadas a palatoplastia convencional<sup>31</sup>, vestibuloplastia<sup>33,44</sup>, cobertura de defectos mucogingivales<sup>35</sup>, reconstrucción de cavidad oral postresección de tumores<sup>39</sup> y gingivoplastia asociada a terapia de implantes.<sup>45</sup> Entre los inconvenientes de este tipo de injertos se encuentran su pobre resistencia al estrés mecánico, debido a la ausencia de tejido conectivo, y su fragilidad. Investigaciones recientes resaltan el papel del tejido conectivo subyacente y del flujo de sangre en la restauración de la función mecánica, la adhesión y nutrición de la epidermis.<sup>17</sup> Por lo anterior, los esfuerzos corrientes se centran en desarrollar un análogo de mucosa oral constituido por un sustrato dérmico recubierto con láminas de epitelio que sirva como injerto.

#### AlloDerm™

El AlloDerm™ es la marca registrada de una matriz dermal acelular, obtenida a partir de piel humana cadavérica. La estructura tiene polaridad ya que en su superficie está presente la lámina basal, para permitir la adhesión y el crecimiento de los queratinocitos, y subyacente se encuentra la matriz porosa que permite la infiltración de fibroblastos y células endoteliales del huésped. Su espesor la hace menos frágil que las láminas de queratinocitos lo cual facilita su manipulación, aplicación y estabilización dentro de la cavidad oral.<sup>17</sup>

El AlloDerm™ (sin componente epidermal) ha sido evaluado como alternativa a los injertos de piel de espesor parcial y para reducir la cicatrización y contracción de lesiones de mucosa oral. La matriz dérmica acelular es puesta sobre los defectos de forma similar a como se injerta mucosa natural, es suturada y según su localización es protegida con placas de acrílico para evitar su desplazamiento. Según evaluación clínica e histológica, este sustituto monocapa es exitoso, permite infiltración celular y neovascularización al igual que la epitelialización a partir de los bordes de la herida, sin evidencia de respuesta inmune o rechazo al aloinjerto.<sup>6</sup> Las dos desventajas del AlloDerm son su dependencia de la epitelialización periférica y, ante la ausencia de epitelio, la carencia del efecto angiogénico de los queratinocitos.<sup>17</sup>

## Sustitutos Bicapa

Como su nombre lo indica, estos modelos están constituidos por dos capas: un equivalente de tejido conectivo o análogo de matriz extracelular (ECMA) empleado como sustrato y otra que semeja al epitelio. Esta última, conformada por queratinocitos cultivados sobre la ECMA o por materiales sintéticos como la silicona. En general se cree que los análogos bicapa cumplen el papel de vehículos de liberación de células o factores de crecimiento. Los materiales más comúnmente usados para elaborar las ECMA son: colágeno tipo I, combinación de colágeno tipo I y III, mezcla de constituyentes de lámina basal (Matrigel) que incluye laminina, colágeno tipo IV y fibronectina, AlloDerm, mezcla colágeno/glicosaminoglicanos, nylon, copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico.<sup>7,11-12,14,17,29,46,50</sup>

Yannas *et al.*, en 1980, desarrollaron la primera membrana bicapa compuesta por dos capas: una esponja de colágeno interna asociada a condroitín-6-sulfato (glicosaminoglicano, GAG) y una capa externa de silicona grado médico, de cerca de 100 mm de espesor. Cuando la membrana es injertada sobre las heridas los fibroblastos y capilares infiltran la matriz, la cual gradualmente es biodegradada y remodelada para proporcionar una dermis o tejido conectivo artificial sobre la que, por debajo de la silicona, migra el epitelio periférico. Después de la

epitelialización, la capa externa es removida.<sup>47</sup> El sustituto desarrollado por Yannas fue evaluado como cobertura de heridas dermales y de mucosa bucal en conejos. La matriz de colágeno-GAG acelular se empleó como sustituto de mucosa, mientras que cultivada con fibroblastos se usó como reemplazo dermal. En mucosa no hubo inhibición significativa de la contracción por la presencia del sustituto, comparado con los controles, y el examen histológico reveló un intenso infiltrado inflamatorio de la matriz injertada. El epitelio mucoso no migró superficial a la matriz sino debajo de ella, lo cual produjo su externalización debido a la intensidad de la respuesta inflamatoria generada ante la presencia de colágeno bovino nativo, el glicosaminoglicano, la rápida contracción y la mayor flexibilidad intrínseca de la mucosa bucal.<sup>36</sup>

Más adelante, Omura y colaboradores trataron de obviar estos problemas modificando este sustituto. Para esto elaboraron una esponja de colágeno, desnaturalizado y entrecruzado hidrotermalmente, sin el glicosaminoglicano. Estas modificaciones resultaron importantes, ya que el colágeno desnaturalizado minimizó la antigenicidad y el entrecruzamiento térmico disminuyó la citotoxicidad al evitar el uso de glutaraldehído para el entrecruzamiento. La membrana modificada fue puesta sobre defectos de mucosa oral luego de resección de tumores. Después de 10-14 días de realizado el injerto, la capa externa de silicona fue removida dejando sólo la capa interna de colágeno infiltrada por fibroblastos y capilares. La matriz se constituyó en neodermis que epitelializó rápidamente por migración de epitelio periférico 4 a 5 semanas después de la aplicación, observándose la cicatrización exitosa en todos los casos evaluados. Este sustituto tiene inconvenientes porque al no poseer un verdadero componente epitelial, depende de la epitelialización periférica y esta deprivado del efecto angiogénico de los queratinocitos. Además, es necesario un nuevo procedimiento quirúrgico para la remoción del pseudoepitelio o silicona.<sup>30</sup>

## Co-cultivos organotípicos.

Los epitelios de recubrimiento son tejidos superficiales con capas expuestas al medio externo o interno, que se nutren por difusión de factores desde la capa basal. Esta situación del órgano intacto *in vivo* es alterada dramáticamente en los sistemas de cultivo convencionales o sumergidos. En estos, las células epiteliales crecen inmersas en el medio de cultivo nutridas desde arriba, sin la presencia de matriz extracelular específica y privadas de su soporte mesenquimático.<sup>29</sup> Con el fin de mejorar estas condiciones de cultivo y crear un modelo que imite la situación fisiológica, se han desarrollado los co-cultivos organotípicos. En estos, los análogos de dermis son sembrados con fibroblastos y una vez se ha desarrollado pseudodermis, se siembran sobre ella queratinocitos cultivados que se dejan crecer por un tiempo determinado en cultivo sumergido. Luego, la matriz se expone a la interfase aire líquido en cámaras de cultivo organotípicas.

Análisis de estos co-cultivos indican que el procedimiento mejora la arquitectura tisular y la expresión de productos de diferenciación, incluyendo componentes de la lámina basal. Se cree que entre más diferenciado el epitelio del equivalente mucoso, más estabilidad y funcionalidad presenta al ser injertado.<sup>17</sup>

Odioso *et al* en 1995<sup>12</sup> desarrollaron un modelo de co-cultivo de queratinocitos y fibroblastos gingivales. Emplearon como soporte tridimensional para el cultivo de fibroblastos una malla de nylon en lugar de colágeno, ya que según los autores este altera la actividad metabólica de las células. Las células epiteliales fueron sembradas sobre la capa estromal confluyente, proliferaron y se diferenciaron hasta formar un epitelio escamoso estratificado. El análisis histológico reveló arquitectura celular exhibiendo interacción estroma-epitelio, la cual soporta el crecimiento y la diferenciación de la capa epitelial. Los análisis inmunohistoquímicos confirmaron la producción de colágenos tipo I y III. Los análisis de inmunofluorescencia de la capa estromal identificaron colágeno tipo IV y fibronectina, la cual también fue detectada en el epitelio superficial. Se observó diferenciación de las capas basal, espinosa y granular epiteliales y se detectó la expresión de los marcadores de

diferenciación: citoqueratinas ácidas (K10, 14-16, 19) y básicas (K1-8). Mediante microscopía electrónica se observó el desarrollo de una zona de lámina basal discontinua, con hemidesmosomas. De acuerdo con la prueba de azul de tiazol (MTT) para función mitocondrial y la incorporación de timidina tritiada, el co-cultivo era metabólicamente activo. El modelo de co-cultivo gingival humano fue viable por más de 35 días post-siembra epitelial. Aunque este análogo desarrolló un componente epidermal bien diferenciado, al no ser biodegradable el soporte su uso como sustituto de mucosa oral es limitado.

Tomakidi *et al* en 1997<sup>11</sup>, desarrollaron un modelo de co-cultivo organotípico de queratinocitos, sobre un gel de colágeno sembrado con fibroblastos aislados del surco gingival. El análisis histomorfológico reveló su estrecha similitud con epitelio gingival no queratinizado nativo. Los queratinocitos formaron un epitelio estratificado con células basales y células aplanadas en las capas más superficiales, y fueron visibles protrusiones celulares dentro de los geles de colágeno. Los análisis de inmunofluorescencia e hibridización *in situ*, mostraron la expresión de los marcadores de proliferación K5 y K14 a nivel del estrato basal y algunas células parabasales. Los marcadores de diferenciación K4 y K13 fueron inmunolocalizados, principalmente en el compartimento suprabasal, notándose en los queratinocitos un patrón de citoqueratinas similar al del tejido nativo. La expresión de los principales constituyentes de la lámina basal, colágeno tipo IV y laminina, incrementaron con el tiempo revelando una inmunotinción al comienzo interrumpida y luego continua bajo la capa de células basales. El mantenimiento de la función de las células basales fue demostrado por incorporación de BrdU.<sup>5</sup> Este modelo de co-cultivo presentó un componente epidermal bien diferenciado, hasta el momento es el sustituto que más se acerca al reemplazo de mucosa oral ideal.

## Co-cultivo de queratinocitos sobre AlloDerm

En 1999 fue desarrollado un equivalente de mucosa oral humana tipo bicapa, sembrando

queratinocitos cultivados sobre dermis humana cadavérica acelular no inmunogénica (AlloDerm). El co-cultivo presentó actividad metabólica y retuvo la membrana basal intacta en un medio químicamente definido. A los 18 días se hizo evidente la presencia de epitelio estratificado (siete a diez capas de espesor) con láminas basal, espinosa y queratinizada externa.<sup>17</sup> Recientemente, otras características de este equivalente de mucosa y su actividad proliferativa fueron evaluadas.<sup>49</sup> Los resultados obtenidos sugieren que este reemplazo podría, eventualmente ser empleado como injerto.

## Aplicaciones Clínicas

### Ensayos preclínicos

Varios estudios preclínicos de los sustitutos de mucosa oral se han realizado en modelos porcinos, caninos, conejos y en cerdos de guinea. Como se mencionó en un principio, los resultados han sido variados y el grado de éxito o fracaso de cada una de las estructuras evaluadas no ha permitido proponer al sustituto de mucosa oral ideal.

Sugimura y colaboradores en 1997, investigaron los cambios morfológicos producidos después de transplantar una lámina cultivada de epitelio oral humano, sobre la cara interna de un colgajo rectangular dorsal de piel en ratones atímicos. A la semana, la lámina epitelial estaba adherida al conectivo subyacente y mostraba el número original de capas; sin embargo, gradualmente su espesor se incremento gradualmente. De esta forma, fue posible observar epitelio queratinizado después de tres semanas de realizado el injerto.<sup>34</sup>

Una matriz de colágeno bovino tipo I (ED), fue utilizado como sustrato sobre el cual se sembraron queratinocitos autólogos para formar un equivalente de mucosa oral (EMO). Los investigadores injertaron EMO, ED y láminas epiteliales sobre rebordes alveolares mandibulares en los cuales se había eliminado el tejido epitelial y conectivo sin remover el periostio. EL EMO y el ED fueron manipulados fácilmente lográndose su adaptación al sitio de injerto, lo cual no sucedió con las láminas epiteliales. Siete días después del transplante, el examen clínico

mostró que el sitio quirúrgico había cicatrizado totalmente en el área injertada con EMO, mientras que las áreas injertadas con ED y la lámina epitelial mostraban continuidad en los defectos. Estudios histológicos permitieron observar que la porción porosa de la esponja de colágeno del EMO y ED, se integró en el tejido conectivo subyacente. No hubo evidencia de reacción a cuerpo extraño y sólo se presentó una leve respuesta inflamatoria en el conectivo subyacente.<sup>18</sup>

## Ensayos clínicos

Ensayos clínicos de sustitutos de mucosa oral en humanos incluyen reconstrucción de estructuras orales secundaria a resección de tumores,<sup>6,30,39</sup> aloinjerto de epitelio cultivado sobre defectos mucoperiosticos posterior a palatoplastia,<sup>31</sup> vestibuloplastia,<sup>33,44</sup> gingivoplastia asociada a terapia de implantes<sup>32,33,45</sup> e injerto de epitelio palatino cultivado en pacientes con déficit severo de encía adherida.<sup>35</sup> Además, se ha ensayado el epitelio oral cultivado, en la reparación de defectos de piel en donde parece tener buenos resultados en cuanto a tiempo y calidad de reepitelización.<sup>32,40</sup>

**Reconstrucción de estructuras orales secundaria a resección de tumores.** Langdon *et al.* en 1990, reportaron el transplante de una lámina epitelial a sitios retirados por maxilectomía radical, secundaria a un carcinoma escamocelular del seno maxilar. Cuando la cavidad fue inspeccionada al séptimo día posttransplante, la epitelialización estaba completa. De hecho, en el día 17 del postoperatorio fue posible tomar impresiones para fabricar un obturador. En general, se observó la asimilación del injerto y la formación de una mucosa oral saludable igual a la mucosa circundante.<sup>39</sup>

Substitutos bicapa constituidos por una lámina externa de silicona y una esponja de colágeno desnaturalizado y fibrilar entrecruzado térmicamente, también han sido ensayados. Omura *et al.* en 1997, injertaron esta clase de reemplazos sobre defectos mucosos de cinco pacientes (tres mujeres y dos hombres con edades entre los 58-70 años) generados después

de la eliminación quirúrgica de tumores en paladar duro, lengua y encía. Las membranas artificiales fueron cortadas del tamaño aproximado del defecto mucoso, puestas directamente sobre la herida y suturadas. En los defectos gingivales la membrana fue cubierta con una placa acrílica protectora durante 5-7 días después de la operación. A los 10-14 días la membrana externa de silicona fue removida, observándose tejido de granulación sobre toda la superficie injertada y reepitelialización en algunas zonas. La epitelialización se completó 4 a 5 semanas después de la operación, sin que se presentara infección local ni reacción de rechazo. La contracción postoperatoria fue mínima.<sup>30</sup>

Por su parte Rhee *et al.* en 1998, evaluaron el uso del AlloDerm en la reducción de la cicatrización y contracción de lesiones de mucosa oral de espesor total. Dermis acelular fue puesta sobre 29 defectos de mucosa oral de espesor total, luego de resección de tumores primarios intra orales. La localización de las lesiones primarias incluía: lengua, piso de boca, maxilar, mandíbula, paladar duro y/o blando, labio y amígdalas. Después de dos semanas se realizaron exámenes histológicos de biopsias de los injertos. Los resultados mostraron una tasa de captación del 90% (26 de los 29 pacientes). Además, se observó epitelialización exitosa en todos los injertos captados a las cuatro semanas. Solo el 12% (tres de los 29) de los pacientes presentó dolor o molestias asociadas al injerto. Contracción de la herida solo fue vista en un paciente. Los resultados histológicos demostraron epitelialización desde los tejidos circundantes, al igual que infiltración celular de la dermis aloinjertada.<sup>6</sup>

**Déficit severo de encía adherida.** De Luca y colaboradores en 1990, cultivaron epitelio palatino de pacientes que presentaban defectos muco-gingivales y luego lo injertaron en estos sitios. A los siete días, la zona preparada estaba cubierta por epitelio cultivado. A los tres meses, presentaba una cicatrización normal sin signos evidentes de inflamación. Histológicamente, a las tres semanas estaba presente un epitelio bien diferenciado, sin que fueran evidentes el estrato córneo y las clavas epiteliales, y un conectivo subyacente sin signos de inflamación. A los cuatro meses, se observó un epitelio más grueso con estrato córneo.<sup>35</sup>

**Vestibuloplastia.** Defectos supraparióísticos, generados en el procedimiento de profundización del vestíbulo de siete pacientes mayores de 40 años, fueron cubiertos con láminas cultivadas de queratinocitos gingivales autólogos. A los siete días, la zona había epitelializado completamente pero presentaba aspecto frágil y no queratinizado. A los 20 días postoperatorios la zona había cicatrizado normalmente, estaba lisa, exhibía epitelio queratinizado y no presentaba diferencias topográficas entre el área injertada y la encía vecina.<sup>33</sup> En otro estudio con ocho pacientes, los autores cultivaron mucosa palatina autóloga y con las láminas obtenidas después de tres semanas de cultivo, cubrieron defectos generados por vestibuloplastia. En la mitad de la herida injertaron la lámina de epitelio cultivada y como control, emplearon injertos de mucosa palatina no cultivada sobre la otra mitad. A los tres meses evaluaron clínica e histológicamente los injertos. La mucosa injertada en los dos sitios semejaba a la mucosa palatina original, estaba vascularizada, no presentaba reacción de rechazo y mostraba una unión mucosa labial-injerto lisa y contracción de herida mínima. Mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión, fue determinado que los dos tipos de injertos formaron una mucosa queratinizada totalmente diferenciada, con una membrana basal bien desarrollada y papilas muy similares a las del tejido palatino original.<sup>44</sup>

**Gingivoplastia asociada a terapia de implante.** El epitelio mucoso autólogo cultivado se empleó como injerto, en pacientes necesitados de una reconstrucción post-resección de tumores y de terapia de implantes, seis meses después de que la piel falló en la reconstrucción de la oclusión. A los cuatro meses de la intervención, se observó una mucosa vascularizada nueva. Los hallazgos histológicos revelaron un epitelio escamoso estratificado sin queratinización y algunas células inflamatorias en los espacios intercelulares, con un conectivo adyacente con capilares ectópicos e infiltrado inflamatorio.<sup>32</sup>

Ueda *et al* en 1998, realizaron un estudio con 12 pacientes con edades entre los 40 a 70 años, sometidos a terapia de implantes. La mucosa fue obtenida durante una primera cirugía, cultivada y posteriormente injertada en una segunda cirugía.

Una semana después del injerto, en la mayoría de los casos la lámina epitelial estaba adaptada al sitio, la zona había epitelializado y aparecía más delgada. Desafortunadamente, en algunos casos se observó necrosis parcial del injerto, eritema, exudado y sangrado. Sin embargo, a las tres semanas ninguna diferencia se notó entre el área de la herida cubierta por el injerto epitelial y la mucosa oral normal circundante. No hubo evidencias de infección ni contracción de las heridas y a los tres meses, las áreas injertadas estaban cubiertas con mucosa sana, queratinizada y lisa. Las prótesis soportadas por los injertos funcionaron normalmente en los pacientes estudiados. En todos los casos, los rebordes alveolares estuvieron correctamente cubiertos por encía adherida y vestíbulos profundos y no hubo inflamación alrededor de los tornillos de cicatrización.<sup>45</sup>

**Cicatrización de heridas asociadas a palatoplastia.** En 1999 Sumi *et al*. (31), aplicaron aloinjertos de epitelio cultivado en siete pacientes con hendiduras de paladar duro y blando y en dos con hendidura de paladar blando, cuyo promedio de edad era de 1 año y cuatro meses. Luego de tres semanas de cultivar queratinocitos provenientes de adultos sanos, las láminas de epitelio fueron injertadas sobre las superficies cruentas generadas en el proceso de palatoplastia convencional. En todos los pacientes, las áreas injertadas reepitelizaron después de una semana y no mostraron signos de rechazo al injerto. Las áreas injertadas cicatrizaron después de 2 a 3 semanas en todos los casos, siendo esta la primera evidencia del uso de tejido oral cultivado en el tratamiento de labio paladar hendido.

## Conclusiones

La reconstrucción y reparación de tejidos oro faciales funcionales por técnicas de ingeniería tisular, se está constituyendo en uno de los puntales de la investigación odontológica de vanguardia. Mucho esfuerzo ha sido puesto en el desarrollo, caracterización y examen paraclínico y clínico de los substitutos de mucosa oral. A pesar de esto, la mejor alternativa artificial para la reconstrucción de defectos de mucosa oral

continúa siendo controversial y no hay disponible para tratamiento un análogo funcional de mucosa oral. Los modelos desarrollados hasta ahora, tienen limitaciones dadas por la ausencia de componentes vasculares y nerviosos. Las investigaciones adelantadas han mostrado resultados variados y algunas veces contradictorios, que demandan seguir trabajando en nuevos modelos que superen las limitaciones de los existentes. Ensayos clínicos a mediano y largo plazo que comparen estos equivalentes deben llevarse a cabo, antes de determinar en forma definitiva su utilidad como substitutos biológicos. A pesar de lo anterior, el tejido artificial constituye una alternativa terapéutica que debe explorarse, debido a los grandes beneficios que puede traer para los pacientes que requieren injertos de mucosa oral.

## Referencias

1. Hillerup S. Grafting of skin and oral mucosa in the oral and maxillofacial regions. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North. Am.* 1993; 5(4): 557-577.
2. Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. Periodonto normal. En: Periodoncia. México D.F., Editorial Interamericana, 1993 : 3-31.
3. Strassburg M, Knolle G. Oral Mucosa. In: Diseases of the oral mucosa. 2ª. ed. Quintessence Books, 1994 : 20-27.
4. Ten Cate AR. Mucosa bucal. En: Histología Oral. 2ª ed. Argentina, Editorial Panamericana, 1986 : 400-448.
5. Carranza FA. Periodontología Clínica de Glickman. 6ª ed. México D.F. Editorial Interamericana. 1996 : 3-26.
6. Rhee PH, Friedman CD, Ridge JA, Kusiak J. The use of processed allograft dermal matrix for intraoral resurfacing. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1998; 124: 1201-1204.
7. Buckley MJ, Agarwal S, Gassner R. Tissue engineering and dentistry. *Clin. Plast. Surg.* 1999; 26(4): 657-662.
8. Katou F, Motegi K, Tagami H, Shirai N, Echigo S, Nagura H. Características inflamatorias únicas observadas en colgajos de piel transferidos intraoralmente. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* Edición en español. 1999; 1(2): 151-159.
9. Hillerup S. Preprosthetic mandibular vestibuloplasty with split-skin graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1987; 16: 270-278.
10. Kaihara S, Vacanti JP. Tissue engineering. Toward new solutions for transplantation and reconstructive surgery. *Arch. Surg.* 1999; 134: 1184-1188.
11. Tomakidi P, Fusening NE, Kohl A, Komposch G. Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells. *J. Periodont. Res.* 1997; 32: 388-400.
12. Odioso LL, Doyle MJ, Quinn KW, Zimmer MP, Stevens-Burns D. Development and characterization of an in vitro gingival epithelial model. *J. Periodont. Res.* 1995; 30:210-219.
13. Ueda M, Shima T, Ebata K, Kaneda T. Effects of collagen concentration on epithelial differentiation: *In vitro* analysis with a mucosal tissue model. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 1993; 13: 127-133.
14. Contard P, Bartel R, Jacobs L et al. Culturing keratinocytes and fibroblast in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 100: 35-39.
15. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975; 6: 331-344.
16. Feinberg SE, Krishnan V, Gordillo G, Shuler Ch. Intraoral grafting of canine full-thickness oral mucosal equivalent produced *in vitro*. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1989; 47: 712-718.

17. Izumi K., Takacs G, Terashi H, Feinberg SE. Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. J. Oral Maxillofac. Surg. 1999, 57: 571-577.
18. Maruguchi T, Maruguchi Y, Suzuki Sh, Matsuda K, Toda K, Isshiki N. A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts. Plas. Reconstr. Surg. 1994, 93: 537-544.
19. Hou LT, Kollar EJ, Yaeger JA.. Epithelial cell-fibroblast interactions: modulation of extracellular matrix proteins in cultured oral cells. J. Periodont. Res. 1993, 28:102-114.
20. Southgate J, Williams H, Trejdosiewicz K, Hodges G. Primary culture of human oral cells. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. Lab. Invest. 1987, 56(2): 211-223.
21. Bell E, Ivarsson B, Merrill Ch. Production of a tissue-like structure by human fibroblast of different proliferative potential *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76(3): 1274-1278.
22. Arenholt-Bindslev D, Jepsen A, MacCallum DK, Lillie JH. The Growth and Structure of human oral Keratinocytes in culture. J. Invest. Dermatol. 1987, 88:314-319.
23. Reid C.B.A, Cloos J, Snow GB, Braakhuis BJM. A simple and reliable technique for culturing of human oral keratinocytes and fibroblasts. Acta Otolaryngol. Stockh. 1997, 117: 628-633.
24. Formanek M, Millesi W, Scheiner O, Kornfehl J. Optimized growth medium for primary culture of human oral keratinocytes. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 1997, 25:157-160.
25. Oda D, Watson E. Human oral epithelial cell culture I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. In vitro Cell. Dev. Biol. 1990, 26:589-595.
26. Taichman L, Sciubba J, Cho MI. Maturation of human gingival keratinocytes cultured with fibroblasts from keratinizing and non-keratinizing epithelia. Archs. Oral Biol. 1982, 27: 355-359.
27. Schuster GS, Singh BB, Welter DA, Erbland JF. A simplified method for culture of oral epithelial cells. J. Oral Pathol. 1985, 14: 332-341.
28. Lauer G, Otten JE, VonSpecht B, Schilli W. Cultured gingival epithelium. A possible suitable material for pre-prosthetic surgery. J. Cranio Maxillofac. Surg. 1991, 19: 21-26.
29. Freshney R.I. Epidermis. In: Culture of epithelial cells. Wiley-Liss Inc. 1992 : 1-23.
30. Omura S, Mizuki N, Horimoto S, Kawabe K, Fujita K. A newly developed collagen/silicone bilayer membrane as a mucosal substitute: a preliminary report. B. J. Oral Maxillofac. Surg. 1997, 35: 85-91.
31. Sumi Y, Hata KI, Sawaki Y, Mizuno H, Ueda M. Clinical application of cultured oral epithelium for palatal wounds after palatoplasty: a preliminar report. Oral Dis. 1999 : 5(4): 307-312.
32. Tsai CH, Ueda M, Hata KI, et al. Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the Oral and Maxillofacial region. J. Cranio Maxillofac. Surg. 1997, 25: 4-8.
33. Lauer G. Auto grafting of feeder-cell free cultured gingival epithelium method and clinical application. J. Cranio Maxillofac. Surg. 1994, 22:18-22.
34. Sugimura Y, Hata K, Torii S, Ueda M. Transplantation of cultured mucosal epithelium: an experimental study. J. Cranio Maxillofac. Surg. 1997, 24: 352-359.
35. De Luca M, Albanese E, Megna M. et al Evidence that human oral epithelium reconstituted *in vitro* and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. Transplantation. 1990, 50: 454-459.
36. Bertolami CN, Ellis DG, Donoff RB. Healing of cutaneous and mucosal wounds grafted with collagen- glycosaminoglycan/ silastic bilayer membranes: A preliminary report. J. Oral Maxillofac. Surg. 1988, 46: 971-978.

37. Gosselin F, Magloire H, Joffre A, Portier MM. Cytokeratins as molecular markers in the evaluation of the precise differentiation stage of human gingival epithelium reconstituted *in vitro*. *Archs. Oral Biol.* 1990, 35 (Supl.): 217S-221S.
38. Oda D, Watson E. Human oral epithelial cell culture I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1990, 26: 589-595.
39. Langdom JD, Leigh IM, Navsaria AH, Williams DM. Autologous oral keratinocyte grafts in the mouth. *The Lancet.* 1990, 35: 1472.
40. Ueda M, Hata KI, Horie K, Torii S. The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: A preliminary report. *Ann. Plast. Surg.* 1995, 35: 498-504.
41. Shabana AHM, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Cytokeratin patterns of human oral mucosae in histiotypic culture. *Archs. Oral Biol.* 1991, 36(10): 747-758.
42. Garlick JA, Parks WC, Welgus HG, Taichman LB. Re-epithelialization of human oral keratinocytes *in vitro*. *J. Dent. Res.* 1996, 75(3): 912-918.
43. Jepsen A, MacCallum DK, Lillie A. Fine structure of subcultivated stratified squamous epithelium. *Exp. Cell Res.* 1980, 125(1): 141-152.
44. Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blaauw EH, Wutjes MJ, Vissink A.. Use of cultured mucosal grafts to cover defects caused by vestibuloplasty: An *in vivo* study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1995, 53: 872-878.
45. Ueda M, Hata Ki, Sumi Y, Mizuno H, Niimi A. Peri-implant soft tissue management through use of cultured mucosal epithelium. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.* 1998, 86: 393-400.
46. Boyce ST. Skin substitutes from cultured cells and collagen- GAG polymers. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998, 36 : 791-800.
47. Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. Design of artificial skin. II. Control of chemical composition. *J. Biomed. Mater. Res.* 1980, 14: 107-131.
48. Delcourt-Huard A, Corlu A, Joffre A, Magloire H, Bonnaure-Mallet M. Reconstituted human gingival epithelium: non-submerged *in vitro* model. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1997, 33(1): 30-36.
49. Izumi k, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J. Dent. Res.* 2000, 79(3) : 798-805.
50. Chung JH, Cho KH, Lee DY. et al. Human oral buccal mucosa reconstructed on dermal substrates: a model for oral epithelial differentiation. *Arch. Dermatol Res.* 1997, 289: 677-685.
51. Mariotti A, Hassel T, Kaminker P. The influence of age on collagen and non-collagen protein production by human gingival epithelial cells. *Archs. Oral Biol.* 1993, 38(8): 635-640.

### Correspondencia

MARTA RAQUEL FONTANILLA DUQUE  
Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad El Bosque.  
Transversal 9ª Bis No. 133-25. PBX. 6 33 13 68.  
FAX: 6 25 20 30.  
Bogotá, Colombia.  
Mrfontan@mixmail.com

