

DESEMPEÑO DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL EN PERIODONCIA E  
IMPLANTOLOGÍA: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA.\*

PERFORMANCE ORAL SUSTITUTES IN PERIODONTIC AND IMPLANT: A  
SYSTEMATIC REVIEW OF THE LITERATURE.\*

ANA MILENA BERMEO NOGUERA\*\*

DAVID RAMIREZ GUERREO\*\*\*

MARCELA MERCADO REYES\*\*\*\*

JUAN MANUEL GONZALEZ\*\*\*\*\*

\*Título del artículo correspondiente al trabajo de grado para obtener título de especialista en Periodoncia.

\*\*Ana Milena Bermeo Noguera. Carrera 10 # 53-61 Apto 303, Bogotá D.C., Colombia. Teléfono 3003906033. Correo electrónico amber8009@gmail.com

\*\*\* David Ramírez Guerrero. Urbanización Villa Consuelo casa 4 sector Pueblo nuevo San Cristóbal Estado Táchira. Venezuela. Teléfono 04144079473. Correo electrónico daviderg01@gmail.com

\*\*\*\* Marcela Mercado Reyes. Carrera 7 # 40-62. Edificio 26. Bogotá, D.C. Colombia.. Teléfono. Correo electrónico mmercado@gmail.com

\*\*\*\*\*Juan Manuel González Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de. Carrera 7 # 40-62. Edificio 26. Bogotá, D.C. Colombia.. Teléfono. Correo electrónico gonzazen58@gmail.com

TITULILLO: DESEMPEÑO DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL: UNA  
REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA

\*\* Odontóloga y Endodoncista. Universidad Nacional de Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

\*\*\* Odontólogo Universidad de Carabobo Valencia- Venezuela.

\*\*\*\* Profesor Asistente. Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia..

\*\*\*\*\*Odontólogo y Periodoncista, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

## RESUMEN

**Antecedentes:** En la práctica clínica tanto en periodoncia como en implantología, uno de los principales inconvenientes suele ser la deficiencia de tejidos blandos y su biotipo, ya sea el resultado de procesos patológicos o condiciones anatómicas. Actualmente existen diferentes estrategias enfocadas hacia su reemplazo, por medio de la combinación de técnicas quirúrgicas, el uso de injertos y/o el uso de membranas elaboradas con biomateriales. La elaboración in vitro de sustitutos de mucosa por medio de Ingeniería tisular, y su posterior aplicación, es una alternativa para el tratamiento. A pesar de la existencia de estudios preclínicos y clínicos sobre el uso de sustitutos de tejido de mucosa oral, la información reportada actualmente con respecto a su desempeño y posible uso clínico en el campo periodontal e implantológico, no es concluyente. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo es realizar una Revisión Sistemática de la literatura, para determinar el desempeño de sustitutos de mucosa oral artificial, incluyendo estudios preclínicos y clínicos. **Materiales y Métodos:** Se realizó una búsqueda manual y electrónica de los datos presentados. Una revisión sistemática fue realizada incluyendo criterios de elegibilidad para la inclusión de los estudios, determinación de medidas de resultado, métodos de búsqueda, extracción de datos, síntesis de datos y conclusiones. Diez artículos fueron seleccionados. Cinco de ellos fueron preclínicos y cinco clínicos. Debido a las diferencias entre los estudios preclínicos, hizo imposible la combinación de datos para permitir un metanálisis. Un total de 5 estudios clínicos fueron incluidos en el análisis, luego de cumplir estrictamente con los criterios de inclusión y exclusión, los cuales evalúan el aumento de encía queratinizada y el cubrimiento radicular. **Conclusión:** El uso de sustitutos artificiales no evidencian ventajas desde el punto de vista clínico con respecto al uso del injerto autólogo (Gold Standard). Sin embargo, desde el punto de vista histológico y molecular durante el proceso de cicatrización permiten evidenciar ciertos beneficios, dirigiendo a procesos regenerativos y no reparativos.

Palabras clave: tejido artificial, sustituto de mucosa oral, colágeno, tejidos blandos, mucogingival.

Área temática: Periodoncia

## ABSTRACT

Background: In clinical practice both periodontal implant as one of the main drawbacks is usually soft tissue deficiency and biotype , whether the result of pathological processes or anatomical conditions . Currently there are different strategies focused on increasing replacement , through dela combination of surgical techniques, the use of grafts and / or prepared using mermbranas with biomaterials. The development in vitro mucosa substitutes through tissue engineering , and its subsequent implementation , is an alternative for treatment. Despite the existence of preclinical and clinical studies on the use of substitutes for oral mucosal tissue , currently reported information regarding their performance and potential clinical use in periodontal and implant field is not conclusive . Objective : The objective of this work is to perform a systematic review of the literature , to determine the performance of artificial oral mucosa substitutes , including preclinical and clinical studies . Materials and Methods : We performed a manual and electronic search of the data presented . A systematic review was performed, including eligibility criteria for inclusion of studies , determination of outcome measures , search methods , data extraction , data synthesis and conclusions. Ten articles were selected . Five were preclinical and clinical five . Due to differences between preclinical studies , the combination made it impossible to allow a meta-analysis data . A total of 5 trials were included in the analysis , after complying strictly with the inclusion and exclusion criteria , which evaluate the keratinized gingival augmentation and root coverage . Conclusion : The use of artificial substitutes show no advantages from the clinical point of view regarding the use of autologous (Gold Standard ) . However, from the standpoint of histological and molecular during the healing process allow to highlight certain benefits , leading regenerative and reparative processes .

## **1. Introducción.**

En la práctica clínica tanto en periodoncia como en implantología, uno de los principales inconvenientes suele ser la deficiencia de tejidos blandos y su biotipo, ya sea el resultado de procesos patológicos o condiciones anatómicas. La presencia y disponibilidad de tejido blando determina en muchos casos el éxito o fracaso de las condiciones de salud en la cavidad oral. Actualmente existen diferentes estrategias enfocadas hacia su reemplazo aumento, por medio de la combinación de técnicas quirúrgicas, el uso de injertos y/o el uso de membranas elaboradas con biomateriales (1).

En el área de periodoncia, un tema controversial ha sido la presencia de encía queratinizada y su relación con la salud periodontal (2). Aunque diferentes estudios han concluido que una mínima cantidad de encía queratinizada no compromete la salud periodontal (3), en algunos casos su presencia permite mayor comodidad para el mantenimiento de una adecuada higiene oral por parte del paciente. Por otra parte, la disponibilidad de este tejido permite realizar, con un mejor pronóstico, procedimientos mucogingivales destinados al cubrimiento de recesiones, ya sea debido a problemas estéticos o de sensibilidad (4). En el caso de los implantes dentales surge este mismo interrogante acerca de la encía queratinizada, varios estudios han concluido que las condiciones de la mucosa periimplantaria se relaciona tanto con el acumulo de placa como también con la capacidad de respuesta de este tejido, además con un aumento de recesiones y pérdida de hueso intercrestal (5). Por lo tanto, una adecuada encía queratinizada permite su estabilidad a largo plazo y el mantenimiento de mejores condiciones estéticas (6).

Adicionalmente, se ha reportado que una de las complicaciones en el campo de la cirugía oral reconstructiva de tejidos duros, es la exposición del injerto de tejido óseo, que se presenta en el 33% de los casos, ocasionando el fracaso total del injerto en aproximadamente el 8.33% de ellos. Una reciente revisión con respecto al uso de injertos óseos autólogos, establece que de las complicaciones más frecuentes en la zona del sitio receptor son la dehiscencia por la herida (7), asociadas a una escasez de tejidos blandos, que se relaciona con contaminación (8) y pérdida de líquidos, con efectos secundarios como retraso en la cicatrización y contractura de la herida. Además, es necesario lograr un

cierre primario que garantice una adecuada vascularización y estabilización del injerto que aumente su predictibilidad y éxito (9). El uso de injertos de mucosa oral autólogos suelen ser indicados para lograr una mayor cantidad de tejido blando, para posteriormente realizar los procedimientos de regeneración ósea, pero esto requiere un sitio donante y conlleva a un aumento en la morbilidad del paciente y como consecuencia una cantidad limitada de tejido (10).

Parte de la investigación periodontal está enfocada hacia la regeneración de los tejidos perdidos (11) y hace uso de la ingeniería tisular, que en su rama clínica se encarga de construir equivalentes tisulares capaces de restaurar, sustituir o incrementar la forma y función de los tejidos y órganos dañados (12), los cuales tienen gran potencial en la aplicación clínica, convirtiéndose en una alternativa viable cuando los tejidos periodontales se encuentran afectados (13) (14).

Durante los últimos años la investigación en este campo se ha dirigido a la búsqueda de mejores alternativas, enfocándose en la elaboración y optimización de sustitutos de tejido, entre ellos los de mucosa oral. De acuerdo a su complejidad y composición, en el tratamiento de órganos y tejidos lesionados, las estrategias terapéuticas más usadas por la ingeniería de tejidos pueden ser clasificadas en cinco grandes grupos: i) Soportes o matrices acelulares naturales o artificiales (Sustitutos acelulares de tejido conectivo); ii) Cultivos tridimensionales de células en soportes o matrices (Tejidos artificiales); iii) Láminas celulares; iv) Células madre o células diferenciadas, v) Factores y medios condicionados para aplicación directa o mediante sistemas de liberación y plasma rico en plaquetas. Los componentes principales de estas estrategias son los soportes, las células, combinaciones de células con soportes y factores con actividad auto y paracrina secretados por estas (15).. Estas estrategias han sido aplicadas en mucosa oral tanto para estudios *in vitro* e *in vivo*.

Su aplicación en el campo periodontal y en la implantología dental, permitirá una mejor comprensión del proceso de cicatrización y ampliará nuestro conocimiento acerca de la relación e interacción de los componentes celulares y moleculares, para la formulación de nuevos tratamientos (16).

La elaboración in vitro de sustitutos de mucosa por medio de Ingeniería tisular, y su posterior aplicación, es una alternativa para el tratamiento de defectos de tejidos blandos en cavidad oral (17), (18), (19).

A pesar de la existencia de estudios pre-clínicos y clínicos sobre el uso de sustitutos de tejido, la información reportada actualmente con respecto a su desempeño y posible uso clínico en el campo periodontal e implantológico, no es concluyente debido la heterogeneidad metodológica de los estudios (20), diferente medición de desenlace y número de intervenciones, por lo cual, no existe un consenso con respecto a este tema (21).

El objetivo de este trabajo es realizar una Revisión Sistemática de la literatura, para determinar el desempeño de sustitutos de mucosa oral artificial, incluyendo estudios preclínicos y clínicos, en las áreas de periodoncia e implantología.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Diseño**

Esta investigación se realizó mediante la metodología de una Revisión Sistemática de la Literatura, incluyendo ensayos preclínicos y clínicos.

### **2.2. Estrategia de búsqueda**

La búsqueda sistemática de la información se realizó simultáneamente para estudios preclínicos y clínicos, tomando en cuenta artículos publicados desde 1995 hasta 2011, a través de las siguientes bases de datos: Medline, Cochrane, Scielo, ScienceDirect, Proquest, Ebsco, Ovid, Scopus Springer Link. La búsqueda fue limitada en idiomas: inglés, español y portugués. Adicionalmente se realizó una búsqueda manual basada en una lista de referencia que fue recolectada de las bibliografías de los artículos de texto completo que fueron obtenidos.

### **2.3. Términos de búsqueda**

Los siguientes términos fueron utilizados:

Mouth mucosa

Tissue engineering

Tissue scaffolds

Connective tissue

Transplant

Regeneration

Dental implant

Periodontics

Mucogingival surgery

Autologous artificial connective tissue

Mucogingival surgery

Combinaciones:

Acellular dermal matrix allograft

Fibroblast-populated skin substitutes

Gelatin-based scaffolds

Fibrina-based scaffolds

Bilayered living skin construct

Oral mucosa equivalent

Acellular dermal matrix allograft

Synthetic scaffolds.

#### **2.4. Criterios de inclusión**

En la revisión se incluyeron artículos científicos preclínicos y clínicos, experimentales y cuasiexperimentales relacionados con el uso de los sustitutos de mucosa oral artificial aplicados en mucosa oral masticatoria en el área de periodoncia e implantología, con un periodo mínimo de seguimiento de 3 semanas de los individuos injertados. Todos los estudios debían tener un grupo experimental y un grupo control.

#### **2.5. Criterios de exclusión**

Se excluyeron estudios realizados in vitro o con soportes acelulares, reportes de caso, cartas al editor y revisiones de la literatura.

#### **2.6. Selección de los estudios**

Los títulos obtenidos por medio de la estrategia de búsqueda, fueron evaluados con base en los criterios de inclusión. Posteriormente a la eliminación de aquellos cuyo título no cumplía con estos criterios, se hizo la lectura de los resúmenes de los artículos seleccionados. Para hacer la selección final, se procedió a la lectura completa de los artículos cuyo resumen cumpliera con los criterios. La selección se hizo por dos investigadores de forma independiente, con una lista de chequeo basada en los criterios de inclusión y exclusión (Anexo 1).

#### **2.7 Extracción de los datos**

Los datos fueron extraídos con base en las características generales del estudio:

- Año de publicación y autor
- Tipo de estudio (preclínico / clínico)
- Características del estudio (tipo y tamaño de la muestra, características del defecto, estrategias de intervención, tiempo de seguimiento y variables evaluadas)
- Características metodológicas (Diseño del estudio y calidad metodológica).



Después de seleccionar los artículos, los datos se extrajeron en un formato estandarizado, por dos revisores de forma independiente y cualquier desacuerdo se resolvió mediante una discusión.

Para el posterior análisis, la medida de resumen (overall), fue calculada con un intervalo de confianza del 95%. Los artículos seleccionados fueron ingresados al programa RevMan 5 de la biblioteca Cochrane. Se calculó las medidas de resumen (Diferencia de medias) y sus respectivos IC 95%.

La evaluación de la calidad metodológica se realizó mediante una lista de chequeo previamente elaborada. Los desacuerdos fueron resueltos con la ayuda de expertos por medio de discusión siguiendo los criterios establecidos.

Por otra parte, para cada tipo de estudio se hizo una extracción específica de datos para incluir la siguiente información:

### **2.7.1. Estudios preclínicos**

Se hizo de acuerdo a los hallazgos histológicos: Infiltrado inflamatorio, organización estructural del tejido epitelial y/o conectivo, vascularización, tiempo de cicatrización. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los hallazgos macroscópicos del proceso de cicatrización reportados en cada estudio.

### **2.7.2. Estudios Clínicos**

La extracción de datos se hizo dependiendo del objetivo del tratamiento, como por ejemplo: aumento de encía queratinizada, cubrimiento radicular o procedimientos de injerto en mucosa masticatoria.

## **2.8. Análisis Estadístico**

### **2.8.1. Estudios preclínicos**

Una vez extraída la información se analizaron los datos de forma descriptiva determinando proporciones en variables cualitativas y medidas de tendencia central by dispersión para variables continuas.

### **2.8.2. Estudios clínicos**

Basado en las modalidades de tratamiento y sus resultados, el análisis se realizó con 5 artículos, 3 de los cuales se centraron en la evaluación del aumento de encía queratinizada, medida como: Ganancia en el ancho de encía queratinizada (cambio en mm desde una medida base hasta una final) . Los 2 artículos restantes se centraron en evaluación del cubrimiento radicular, que se midió como: Porcentaje de cubrimiento radicular y milímetros de recesión. El resultado de interés para cada intervención fue la diferencia promedio pos-intervención entre el grupo experimental y el grupo control.

La representación gráfica de las diferencias promedio específicas para cada estudio se realizó mediante la gráfica de Forest plot. La variación entre los resultados de diferentes estudios se determinó con el test de heterogeneidad, mediante el modelo de efectos aleatorios con una significancia del 5%, utilizando una prueba de chi cuadrado.

## **3. Resultados**

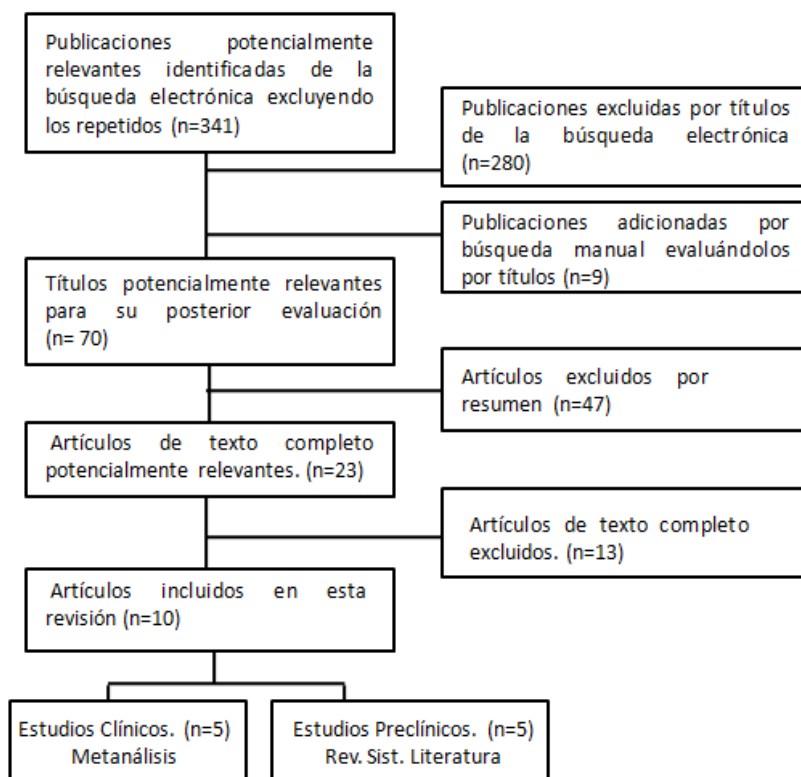
### **3.1. Resultados de la búsqueda**

A partir de la exploración inicial se identificaron 341 títulos por búsqueda electrónica y 9 por medio de búsqueda manual para un total de 350 títulos. Posterior a la evaluación por título fueron seleccionados 70 artículos y después de leer el resumen de los mismos se excluyeron 47 quedando 23 artículos relevantes. A continuación, 13 artículos fueron eliminados después de la lectura completa y finalmente se obtuvieron 10 artículos que cumplieron con los criterios para ser incluidos en nuestro estudio, 5 artículos con estudios preclínicos y 5 con estudios clínicos. **Figura 1.**

Las razones para la exclusión de los artículos posterior a la lectura completa (n=13) fueron: no presentaban grupo control (n= 7), reportes de caso (n=2), reportaba el uso de un soporte acelular (n=1), no especifica el uso en mucosa masticatoria (n=1), reportaba seguimiento inferior a 20 días (n=1), reportaba los mismos pacientes empleados en otro estudio que fue incluido en esta revisión (n=1). El estudio de Izumi y Cols. 2003, a pesar de cumplir con la mayoría de criterios de inclusión, tanto los tratamientos como los controles en su mayoría no fueron realizados en mucosa masticatoria.

Los estudios preclínicos reportaron principalmente hallazgos histológicos (Infiltrado inflamatorio, vascularización y organización del tejido conectivo y epitelial) y macroscópicos (características de la herida).

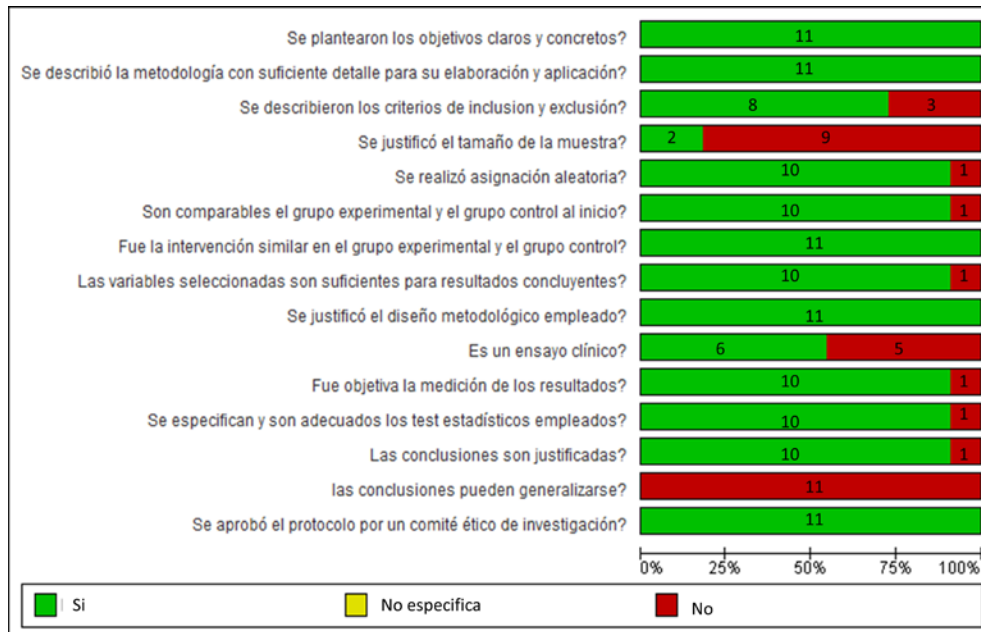
A pesar que se esperaba encontrar el uso de tejido artificial en diferentes procedimientos de injerto en mucosa masticatoria en periodoncia e implantología, los estudios clínicos que cumplieron con los criterios de inclusión, se relacionaron únicamente con dos aplicaciones que fueron aumento de encía queratinizada y cubrimiento radicular.



**Figura 1. Selección de los estudios**

### 3.2. Calidad Metodológica

La calidad metodológica de los estudios fue adecuada en la mayoría de los aspectos evaluados. Con respecto al tamaño de la muestra, en la mayoría de los artículos no reportaron esta información. (figura 2).



**Figura 2. Calidad metodológica de los estudios.**

### 3.3. Estudios Preclínicos

Se encontraron pocos estudios preclínicos que cumplieran los criterios de inclusión, ya que la mayoría, evalúan soportes acelulares o cuando incluyen células lo hacen con modelos animales en heridas en piel. Los estudios analizados en esta revisión emplearon conejos o perros como modelo animal y evaluaron el desempeño del tejido artificial en dos tipos de tratamiento: aumento de encía queratinizada (Lofti, 2011) y cubrimiento de herida (Espinosa, 2010; Ophof, 2008). Otros estudios evaluaron la seguridad de los tejidos artificiales al injertarlos subepitelialmente (Novaes, 2011; Bornstein, 2011). Los soportes empleados en la elaboración del tejido artificial fueron: membranas de colágeno, quitosano o tejidos decelularizados, que fueron sembrados con fibroblastos y/o queratinocitos, de fuente oral autóloga o de piel heteróloga. Estas diferencias entre los estudios, además de la forma de medir y reportar los resultados y los periodos de seguimiento, hizo imposible la combinación de datos para permitir un metanálisis. (Tabla 1)

AUTOR Y AÑO	MODELO	DEFECTO	TRATAMIENTO	CONTROL	NÚMERO DE SUJETOS	SEGUIMIENTO (semanas)
Novaes A, et al; 2007	Perros Mongrel	Espesor parcial en encía (cubierto)	*DACH + Fibroblastos orales autólogos	*DACH	7	8
Lofti G, et al; 2011	Perros Mongrel	Espesor parcial en encía (expuesto + apósito quirúrgico)	Bicapa de quitosano + Fibroblastos orales autólogos	Bicapa de quitosano	5	12
Ophof R, et al; 2008	Perros Beagle	Espesor total en paladar duro (expuesto)	*DACH + Queratinocitos orales autólogos y **DDC + Queratinocitos orales autólogos	Injerto autólogo y segunda intención	6	12
Espinosa L, et al; 2010	Conejos Nueva zelanda	Espesor parcial en encía (expuesto)	Soporte de colágeno + fibroblastos orales autólogos y soporte de colágeno sin células	Segunda intención	51	8
Borstein M, et al; 2011	Conejos Burgundy	Espesor parcial en paladar (cubierto)	Soporte de colágeno + fibroblastos y queratinocitos de piel humana y Soportes de colágeno con fibroblastos de piel humana	Segunda intención	4	4

Tabla 1. Cuadro Resumen Estudios Preclínicos\*Derms acelular cadavérica humana (DACH)\*\*Derms deepidermizada canina (DDC)

### 3.3.1 Hallazgos Histológicos

#### 3.3.1.1. Infiltrado inflamatorio

En los estudios en los cuales el tejido artificial está expuesto al medio oral, como el estudio de Ophof y cols 2008, realizado en un modelo animal de perros con heridas de espesor total que evaluó tejidos artificiales formados a partir de dermis decelularizada \*DACH y \*\*DDC, con queratinocitos, se encontró que en la primera semana hubo inflamación moderada tanto en los tratamientos como en el injerto autólogo e inflamación leve en el control dejado sanar por segunda intención. Esta inflamación disminuyó en la semana 3 y desapareció para todos los grupos en la semana 12. De igual forma, en el estudio de Espinosa y col. 2010, en un modelo animal de conejo con heridas de espesor parcial,

también se observó un mayor infiltrado inflamatorio (moderado) en la segunda semana al emplear el soporte de colágeno con fibroblastos autólogos, respecto al uso de soporte de colágeno sin células y al grupo que cicatrizó por segunda intención, en la semana 2 después del tratamiento, sin embargo para las semanas 4 y 8 no se observaron signos de inflamación. Finalmente, Lofty y cols. 2011 quienes estudiaron el desempeño de quitosano con fibroblastos autólogos, usando quitosano como control, no observaron signos de inflamación al evaluarla a las 12 semanas del tratamiento.

Uno de los estudios que evaluó el comportamiento del tejido artificial como injerto subcutáneo fue el de Novaes y cols. 2007, en modelo animal canino, donde se comparó DACH con fibroblastos orales autólogos y DACH sin células. La inflamación fue igual en ambos grupos, siendo entre moderada y alta en la semana 2 y disminuyó progresivamente en la semana 4, hasta llegar a ser leve en la semana 8. El estudio de Bornstein y cols. 2011, empleó conejos como modelo animal, a las 4 semanas de seguimiento los dos tipos de tejido artificial estaban encapsulados por un tejido fibroso denso con infiltrado inflamatorio. En el grupo tratado con el tejido artificial compuesto por fibroblastos y queratinocitos humanos se observó el infiltrado inflamatorio localizado en la parte central del sustituto, mientras que el elaborado solo con fibroblastos humanos lo presentó en la zona periférica. El grupo control que cicatrizó por segunda intención presentó un infiltrado inflamatorio leve.

### **3.3.1.2 Vascularización:**

El estudio de Ophof y cols. 2008, reportó de manera descriptiva los hallazgos en la vascularización, con presencia de vasos sanguíneos en todas las heridas después de la tercera semana del tratamiento. Espinoza y cols. 2010, reportaron que el grupo tratado con soportes de colágeno y fibroblastos, presentó una mayor formación de vasos sanguíneos a la cuarta y octava semana de seguimiento, respecto a la cicatrización por segunda intención. Resultados similares, se observaron al emplear soportes de colágeno sin células, respecto al mismo control en la cuarta semana. Adicionalmente, al comparar los dos tratamientos, soportes de colágeno con células y sin células, se observó un aumento significativo en el número de vasos sanguíneos en el tratamiento con células. Novaes y cols. 2007, llegaron a hallazgos similares, ya que el tejido artificial que incluía fibroblastos

presentó un aumento estadísticamente significativo en el número de vasos sanguíneos ( $P < 0,03$ ) comparado con el grupo control (DACH), en la segunda semana de seguimiento. Posteriormente, a la octava semana las diferencias disminuyeron. Los estudios de Lofti 2011 y Bornstein 2011, no reportan hallazgos respecto a la vascularización.

### **3.3.1.3. Organización estructural del tejido epitelial y conectivo:**

En el estudio de Ophof y cols. 2008, que empleó queratinocitos para elaborar los tejidos artificiales, no se observó la presencia de células que inicialmente conformaban la capa epitelial del tejido artificial (DACH y DCC) después de la primera semana de injertados, de igual forma la capa epitelial desapareció en el tejido autólogo (Control). Además, en todos los grupos evaluados, la epitelialización ocurrió a partir de los bordes de la herida hacia la primera semana y se completó en la tercera. Después de la tercera y duodécima semana, no se observaron los tejidos artificiales implantados. En los hallazgos respecto a tejido conectivo, reportaron que no hubo diferencias entre injertar tejido artificial y el cierre por segunda intención, presentando fibras de colágeno alineadas y ausencia de elastina. Espinoza y cols. 2010, reportaron diferencias significativas en el grosor epitelial en las heridas injertadas con el soporte con células respecto a las heridas que cicatrizaron por segunda intención, mientras las heridas tratadas con el soporte acelular no presentaron ninguna diferencia. Lofti y cols. 2011, encontraron diferencias en el epitelio luego de injertar tejido artificial elaborado con quitosano y fibroblastos orales autólogos, respecto a quitosano sin células. Encontraron diferencias en la formación de crestas epiteliales, siendo más numerosas en el tejido artificial que en el quitosano sin células.

En los estudios donde el tejido artificial se injertó subepitelialmente, Novaes y cols 2011 no reportaron diferencias en el grosor epitelial entre los tratamientos, indicando que el uso de tejido artificial, respecto a soporte sin células no afectó el epitelio del sitio injertado. Borstein y cols. 2011, que a diferencia de Novaes incluyeron queratinocitos en uno de los tratamientos, reporta su viabilidad a la cuarta semana de seguimiento, conservando la estratificación inicial del tejido artificial antes del injerto; sin embargo, evidencian la presencia de calcificaciones en este grupo.



En todos los estudios la queratinización fue similar al final del seguimiento siendo paraqueratinizado Ophof R. y cols 2008, Espinoza L. y cols 2010, Lofti G y cols 2011, Novaes y cols 2007, Borstein M. y cols 2011.

### **3.3.2. HALLAZGOS CLINICOS.**

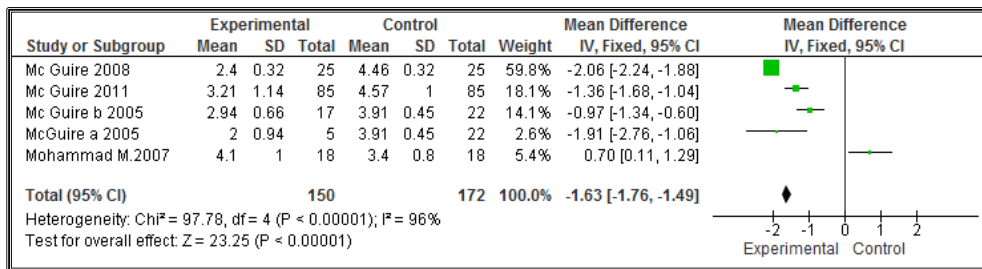
En el artículo de Espinosa y cols. 2010, fue evaluado el porcentaje de contracción de la herida a los 0, 4, 7 y 11 días. El tejido artificial presentó menos contracción que el soporte sin células y estos dos mostraron menor contracción que la herida que cicatrizó por segunda intención. Lofti y cols. 2011, evaluaron el ancho de encía queratinizada en el tejido artificial (quitosano-fibroblastos autólogos) y en el grupo control (quitosano), reportaron un incremento en los dos grupos, sin diferencias significativas entre ellos. En los demás estudios no fueron descritos hallazgos clínicos.

### **3.4. ESTUDIOS CLINICOS**

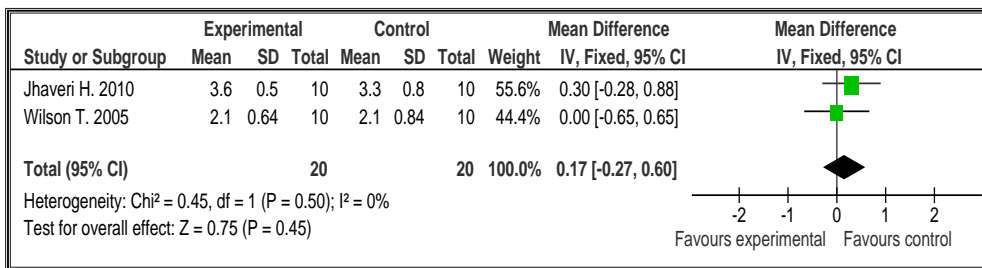
Un total de 6 artículos fueron incluidos en el análisis, luego de cumplir estrictamente con los criterios de inclusión y exclusión (Mc Guire 2005, Mc Guire 2008, Mc Guire 2011, Jhaveri 2010, Mohammadi 2007, Wilson 2005). El artículo de Mc Guire (2005), presenta una subdivisión con respecto a la cantidad de capas del sustituto de mucosa oral artificial utilizado en el grupo experimental, por lo tanto cada subdivisión se analizó como un estudio independiente, completando así un total de 7 estudios incluidos, de los cuales 5 evalúan aumento de encía queratinizada y 2 cubrimiento radicular. (Tabla 2)

### 3.4.1 Evaluación de aumento de encía queratinizada

La medida de desenlace para estos estudios, fue la diferencia promedio de la ganancia de encía queratinizada (mm) entre el grupo control, que empleó injerto de tejido autólogo y el grupo experimental. En los resultados se observó una diferencia en el aumento de encía queratinizada estadísticamente significativa 1.63 mm (IC 95% -1.76 mm; -1.79 mm) a favor del grupo control. Adicionalmente, la prueba de chi cuadrado demostró heterogeneidad entre los resultados de los estudios evaluados. Debido a esto, el estudio de Mohammad (2007) se analizó de forma independiente, ya que utilizó una técnica quirúrgica diferente (fenestración perióstica) y no empleó injerto de tejido autólogo como control. (Tabla 3)

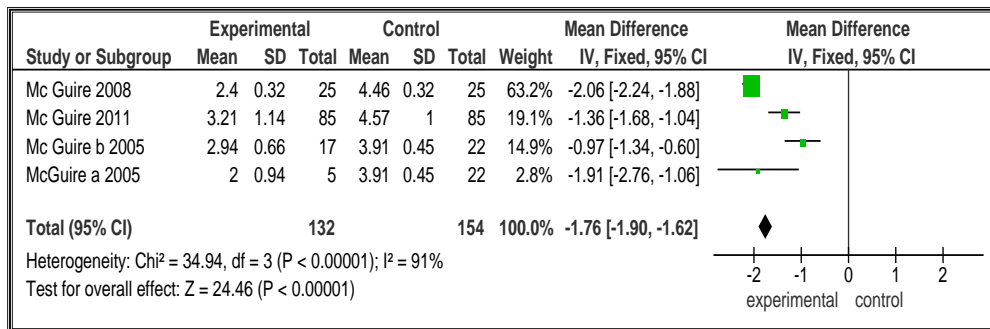


**Figura 3.** Ancho de encía queratinizada (Procedimientos de aumento de encía queratinizada)



**Figura 4.** Ancho de encía queratinizada (Procedimiento de cubrimiento radicular)

Los estudios que emplearon la técnica quirúrgica de colgajo desplazado apical/ vestibuloplastía e injerto de tejido autólogo como control, mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el aumento de encía queratinizada, a favor del grupo control, 1.76 mm (IC -1.90 mm; -1-62 mm). (Tabla 3) y fueron heterogéneos ( $p < 0.00001$ ).



**Figura 5.** Ancho de encía queratinizada (Técnica Colgajo desplazado apical)

El estudio cuya técnica quirúrgica fue mediante fenestración perióstica y no incluyó injerto autólogo como control, no mostró diferencia estadísticamente significativa en el aumento de encía queratinizada. 0.70 mm (IC 95% -0.16 mm; 1.56 mm). Tabla 3. No se aplica la prueba de heterogeneidad debido a que se reporta un solo estudio. ( $p = 0.11$ )

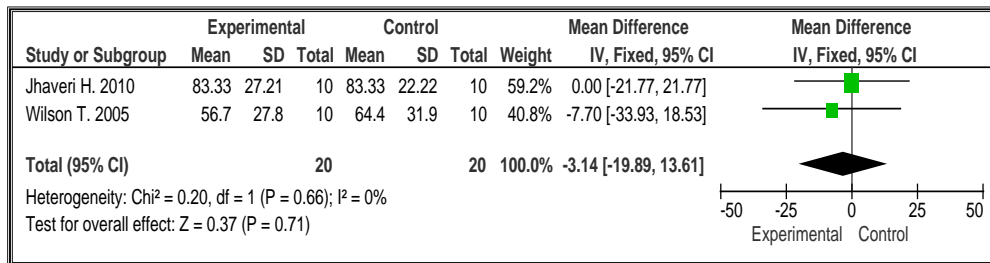
Debido a la forma descriptiva en que se reportaron los hallazgos histológicos no se hizo un metanálisis y se incluyen a continuación.

Mohammadi (2011), reportó que a los 3 meses, el epitelio presentaba una queratinización completa (paraqueratinizado), con una apariencia acantótica y anastomosis de las crestas interpapilares. La lámina propia presentó, un tejido fibrovascular con un leve infiltrado de células inflamatorias mononucleares. En el estudio realizado por Mc Guire (2005), se realizó el seguimiento histológico a los 6 meses, se observó que el tejido conectivo presentaba fibroblastos de apariencia normal y con epitelialización completa. Sin embargo, en cuanto a la organización del tejido conectivo, se observó una mejor disposición de las fibras colágenas en la herida injertada con el tejido artificial respecto al tejido gingival autólogo.

### 3.4.2. Evaluación del cubrimiento radicular

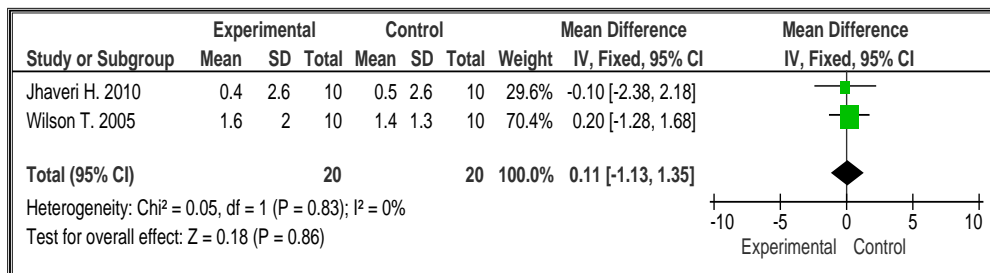
Las medidas de desenlace para estos estudios, fueron el porcentaje de cubrimiento radicular (%) y el tamaño de la recesión (mm). Se realizó una comparación con respecto a un grupo control que empleó un injerto tejido autólogo. La técnica quirúrgica empleada para los dos estudios fue la misma, cobertura con un colgajo posicionado coronal del tejido injertado.

En el resultado para la diferencia del porcentaje de cubrimiento radicular, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo experimental. -3.14 (IC 95% -19.8; 13.1) y fueron homogéneos ( $p=0.66$ ). (Tabla 4)



**Figura 6.** Cubrimiento radicular (%)

En cuanto los resultados para tamaño de la recesión no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo experimental. 0.11 mm (IC 95% -19.8mm ; 13.1 mm) y fueron homogéneos ( $p=0.86$ ). (Tabla 5)



**Figura 7.** Tamaño de recesión (mm)

## **4. DISCUSIÓN**

La presente revisión sistemática se enfocó en responder la pregunta: ¿cuál es el desempeño de los sustitutos de mucosa oral artificial en el campo de periodoncia e implantología?. Posterior a la búsqueda inicial y luego de realizar una selección meticulosa con base en los criterios de inclusión y exclusión, se evidenció que los estudios preclínicos y clínicos para estas aplicaciones son escasos y no existe estandarización en la forma de evaluar el éxito, la predictibilidad de los tratamientos, la definición de parámetros y escalas de medición. Además, la mayoría de los estudios clínicos carecen de grupo control, presentando sesgos que afectan la validez de las conclusiones. Esto puede deberse a que la ingeniería de tejidos es un área relativamente nueva (22) y su aplicación a nivel oral está siendo explorada recientemente (23). Por lo tanto, fueron pocos los estudios incluidos. En los estudios preclínicos no se pudo realizar una comparación mediante un metanálisis y en los estudios clínicos los únicos parámetros comparables fueron: el aumento de encía queratinizada y el cubrimiento radicular, a los que se realizó meta-análisis. Los resultados no comparables cuantitativamente, se discutirán de manera descriptiva.

### **4.1. Estudios Preclínicos**

En periodoncia el concepto de regeneración tisular guiada/regeneración ósea guiada, se basa en el principio de prevenir el crecimiento epitelial bajo el área de la herida a través de la colocación de membranas de barrera y favorecer la proliferación de células con potencial de reparación que permitan realizarlo a través de un tejido. Los materiales utilizados de barrera deben tener características de biocompatibilidad, integración al tejido, oclusividad celular, transferencia de nutrientes, habilidad de crear espacio y fácil manipulación clínica (24). Cuando se desarrolla un soporte para sustitutos de mucosa oral artificial estas características cambian dramáticamente. El concepto es diferente, debe permitir la estimulación del tejido circundante para inducir procesos de regeneración. Uno de los principales objetivos de la investigación periodontal es encontrar matrices biocompatibles, capaces de reemplazar tejidos gingivales perdidos y que sean integradas y gradualmente reemplazadas o reincorporadas por el tejido del huésped. Estos materiales podrían ayudar a conseguir contornos gingivales más estéticos y mejorar condiciones de salud (11).

Los estudios preclínicos mostraron que el tipo del tratamiento condiciona la respuesta del tejido artificial y se asocia a su forma de aplicación. Existen condiciones en las cuales podría estar más indicado, razón por la cual, este trabajo es un primer acercamiento para conocer y determinar su desempeño, y posteriormente, precisar las posibles aplicaciones en periodoncia e implantología.

De acuerdo con los resultados, se observó que existen diferencias tanto entre los componentes del tejido artificial como en su forma de aplicación. Debido a esto, se realizó un análisis de forma descriptiva de los hallazgos histológicos y clínicos.

Cuando la aplicación del tejido artificial se realiza de forma subcutánea los hallazgos clínicos e histológicos varían notablemente con respecto a la aplicación expuesta al medio oral.

En los hallazgos histológicos el proceso inflamatorio fue similar en todos los grupos experimentales, cuando el tejido artificial estuvo expuesto al medio oral, sin importar si fueron injertados en heridas de espesor parcial o total. El cual fue de moderado a severo y disminuyó entre la tercera y cuarta semana a leve o nulo. La presencia de este infiltrado puede tener gran importancia sobre todo en heridas expuestas al medio oral, Graves 2001, observó la cicatrización de heridas en mucosa oral de ratones, en los cuales fue inhibida la expresión del receptor para la IL-1 ( $IL1R^{-/-}$ ). Estos animales presentaron una respuesta inflamatoria crónica, además, una disminución en la formación de tejido conectivo nuevo y epitelización retardada. La señalización vía IL-1R, es crítica en la cicatrización normal en un entorno difícil, esto es debido en gran parte a su función esencial en la regulación de las defensas antibacterianas. La presencia de una elevada cantidad de células PMN en estos estadios inflamatorios, permiten una mejor protección de la heridas expuestas al medio oral, sin embargo es importante que esta respuesta sea transitoria como se describió también en los estudios de esta revisión (25).

Durante el periodo de incubación de los tejidos artificiales que contienen fibroblastos se inicia el recambio del biomaterial del soporte por matriz extracelular, lo cual disminuye procesos inflamatorios asociados con la naturaleza del biomaterial (26). Una vez injertado el tejido artificial que contiene fibroblastos se ha reportado que reduce la migración y

proliferación fibroblástica, sin afectar la presencia de monocitos/macrófagos y células endoteliales. Además reduce la velocidad de degradación del soporte, permitiendo que ejerza su acción benéfica, al permitir la proliferación celular y deposición de la matriz extracelular por un tiempo más prologado, sin una respuesta inflamatoria sostenida. Estudios han demostrado que la degradación retardada del sustituto, podría ser una función protectora por parte de los fibroblastos del tejido artificial (27). Por otra parte, una alta densidad de fibroblastos en el tejido artificial ha mostrado mayores beneficios al acelerar el cierre de la herida y mejorar el proceso de regeneración (28).

Debido a la mayor presencia de un infiltrado inflamatorio, en los grupos experimentales (soporte con células), y teniendo en cuenta que en varios estudios se reporta que la permanencia de las células injertadas sobre el soporte es limitada aproximadamente de 7 a 14 días (29)(30), se podría atribuir entonces una secreción de factores de crecimiento y citoquinas que pueden regular la llegada y activación de células inflamatorias, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales a la herida y posteriormente, la presencia de proteínas involucradas en la síntesis y remodelado de la matriz extracelular. En el estudio de Lofti 2011, no reportó datos de seguimiento durante las fases iniciales del proceso inflamatorio, sin embargo, estudios similares, que utilizaron quitosano pero sin células para el cubrimiento de heridas, han reportado un infiltrado inflamatorio agudo transitorio, sugiriendo que la presencia de este infiltrado promueve la regeneración del epitelio (31)(32). Esta respuesta podría ser similar con el uso de tejido artificial.

Estudios en los cuales se utilizó el tejido artificial de forma sumergida, como el de Novaes 2007, donde se comparó el proceso de cicatrización al emplear una matriz dérmica acelular o mucosa oral artificial elaborada con fibroblastos autólogos, en un modelo animal de perros, a las 2 semanas se observó que el infiltrado inflamatorio fue alto-moderado en los dos grupos y disminuyó a leve hacia la octava semana (11). Al igual que los soportes sintéticos y los producidos a partir de proteínas purificadas como el colágeno, los basados en matriz extracelular decelularizada, involucran una respuesta innata y adquirida por parte del sistema inmunológico; su intensidad, ubicación y duración está afectada por variables, como su uso clínico, origen y proceso de elaboración, lo cual influye en el resultado de la remodelación del tejido. Las matrices dérmicas acelulares, presentan una respuesta celular

aguda intensa, en periodo inicial a la implantación. Sin embargo, este evento no es necesariamente predictivo de un proceso de remodelación adverso (33).

Con el tiempo, la presencia de células mononucleadas y posteriormente neutrófilos en el sitio de la inflamación, permiten una fagocitosis de detritos celulares y material extraño que posteriormente salen del sitio de la inflamación. A pesar de presentar una respuesta inflamatoria similar en cuanto a la cantidad de células, la calidad del proceso inflamatorio puede estar dirigido hacia procesos diferentes, por ejemplo se han identificado varias poblaciones de macrófagos 1) El fenotipo proinflamatorio citotóxico (M1) caracterizado por promover la muerte de patógenos y estar asociados a signos clásicos de inflamación, principalmente inflamación crónica, 2) El fenotipo anti-inflamatorio (M2) que promueve una inmunoregulación, reparación del tejido y remodelado. Esta diferencia es imposible de detectar con las técnicas histológicas comunes, sin embargo el perfil de expresión de citoquinas es muy diferente (33).

En estudios previos se ha reportado que la dermis acelular presenta varias diferencias a nivel estructural con respecto a los injertos de tejido conectivo subepitelial (autoinjerto). Este último, contiene vasos sanguíneos y fibroblastos, los cuales ayudan en la incorporación del tejido al lecho de la herida. Debido a la carencia de estos componentes se ha descrito que la incorporación de dermis acelular es lenta y depende exclusivamente de la infiltración de células y vasos sanguíneos desde el periostio y el tejido que la cubre (34). Las deficiencias funcionales y estructurales que no permiten un óptimo rendimiento de este tipo de matrices pueden estar relacionadas a la carencia de un componente celular (35). Se ha reportado en reparación de heridas de piel que los fibroblastos tienen un papel central, ya que migran en etapas tempranas al sitio de la herida, proliferan rápidamente y además, regulan la deposición de matriz extracelular, la diferenciación epidérmica y la regeneración dérmica (35). Por otra parte, los fibroblastos sintetizan varios factores de crecimiento tales como: factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas -A, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial vascular y citoquinas que estimulan la reparación. La adición de fibroblastos para desarrollar tejidos artificiales basados en colágeno promueve la regeneración dermo-epidermal y la diferenciación epidérmica (35). La interacción del tejido



conectivo con el tejido epitelial influye en sus características fenotípicas, ya que la porción superficial del tejido conectivo parece influir en la expresión de queratinas típicas en su diferenciación y especificidad regional (36).

En el estudio de Bornstein y cols. 2011, se compara el proceso de reparación al injertar subepitelialmente tejido artificial, cuyo componente celular son fibroblastos o fibroblastos y queratinocitos humanos. Se concluye, que la presencia de queratinocitos puede aumentar el proceso inflamatorio, esto podría estar relacionado, con la presencia de un tejido epitelial en tejido conectivo (37). Se ha sugerido que esto puede resultar en la formación de quistes epiteliales (38). Adicionalmente se observó un proceso de degradación lenta del soporte, esto puede deberse a un efecto de barrera, dado por la presencia de queratinocitos, en una cara del soporte que podría estar impidiendo, la interacción con metaloproteasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular para su recambio.

Aunque los autores reportan que no hubo una reacción inmune evidente de la mucosa, el proceso de encapsulación de estos tejidos artificiales podrían estar relacionados con su rechazo, debido a que las células empleadas son de origen xenogénico, siendo el único estudio que utiliza células de otra especie, en contraste con todos los estudios reportados en esta revisión que han utilizado células autólogas. Esto podría explicar porque GINTUIT™<sup>®</sup> compuesto por fibroblastos y queratinocitos heterólogos de prepucio de neonato en un soporte de colágeno es recomendado para uso en cubrimiento de recesiones (39).

Otro hallazgo histológico reportado en los estudios preclínicos, es la vascularización. En el estudio de Ophof 2008, en heridas mucoperiósticas, en todos los grupos se observó la presencia tardía de vasos sanguíneos comparada con los otros estudios, esto puede estar relacionado con la carencia del perióstio, por lo tanto, la formación de vasos sanguíneos en la zona afectada depende de la migración celular desde los márgenes de la herida (40). Izumi 2003, realizó un estudio clínico donde evaluó un sustituto de mucosa artificial (EVPOME), constituido por una matriz dérmica acelular humana (ALLODERM) con cultivos de queratinocitos autólogos (14), pero a diferencia del estudio de Ophof 2008 fue realizado en heridas de espesor parcial y se observó una revascularización temprana. La permanencia del epitelio a pesar de la pérdida de una capa epitelial superficial, permite la

secreción de citoquinas como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (41), relacionado con procesos de neoangiogénesis. El efecto del tejido artificial está directamente relacionado con la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que regulan los procesos relacionados con la vascularización. Esto indica que la presencia de un tejido subyacente que aporte vascularización es importante no solo para prolongar la vida de las células del tejido artificial (7-14 días) sino para permitir la migración inducida por la quimiotaxis (30).

El estudio de Espinoza 2010, realizado en heridas de espesor parcial, mostró que al ser tratadas con colágeno o tejido artificial con fibroblastos, el número de vasos sanguíneos formados fue significativamente mayor, en comparación con el grupo control el cual cicatrizó por segunda intención. Además, esta diferencia también se presentó entre los dos grupos experimentales (tejido artificial y soporte de colágeno), demostrando la importancia de los fibroblastos en el proceso de vascularización (30). Durante los procesos de neovascularización, los fibroblastos cumplen un rol paracrino. Miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluyendo A,B,C y D, son producidos por fibroblastos y son importantes para la regulación de la proliferación de células endoteliales, a través de sus receptores (42). Se ha reportado que cultivos de fibroblastos en conjunto con células endoteliales, que expresan VEGF-C, permiten la expresión de metaloproteinasas de matriz-1, estas son capaces de permitir la degradación del soporte de colágeno, formando túbulos que posteriormente permitirán procesos de neovascularización (43). Se debe tener en cuenta que los factores secretados por los fibroblastos que hacen parte del tejido artificial y las señales quimiotácticas de los productos de degradación del soporte de colágeno, contribuyen activamente en la formación de ese microambiente que estimula la vascularización (44). Sin embargo, este proceso debe ser regulado. Estudios han demostrado que la cicatrización en heridas de mucosa oral se caracteriza por una respuesta disminuída de eventos angiogénicos, y esto se correlaciona con una menor formación de cicatriz (45).

En el estudio de Novaes 2007, a pesar de que el tejido artificial fue utilizado subepitelialmente, también se observó un incremento en el proceso angiogénico en etapas tempranas de reparación. Por lo tanto, concluyen que la adición de fibroblastos mejora la

incorporación del injerto y la reparación (11). Estos resultados están de acuerdo con los estudios discutidos previamente.

Uno de los requisitos de los soportes empleados en ingeniería de tejidos, además de su biocompatibilidad y biodegradabilidad es que sea pro-angiogénico, con el fin de permitir la vascularización, ya que las células para sobrevivir deben estar a mínimo a 100-200  $\mu\text{m}$  de los vasos sanguíneos, que es la distancia que permite la difusión de oxígeno, nutrientes y productos de desecho para mantener el tejido viable, de lo contrario podría llevar a un proceso de necrosis/apoptosis (46)

Actualmente, la generación de los tejidos vascularizados sigue siendo el desafío clave en la ingeniería de tejidos. Numerosos métodos fueron hechos en la última década para superar este problema. Sin embargo, este objetivo no se ha logrado completamente, es importante continuar adquiriendo un mayor conocimiento y explorar diferentes técnicas que permitan la creación de la próxima generación de tejidos y órganos artificiales (47).

En cuanto a la organización estructural del tejido epitelial y conectivo, los hallazgos de Ophof 2008, desfavorecen tanto a los grupos tratados con el tejido artificial como también al grupo tratado con el injerto autólogo, debido a la pérdida de los queratinocitos y de la capa epitelial respectivamente durante la primera semana. Estos resultados coinciden con los hallazgos reportados por Yoshizawa 2012, sin embargo, aunque el tipo de herida conserva la submucosa, la viabilidad de las células (queratinocitos autólogos), fue de 7-14 días. Esto soporta la evidencia del beneficio que aportan la presencia de células durante las fases tempranas del proceso de cicatrización, a través de la liberación de citoquinas (29). Por lo tanto, la indicación para el uso del tejido artificial está limitada a la vecindad de un sustrato con el cual interacciona, mas no por la incorporación del las células injertadas al tejido receptor. En el estudio de Espinoza 2010, se observó una diferencia significativa en cuanto al grosor epitelial, en heridas injertadas con el tejido artificial, con respecto a las heridas que cicatrizaron con el soporte de colágeno y por segunda intención, a las dos semanas (48). Similar a el estudio de Lofti 2011, con soportes de quitosano y fibroblastos autólogos, reportaron diferencias con respecto la formación de crestas epiteliales. Los fibroblastos son células que determinan la síntesis y remodelación de proteínas de la matriz,

manteniendo la forma del tejido (49). Evidencia experimental sugiere que los fibroblastos dérmicos y sustitutos de piel secretan factores de crecimiento y citoquinas en combinaciones y concentraciones adecuadas para promover la eficiente reparación (50). Estos resultados sugieren que el tejido artificial estimula la formación de un tejido conectivo, que permite la regeneración epitelial (30). Las interacciones entre los queratinocitos y fibroblastos son fundamentales para el proceso de reepitelialización.

En los estudios en donde el tejido artificial fue injertado de forma subcutánea Novaes 2007, no se reportaron diferencias en el grosor, entre los grupos, esto puede estar relacionado con la no permanencia del tejido artificial, a diferencia de los injertos autólogos de tejido subepitelial, el cual si es integrado y aumenta el volumen del tejido. Igualmente, Borstein 2011, que utiliza un tejido artificial formado por queratinocitos y fibroblastos dérmicos, de forma subcutánea, reportan viabilidad del tejido a la cuarta semana, pero con la formación de calcificaciones, la permanencia del tejido artificial puede estar relacionado a un encapsulamiento, no interacciona con el tejido circundante, posiblemente por la presencia de queratinocitos en la submucosa oral.

El epitelio observado en todos los estudios, fue queratinizado. El proceso de queratinización en la mucosa oral está relacionado con la presencia o ausencia de fibras elásticas. En la mucosa alveolar, se encuentran en gran cantidad, mientras que en la mucosa masticatoria son escasas y dispersas (51). Adicionalmente, se ha observado la expresión de queratinas específicas para cada tipo de epitelio, queratinizado o no queratinizado. El epitelio no queratinizado de la mucosa alveolar, específicamente expresa K4/K13, mientras que en la mucosa queratinizada expresa K1/K10. Cambios en la presencia de elastina, fueron directamente relacionados con el cambio en la expresión de cada tipo de par de queratinas, independiente de la expresión inicial que presentará el tejido. Estudios previos relacionan una influencia de hallazgos fenotípicos del epitelio a expensas del tejido conectivo adyacente (52), además de importantes interacciones epitelio-mesenquima (53). Otros factores localizados en el tejido conectivo también influyen en la expresión de genes responsables de la heterogeneidad del tejido epitelial, incluyendo la Vitamina D<sub>3</sub>, Ca<sup>+2</sup>, Interferon  $\gamma$ , factores de crecimiento, integrinas, retinoides, entre otros (54).

Debido a que el proceso de queratinización, se evidencia aproximadamente, hacia la cuarta semana, durante la de reparación de la mucosa oral y es influenciado directamente por el origen del tejido de granulación (55), se podría cuestionar la influencia de las células injertadas en el tejido artificial, debido a la limitación en su permanencia en las fases tardías del proceso de reparación y esto dependería de las células que se encuentran en el lecho receptor. Sin embargo, el cambio en perfil de secreción de factores de crecimiento, durante las fases tempranas del proceso de reparación, conlleva a características diferentes en el tejido conectivo, relacionados con procesos de menor contracción tejido (44), por lo tanto sería importante evaluar su influencia durante la queratinización.

## **4.2 ESTUDIOS CLINICOS**

### **4.2.1. Aumento de encía queratinizada**

Debido a la heterogeneidad de estos estudios, se realizó un análisis independiente de acuerdo a la técnica quirúrgica y tipo de control empleado. En el estudio donde la técnica quirúrgica empleada fue fenestración perióstica, no hubo diferencia significativa entre el uso de tejido artificial o una herida control sin tratamiento. El hecho de que la inclusión del tejido artificial no presente mejores resultados, podría ser explicado debido a que la fenestración perióstica (56), compromete el aporte vascular gingival que se dirige en sentido apico-coronal y por consiguiente la revascularización necesaria para la viabilidad celular del tejido artificial y la cicatrización.

Por otra parte, la técnica quirúrgica colgajo desplazado apical/ vestibuloplastia, cuyo control fue un injerto gingival libre autólogo, evidenció con una diferencia estadísticamente significativa que el injerto gingival autólogo fue superior al tejido artificial. Un resultado similar fue observado en una revisión sistemática cuyo objetivo fue determinar el tratamiento más efectivo para el aumento de encía queratinizada (1). A pesar de que los resultados favorecen al injerto de tejido gingival libre autólogo, se debe tener en cuenta las limitaciones de su uso y la alta morbilidad asociada a un segundo sitio quirúrgico. Debido a estas condiciones, el uso de tejido artificial puede ser una alternativa de tratamiento, ya que todos los estudios incluidos en esta revisión, reportaron una ganancia de encía queratinizada y adicionalmente una menor morbilidad asociada a una zona donante, mayor

disponibilidad de tejido cuando el injerto autólogo es limitado al intervenir varias zonas o cuando son extensas (57). Además, el color, la textura y en general las características relacionadas con el bienestar del paciente fueron superiores con el uso del tejido artificial (58). En un estudio de este mismo autor (59), se estableció que el tratamiento es eficaz cuando tiene la habilidad de generar  $\geq 2\text{mm}$  de encía queratinizada en un periodo de 6 meses, y encontró un 95.3% de éxito al usar el tejido artificial. Aunque el tejido artificial no actúa como un injerto de tejido autólogo, mejora la calidad del tejido resultante, por consiguiente, permite la generación de un ancho clínicamente relevante con el mismo color y textura que el tejido adyacente.

Los hallazgos histológicos sugieren, que la inclusión del tejido artificial permite generar una organización similar al tejido original. Además, cuando se realizó el seguimiento de las células injertadas en el tejido artificial, se observó que no estaban presentes en el tejido formado. Esto demuestra que la actividad de las células del tejido artificial ocurre durante una fase temprana de la reparación. Lo cual concuerda con el estudio de Morelli 2011, donde se determinó la expresión de factores angiogénicos durante el proceso de reparación en procedimientos de aumento de encía queratinizada, éste reportó que durante los eventos tempranos, la expresión de biomarcadores angiogénicos es mayor en los sitios tratados con el tejido artificial comparado con los injertos de tejido autólogo (60). Por lo tanto, sugiere, que el tejido artificial modula el proceso de reparación por medio de las interacciones de los factores de crecimiento que regulan, entre otros procesos, la degradación y deposición de matriz extracelular.

Respecto a la composición del tejido artificial de los estudios evaluados en esta revisión se observó la diversidad que pueden presentar estos productos, respecto a la fuente de las células (autólogas o heterólogas, de piel o mucosa oral) y el tipo de células presentes (fibroblastos o queratinocitos), que sumado a las diferencias con respecto al soporte empleado, explican la heterogeneidad de los resultados encontrados. Mohammadi (2007), elaboró el tejido artificial a partir de fibroblastos gingivales autólogos en un soporte de colágeno bovino (61). Mientras que en estudios realizados por Mc Guire (2005, 2008, 2011), se han realizado varias modificaciones en cuanto a las características del tejido artificial. En el estudio publicado en el 2005, se elaboró el injerto a partir de fibroblastos de

prepucio de neonato, sobre un soporte de poligalactina (HF-DDS Living human fibroblast-derived dermal substitute, Dermagraft®)(57). En el estudio realizado en el 2008, se modificó el tejido artificial mediante la inclusión de queratinocitos alogénicos, convirtiéndose en un tejido organotípico y el soporte fue realizado con colágeno bovino tipo I (BCT Bilayered cell therapy)(58). Finalmente, en el 2011, se realizó un ensayo clínico controlado aleatorizado con este producto, cuyo nombre fue modificado a LLC (Living cellular construct), dentro de sus características se reporta la presencia de proteínas de matriz extracelular humana que son secretadas por las células de este tejido artificial. Aunque su mecanismo de acción no está establecido, se sugiere que se comporta diferente a un autoinjerto. El injerto de tejido autólogo, es vascularizado, se integra y persiste in situ, reteniendo las características del tejido original, a diferencia del tejido artificial, que a través de la modulación de los procesos de reparación permite una mejor cicatrización (59). Como puede observarse de los cuatro artículos discutidos anteriormente, de los cuales tres fueron realizados por Mc Guire et al. Este producto fue aprobado por la FDA en el año 2012 bajo el nombre de GINTUIT® (Organogénesis. USA) (39).

El mecanismo de acción de estos tejidos artificiales, está justificado por la colonización celular a la herida, angiogénesis y reepitelialización. Los fibroblastos y el colágeno secretado por estos en la herida, proveen un sustrato que promueve la migración de queratinocitos vecinos induciendo una reepitelialización. Por otra parte, secretan factores de crecimiento como factores angiogénicos VEGF (Factor de crecimiento endotelial), factores relacionados con el tejido conectivo, como TGF- $\beta$ 1 (Factor de crecimiento transformante beta -1) y factores relacionados con el tejido epitelial, como KGF (Factor de crecimiento de queratinocitos) (59).

La importancia del tipo celular empleado en el tejido artificial también ha sido estudiada. Izumi (2003), demostró que la presencia de queratinocitos en los tejidos artificiales, disminuye el tiempo de epitelialización en heridas realizadas en diferentes zonas de la mucosa oral. Sin embargo, el uso de fibroblastos, sin la presencia de queratinocitos, ha reportado también beneficios tanto en la epitelialización como en la queratinización, esto puede ser explicado debido a que el comportamiento del epitelio, depende del tejido conectivo adyacente, principalmente por características intrínsecas de los fibroblastos de la

zona y por la migración de células epiteliales del tejido circundante (55). Los fibroblastos presentan diferencias en la expresión de integrinas y en sus propiedades de adhesión, dependiendo de su origen, dérmico, gingival o del ligamento periodontal (62). Por lo tanto, el uso de fibroblastos preferiblemente de origen gingival, con un adecuado soporte, podría permitir un mejor proceso de epitelización y queratinización de la herida, sin embargo, se deben realizar más investigaciones al respecto.

#### **4.2.2. Cubrimiento Radicular**

Se encontraron 2 estudios que cumplieron los criterios de inclusión (Wilson 2005 y Jhaveri 2010) , en los cuales el objetivo del tratamiento fue el cubrimiento radicular, sin embargo, solamente dos variables pudieron ser comparadas, el porcentaje de cubrimiento radicular y el tamaño de la recesión. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados de la comparación entre el grupo control (injerto de tejido conectivo subepitelial) y el grupo experimental (injerto de tejido artificial) para estas dos variables. Otras variables no fueron comparables debido a que en algunos estudios no eran reportadas o se emplearon diferentes escalas de medición.

En el estudio realizado por Wilson y colaboradores 2005; el tejido artificial utilizado fue HF-DDS (Living human fibroblast-derived dermal substitute, Dermagraft®)(63). Mientras que en el estudio realizado por Jhaveri y colaboradores 2010; contenía fibroblastos autólogos gingivales en un soporte de matriz dérmica cadavérica acelular. (ADMA Acellular dermal matrix allograft. Alloderm®) (64).

La inclusión de tejidos artificiales para el cubrimiento radicular podría ser una alternativa para evitar el uso de injerto de tejido autólogo. De acuerdo a nuestro metanálisis, el hecho de que no existan diferencias estadísticamente significativas entre el uso de tejido conectivo autólogo y tejido artificial, muestra que este último tiene potencial para brindar los mismos beneficios que el tejido autólogo. Se ha observado que durante la fase de reparación, la interacción dinámica matriz extracelular – célula, es mediada principalmente por los fibroblastos que sintetizan la matriz extracelular y secretan citoquinas, quimoquinas y factores de crecimiento que intervienen en la formación de nuevo tejido (65). La inclusión



de un componente celular dentro de los tejidos artificiales, podría beneficiar la respuesta temprana de reparación. En uno de los estudios preclínicos analizados previamente (30), se sugiere que una respuesta inflamatoria temprana y transitoria podría contribuir en la regeneración de los tejidos blandos. Los efectos terapéuticos del tejido artificial, pueden ser mediados por un componente paracrino, que modula favorablemente la respuesta inmune, promueve el reclutamiento de células epiteliales y endoteliales y soporta una neovascularización del tejido de la mucosa (44).

Existe gran controversia acerca de cuál es el tratamiento más exitoso y predecible para lograr un cubrimiento radicular. Al respecto, existe una revisión sistemática de la literatura y meta-análisis (66), donde se concluyó que sin la combinación con otros tratamientos, el colgajo desplazado coronal es un método seguro y confiable para lograr una reducción de la recesión y con frecuencia un cubrimiento radicular completo. Sin embargo, también reportó que la combinación con el injerto de tejido conectivo subepitelial, mostró mejores resultados. El uso de tejido conectivo subepitelial presenta las mismas desventajas que el uso del injerto gingival libre para aumento de encía queratinizada (67). Cuando se realiza la técnica de un colgajo desplazado coronal, sin la inclusión del tejido autólogo es menos invasivo, requiere un menor tiempo quirúrgico y probablemente la habilidad quirúrgica por parte del operador puede ser menor, sin embargo los resultados relacionados con una cobertura radicular completa y estabilidad a largo plazo han sido reportados ser mejores con el uso del injerto autólogo. La razón biológica que puede explicar el mejor comportamiento al usar el tejido conectivo subepitelial, puede estar relacionada con la habilidad del injerto de integrarse gracias al suplemento vascular bilaminar, tanto desde el periostio como desde el colgajo, permitiendo la viabilidad del injerto sobre la superficie radicular. Esto logra un aumento del tejido, además de darle soporte y estabilidad (66). De la misma manera el tejido artificial podría interactuar con el lecho de la herida para mejorar el cubrimiento radicular. Clínicamente, evidenciado en los estudios incluidos en esta revisión, debido a que no existen diferencias significativas en el porcentaje de cubrimiento radicular y tamaño de la recesión. Por lo tanto el uso de estas nuevas alternativas de tratamiento podrían ser contempladas, pero existe la necesidad de realizar estudios con un seguimiento para realizar una comparación en cuanto al porcentaje de cubrimiento radicular completo y su estabilidad a largo plazo.

En un estudio in vitro, se evaluó el perfil de expresión de factores secretados por los fibroblastos en un tejido artificial, recreando las condiciones del lecho de la herida al ponerlo en contacto con un coágulo sanguíneo. Se observó que al entrar en contacto con éste, el tejido artificial cambia su perfil de secreción a uno proinflamatorio, con la expresión de factor IL-6 y IL-8 principalmente, citoquinas que han sido relacionadas con estadíos primarios de cicatrización, debido a que inducen quimiotaxis de células remodeladoras como neutrófilos, macrófagos, monocitos y linfocitos. Por otra parte, el perfil de secreción del tejido artificial antes de ser injertado, muestra que hay factores que estimulan la angiogénesis y modulan potencialmente la respuesta inflamatoria. La presencia de células viables, que persisten una vez se ha realizado el injerto, constituye un sistema de entrega de factores capaces de modular el proceso inflamatorio para beneficio del proceso de regeneración del área injertada (44). La regulación de esta respuesta puede mejorar el tiempo de cicatrización, además puede inducir que el tejido formado sea estructuralmente similar al tejido original, y más estable a través del tiempo. Esto demuestra que el tejido artificial actúa como un sistema bioactivo para liberar señales que modulan la respuesta inflamatoria y promueven la angiogénesis y epitelialización, sin inducir fibrosis. Similar a este comportamiento se ha observado que las células de sustitutos de tejido dérmico, parecen secretar factores de crecimiento y citoquinas en la concentración y combinación adecuada para inducir procesos regenerativos en lugar de reparativos (50).

Otra de las variables analizadas normalmente cuando se estudia el cubrimiento de recesiones, es el aumento de encía queratinizada. Sin embargo, los artículos incluidos en esta revisión no reportaron desviación estandar (Hiral 2010 -Wilson 2005) con respecto a las datos de esta variable, por lo cual no fue posible realizar un meta-análisis. A pesar que individualmente, estos estudios no reportaron diferencias significativas entre el grupo control (injerto autólogo) y el grupo experimental (tejido artificial), dos revisiones sistemáticas (Cairo 2008-Chambrone 2010), demostraron superioridad con respecto al aumento de encía queratinizada del injerto autólogo comparandolo con varias técnicas empleadas actualmente (4).

Se ha reportado que el proceso de queratinización de los epitelios está directamente regulado por el tejido conectivo, como se discutió anteriormente en la sección de ensayos

preclínicos (54). Esto sugiere que se debe elaborar un tejido artificial con fibroblastos que induzcan las características fenotípicas acordes al tejido en el cual va ser injertado.

## **5. Conclusion**

Los resultados de esta revisión, indican que independientemente del tipo de modelo animal y defecto, en cirugía periodontal, el uso de tejidos artificiales puede resultar en una mejor cicatrización. Todos los sustitutos evaluados fueron biocompatibles, ya que no presentaron efectos adversos, tales como reacciones inmunológicas (rechazo) o formación de abscesos.

No existen estudios pre clínicos o clínicos que reporten el uso de los sustitutos de mucosa oral en el área de implantología.

El uso de sustitutos artificiales no evidencian ventajas desde el punto de vista clínico con respecto al uso del injerto autólogo (Gold Standard). Sin embargo, desde el punto de vista histológico y molecular durante el proceso de cicatrización permiten evidenciar ciertos beneficios, dirigiendo a procesos regenerativos y no reparativos. Específicamente, la presencia de células y factores de crecimiento relacionados, durante fases tempranas, permiten una regulación de la respuesta y evita procesos no deseados durante el proceso de cicatrización, esto podría mejorar la estabilidad a largo plazo, ya que estructuralmente será más similar al tejido original.

## 6. Bibliografía

1. Thoma D., Benic´ G., Zwahlen M., Hämmerle C., Jung R. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009; 20 (Suppl. 4): 146–165.
2. Lindhe J. Lang N. karting T. Periodontología clínica e implantología odontológica. Quinta edición. Buenos Aires: Medica Panamericana.2009: 5-48.
3. Lang, N.P. Løe, H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. *Journal of Periodontology.*1972; 43: 623–627.
4. Chambrone L., Chambrone D., Pustiglioni F, Chambrone L., Lima L. Can subepithelial connective tissue grafts be considered the gold standard procedure in the treatment of Miller Class I and II recession-type defects?. *Journal of dentistry.* 2008; 36: 659–671.
5. Kim B. Kim Y., Yun P., DDS, Yi Y., Lee H., Kim S., Son J. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:e 24-e28.
6. Zigdon H. Machtei E. The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. *Clin. Oral Impl. Res.* 2008; 19: 387–392.
7. Rocuzzo M, Ramieri G, Bunino M, Berrone S. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: A controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 286-294.
8. Chaushu G. Mardinger O. Peleg M. Ghelfan O. Nissan J. Analysis of complications following Augmentation with cancellous block allografts. *J Periodontol.* 2010; 81:1759-1764.
9. Wang H. Boyapati I. “pass” principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent.* 2006;15: 8 –17.
10. Izumi, K., Feinberg, S. E., Terashi, H. Marcelo, C. L. Evaluation of transplanted tissue engineered oral mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice. *Tissue Eng.* 2003b; 9:163-74
11. Novaes A., Marchesan J. Macedo G., Palioto D. Effect of in vitro gingival fibroblast seeding on the vivo incorporation of acellular dermal matrix allografts in dogs. *J periodontal.*2007; 78: 296-303.
12. Langer R. Vacanti J. *Science.*1993;14: 260 (5110): 920-6.
13. Izumi, K. Feinberg, S. E. Skin and oral mucosal substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.*2002; 14:61-71.
14. Izumi, K., Feinberg, S. E., Jida, A. Yoshizawa, M. 2003a. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003a; 32:188-97.
15. Fontanilla M. Suesca E. Casadiegos. Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Editado: Universidad Coimbra. In press.
16. Moharamzadeh, K., Brook I. M., Van Noort R., Scutt A.M., Thornhill M.H. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res,* 2007. 86(2): 115-24.
17. Chung, J. H., Cho, K. H., Lee, D. y., Kwon, O. S., Sung, M. W., Kim, K. H. & Eun, H. C. Human oral bucal mucosa reconstructed on dermal substrates: a model for oral epithelial differentiation. *Arch Dermatol Res.* 1997; 289: 677-85.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

18. Cho, K. H., Ahn, H. T., Park, K. C., Chung, J. H., Kim, S. W., Sung, M. W., Kim, K. H., Chung, P. H., Eun, H.C. Youn, J. I. Reconstruction of human hard-palate mucosal epithelium on de-epidermized dermis. *J Dermatol Sci.* 2000; 22:117-24.
19. Izumi, K., Song, J., Feinberg, S. E. Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side. *Cells tissues organs.* 2004; 176: 134-52.
20. Sauerbier, S., Gutwald, R., Wiedmann-al-Ahmad, M., Iauer, G. & Schmelzeisen, R. Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 625-32.
21. Lauer, G. Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical Application. *J craniomaxillofac surg.* 1994; 22:18-22.
22. Vacanti, C.A., History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng.* 2006; 12(5): 1137-42.
23. Moharamzadeh K, Colley H, Murdoch C, Hearnden V, Chai WL, Brook IM, Thornhill MH, Macneil S. *J Dent Res.* 2012; Jul; 91(7):642-50
24. Rothamel D. Schwarz F. Sager M. Herten M. Sculean A. Becker J. Biodegradation of differently cross- linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin. Oral Impl. Res.* 2005; 16: 369–378.
25. Graves D., Nooh N., Gillen T., Davey M, Patel S., Cottrell D. AmarS. IL-1 Plays a Critical Role in Oral, But Not Dermal, Wound Healing. *J Immunol.* 2001; 167:5316-5320.
26. Kreis RW, Hoekstra MJ, Mackie DP, Vloermans AFPM, Hermans RP. Historical appraisal of the use of skin allografts in the treatment of extensive full thickness burns at the Red Cross Hospital Burns Centre, Beverwijk, The Netherlands. *Burns.* 1992; 18(Suppl 2): S19-S22.
27. Lamme EN, van Leeuwen RT, Jonker A, van Marle J, Middelkoop E. Living skin substitutes: survival and function of fibroblasts seeded in a dermal substitute in experimental wounds. *J Invest Dermatol.* 1998;111: 989–95.
28. Lamme EN, Van Leeuwen RT, Brandsma K, Van Marle J, Middelkoop E. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol* 2000;190:595–603.
29. Yoshizawa M., Koyama T., Kojima T., Kato H., Ono Y., Saito C. Keratinocytes of Tissue-Engineered Human Oral Mucosa Promote Re-Epithelialization After Intraoral Grafting in Athymic Mice. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70:1199-1214.
30. Espinosa L. Sosnik A. Fontanilla M. Development and Preclinical Evaluation of Acellular Collagen Scaffolding and Autologous Artificial Connective Tissue in the Regeneration of Oral Mucosa Wounds. *Tissue Engineering: Part A.* 2010; 16 (5).
31. Ueno H., Yamada H., Tanaka I. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials.* 1999; 20:1407- 1414.
32. Mizuno K, Yamamura K, Yano K,. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *J Biomed Mater Res A.* 2003;64:177-181.
33. Badylak S. Gilbert T. Immune Response to Biologic Scaffold Materials. *Semin Immunol.* 2008 April ; 20(2): 109–116 .
34. Wei PC, Laurell L, Geivelis M, Lingen MW, Maddalozzo D. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol* 2000; 71: 1297-1305.

35. Erdag G, Sheridan R. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns*. 2004;30 : 322–328.
36. Dale B., Salonen J., Jones A. New Approaches And Concepts in The Study of Differentiation of Oral Epithelia. *CROBM*. 1990; 1: 167
37. Bornstein M., Reichart P., Buser D., Bosshardt D. Tissue Response and Wound Healing After Placement of Two Types of Bioengineered Grafts Containing Vital Cells in Submucosal Maxillary Pouches: An Experimental Pilot Study in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac implatns*. 2011; 26:768–775.
38. Harris RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J Periodontol*. 2001;72: 932-938.
39. <http://www.gintutit.com>
40. Ophof R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW . Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate. *Eur J Orthod*. 2008; 30:1-9.
41. Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, et al: The expression and production of vascular endothelial growth factor in oral mucosa equivalents. *Int J Oral Maxillofac Surg*.2007; 36: 928.
42. Wong T., McGrath J.A., Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology* 2007; 156: 1149–1155.
43. Bauer SM, Bauer RJ, Liu Z-J et al. Vascular endothelial growth factor- C promotes vasculogenesis, angiogenesis and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. *J Vasc Surg*. 2005; 41:699–707
44. Fontanilla, M.R. and L.G. Espinosa, In vitro and in vivo assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft. *Tissue Eng Part A*, 2012; 18(17-18): 1857-66.
45. Szpaderska A. M., Walsh C. G., Steinberg M. J., Dipietro, L. A. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. *J Dent Res*. 2005; 84: 309-14.
46. Karande TS, Ong JL, Agrawal CM. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. 2004; *Ann Biomed Eng*; 32(12):1728-43.
47. Novosel E., Kleinhans C., Kluger P. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63 : 300–311.
48. Wong T., McGrath J.A., Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology*. 2007; 156: 1149–1155
49. Lekic P.C., Pender N., McCulloch C.A.G.. Is Fibroblast Heterogeneity Relevant To the Health, Diseases, and Treatments of Periodontal Tissues?. *Crit.Rev.Oral.Biol.Med*. 1997; 8 (3): 253-268.
50. Yamada, N., Uchinuma, E., Matsumoto, Y., and Kuroyanagi, Y. Comparative evaluation of re-epithelialization promoted by fresh or cryopreserved cultured dermal substitute. *J Artif Organs*. 2008; 11: 221.
51. Bourke KA, Haase ff, Li H. Daley T, Bartold P. Distribution and synthesis of elaslin in porcine gingiva and alveolar mucosa. *J Periodont Res*. 2000; 35: 361-368.
52. Karring, T., Lang, N. P., Loe, H., The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation, *J. Periodontal Res*. 1975; 10 (1).
53. Liu J., D. Mao J., Chen L. Epithelial–Mesenchymal Interactions as a Working Concept for Oral Mucosa Regeneration. *Tissue Engineering: Part B*. 2011; 17 (1).

54. Hsieh P-C, Jin Y-T, Chang C-W, Huang C-C, Liao S-C, Yuan K. Elastin in oral connective tissue modulates the keratinization of overlying epithelium. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 705–711.
55. Carranza FA, Carraro JJ. Effect of removal of peritum on post-operative result of mucogingival surgery. *J periodontol.* 1963;34:223-226.
56. Karring T, Cumming B, Oliver R, L e H. The Origin of Granulation Tissue and Its Impact on Postoperative Results of Mucogingival Surgery. *J Periodontol.* 1975.
57. McGuire MK, Nunn ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue- engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: A randomized controlled pilot study. *J Periodontol* 2005;76: 867-880.
58. McGuire MK, Scheyer ET, Nunn ME, Lavin PT. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol.* 2008; 79:1847-1856.
59. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, Neiva R, Cochran DL, Mellonig JT, et al. Living cellular construct for the treatment of mucogingival defects: results from a randomized, within-patient, controlled trial. *J Periodontol.* 2011.
60. Morelli T., Neiva R., Nevins M., McGuire M., Scheyer E., Oh T., Braun T., Nor J., Bates D., Giannobile W. Angiogenic Biomarkers and Healing of Living Cellular Constructs. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 456-462.
61. Mohammadi M, Shokrgozar MA, Mofid R . Culture of human gingival fibroblasts on a biodegradable scaffold and evaluation of its effect on attached gingiva: a randomized, controlled pilot study. *J Periodontol.* 2007; 78:1897-1903.
62. Papailogou A, Yukna R, Moses R, Lallier T. Gingival, dermal and periodontal ligament fibroblast express different extracellular Matrix receptors. *J Periodontol.* 2001: 798-807.
63. Wilson TG Jr., McGuire MK, Nunn ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. II. Comparison to the subepithelial connective tissue graft: A randomized controlled feasibility study. *J Periodontol.* 2005;76: 881-889.
64. Jhaveri H., Chavan M., Tomar G., Deshmukh V., Wani M., Miller P Jr. Acellular Dermal Matrix Seeded With Autologous Gingival Fibroblasts for the Treatment of Gingival Recession: A Proof-of-Concept Study. *J Periodontol.* 2010;81: 616-625.
65. Heber-katz E. Regenerative Properties in Mammals. *Wounds.* 2004; 16: 332-335.
66. Cairo F, Pagliaro U, Nieri M. Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35 (suppl.8):136-162
67. Gapski R, Allen Parks C, Wang H. Acellular Dermal Matrix for Mucogingival Surgery: A Meta-Analysis . *J Periodontol* 2005; 76:1814-1822
68. Chambrone L., Chambrone D., Pustiglioni F, Chambrone L., Lima L. Can subepithelial connective tissue grafts be considered the gold standard procedure in the treatment of Miller Class I and II recession-type defects?. *Journal of dentistry.* 2008 ; 36: 659–671

Código de campo cambiado



