

Recibido: 25 de enero del 2012 Aprobado: 17 de febrero del 2012

PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DE EQUIVALENTES EPITELIALES AUTÓLOGOS PARA LA RECUPERACIÓN DE UN DEFECTO DE FISURA PALATINA EN UN PACIENTE*

PRODUCTION AND APPLICATION OF AUTOLOGOUS EPITHELIAL EQUIVALENTS FOR THE RECOVERY OF CLEFT PALATE IN A PATIENT

Lina María Franco González,¹ Luz Marina Restrepo Múnera²

RESUMEN

Introducción: artículo de investigación derivado de la investigación "Producción de equivalentes de mucosa oral para pacientes de labio y paladar" realizada por el grupo "Ingeniería de tejidos y terapia celular" de la Universidad de Antioquia en el 2010. Una de las alteraciones más frecuentes en la cavidad oral son los defectos labio y paladar fisurado (CL/P). De acuerdo con la proporción del daño y con la extensión, los procedimientos quirúrgicos convencionales son parcialmente exitosos, debido principalmente a las deficiencias de tejido donante y a las estructuras adyacentes afectadas. Mediante la ingeniería tisular, numerosos investigadores han desarrollado equivalentes de mucosa oral que incrementan la disponibilidad de tejido para estos defectos. **Materiales y métodos:** su aplicación disminuye la morbilidad de los sitios donantes, y restablece la recuperación y función del tejido afectado. Dado que existe una alta frecuencia del CL/P, se propone desarrollar un equivalente de mucosa oral como alternativa terapéutica para los pacientes que padecen estos defectos. En este estudio, la producción de este sustituto se generó a partir de tejido autólogo. Se realizaron estudios para determinar las características que debe cumplir el equivalente para ser aplicado al paciente, a quien se le hizo seguimiento clínico periódico para evaluar su recuperación. **Resultados:** se observó una disminución del defecto con buen proceso de cicatrización, e histológicamente se vió la presencia de fibras colágenas como matriz de soporte. **Conclusiones:** con esta nueva alternativa terapéutica se pretende disminuir la morbilidad de los sitios donantes y aumentar la disponibilidad de tejido en corto tiempo para la rehabilitación de los pacientes.

Palabras clave: equivalente de mucosa oral, ingeniería de tejidos, labio y paladar fisurado.

ABSTRACT

Introduction: this research paper stems from the project entitled "Production of oral mucosae equivalents for cleft lip and palate patients" undertaken by the "Tissue engineering and cell therapy" research group of the Universidad de Antioquia. One of the most frequent alterations in the oral cavity is the cleft lip and palate (CL/P) defect. Depending on the proportion and extension of the damage, conventional surgical procedures are often only partially successful. The problems are mainly due to deficiencies of donor tissue and to adjacent, concerned structures. Through tissue engineering numerous researchers have developed oral mucosae equivalents that make more tissue available for the treatment of these defects. **Materials and methods:** the application of these substitutes reduces morbidity in donor sites, and reestablishes the recovery and functions of affected tissue. Due to the high frequency of CL/P, we propose to develop an autologous oral mucosa substitute as a therapeutic alternative for patients with these defects. In this study, we produced the substitute from autologous tissue. We conducted studies to determine the characteristics of the equivalent for it to meet the conditions to be applied to the patient, who underwent periodic clinical monitoring to assess recovery. **Results:** we observed a decrease in the defect with good cicatrization. On a histological level, we observed the presence of collagen fibers as a support matrix. **Conclusions:** with this new therapeutic alternative we mean to reduce the morbidity of donor sites and increase the availability of tissue in a short time for the rehabilitation of patients.

Keywords: oral mucous equivalent, tissue engineering, clef lip and palate.

Cómo citar este artículo: Franco González LM, Restrepo Múnera LM. Producción y aplicación de equivalentes epiteliales autólogos para la recuperación de un defecto de fisura palatina en un paciente. Revista Nacional de Odontología. 2012; 8(14): 17-23.

* Artículo de investigación derivado del proyecto de investigación "Producción de equivalentes de mucosa oral para pacientes de labio y paladar" realizado por el grupo "Ingeniería de tejidos y terapia celular" de la Universidad de Antioquia en el 2010.

¹ Odontóloga-Cirujana Oral Maxilofacial de la Universidad de Antioquia. Candidata a Magister en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquia. Profesora de Patología Oral y Cirugía Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Envigado. Correos electrónicos: lina.franco@campusucc.edu.co, linafrancog@yahoo.es

² Bióloga de la Universidad de Antioquia. Doctora en Ciencias de la Universidad de París. Profesora titular de la Universidad de Antioquia. Directora del grupo "Ingeniería de tejidos y terapia celular". Correo electrónico: grupoitc@yahoo.es

Introducción

El defecto CL/P es una de las malformaciones congénitas más prevalentes en recién nacidos caucásicos (1/400-1/2.000). Su etiología y bases moleculares aún no son claras ya que puede tener un origen oligogénico o radicar en interacciones genómico-ambientales;¹⁻³ ambas conllevan a alteraciones en el proceso de migración celular de las láminas embrionarias, que generan finalmente defectos anatómicos completos o parciales, como fisuras nasolabiales o labiopalatinas. En la mayoría de los casos, los defectos de tejido superan los 10 mm, tamaño desfavorable para los tratamientos quirúrgicos convencionales, que condiciona un mayor porcentaje de morbilidad de las zonas donadoras y una predicción incierta en los resultados. En las secuelas congénitas es indispensable conocer la cantidad de tejido disponible para determinar el tratamiento quirúrgico adecuado (diseño de colgajos desplazados, injertos libres de tejido conectivo, injertos óseos autólogos, injertos alogénicos, injertos microvascularizados,^{4, 5} o una combinación de ellos).

El pronóstico de la recuperación de la anatomía y función de las áreas comprometidas depende de las fuentes donadoras, la magnitud de la secuela y el número de reintervenciones necesarias para obtener un resultado satisfactorio. La zona más utilizada para obtener los injertos es el paladar, sin embargo, la poca elasticidad que posee y el hecho de que no cuenta con cantidad suficiente de tejido lo hace poco funcional como área donadora. A su vez, los injertos de piel podrían ser una fuente potencial de tejido donante,⁶ pero las diferencias en el color, la consistencia, en ocasiones el crecimiento de anexos (cabellos) y patrones de queratinización diferentes los hace poco útiles para este fin.^{7, 8}

No obstante, el gran desarrollo que ha tenido la ingeniería tisular en las dos últimas décadas ha llevado a la producción de diversos substitutos de mucosa oral para el tratamiento y reparación de las lesiones. Su mayor ventaja es la expansión, ya que a partir de una pequeña biopsia se puede incrementar de manera significativa el tamaño del tejido inicial en

un tiempo reducido (pocas semanas); se ha descrito una recuperación más estética y funcional del defecto y se puede obtener de mucosa oral autóloga.^{9, 10}

Materiales y métodos

Evaluación clínica

Hombre de 30 años de edad con historia de CLP y en protocolo de cirugía ortognática. Es remitido por Cirugía Oral y Maxilofacial para la evaluación de fisura palatina bilateral de aproximadamente 10 mm. Según el protocolo de Ortodoncia Prequirúrgica y Cirugía Maxilofacial, el paciente requiere procedimiento de osteotomía segmentaria, sin embargo, fue propuesto realizar antes de la cirugía un equivalente de mucosa oral para mejorar el pronóstico en el cierre de la fisura palatina.

Obtención de la biopsia

El protocolo clínico y quirúrgico fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Antioquia. Con anestesia local, se realizó una biopsia incisional de mucosa oral palatina (5 mm de longitud y 2 a 3 mm de espesor). Una parte se fijó y se incluyó en parafina para los estudios de histología, y el fragmento restante se procesó para la obtención de los cultivos primarios. Adicionalmente, se tomaron 30 ml de sangre periférica para extraer el plasma autólogo para la fabricación del gel de fibrina.

Procesamiento de la muestra y cultivo primario de queratinocitos y fibroblastos

La obtención de células de mucosa oral se realizó con tripsina/EDTA, y la determinación de viabilidad celular con azul de tripano. Se realizó la siembra de los cultivos primarios de queratinocitos orales sobre una capa alimentadora de fibroblastos 3T3-Swiss, previamente tratada con mitomicina C. Se usó como medio de cultivo DMEM suplementado (suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina y L-glutamina) y factores de crecimiento que promueven la proliferación de los queratinocitos. Simultáneamente, se realizó el cultivo de fibroblastos en medio del cultivo de DMEM suplementado. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y 99% HR (figura 1).

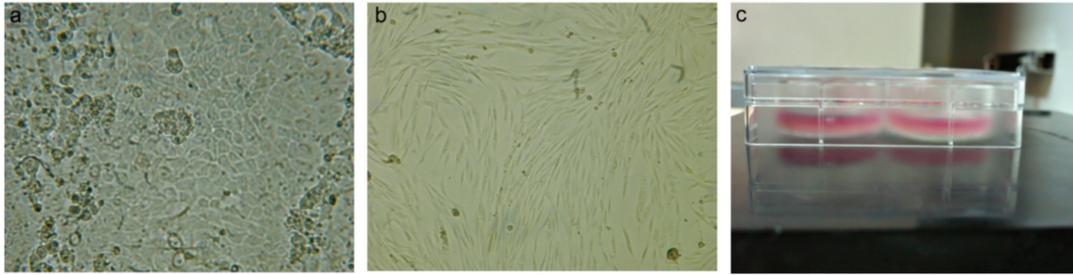


Figura 1. a) Colonia de queratinocitos sobre capa alimentadora de fibroblastos 3T3-Swiss previamente tratada con mitomicina C; b) cultivo de fibroblastos; c) equivalente de mucosa oral constituido por gel de fibrina-fibroblastos y queratinocitos

Fuente: fotografías tomadas en laboratorio GITTC con microscopio invertido con magnificación 10x

Producción del equivalente de mucosa oral

Posterior a la confluencia de los cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos, se procedió a realizar el equivalente de mucosa oral constituido por un gel de fibrina, al cual se le incluyeron los fibroblastos. Posteriormente, a las 24 horas se sembraron los queratinocitos sobre el gel de fibrina-fibroblastos y se incubaron durante 3 a 4 semanas, hasta obtener una monocapa de queratinocitos para su aplicación clínica (figura 1).

Histología-microscopía electrónica de barrido (SEM)

Al equivalente obtenido se le realizó un estudio histológico para observar tanto la morfología y distribución celular con la tinción con hematoxilina eosina (H&E), como la producción de colágeno mediante

las tinciones Van Gienson y tricrómico de Masson, y mediante los ensayos SEM se determinó la microestructura de los equivalentes de mucosa oral.

Aplicación del equivalente de mucosa oral autólogo

Con anestesia local, se realizó la preparación de la zona receptora del equivalente: se procedió a hacer una desepitelización de la mucosa adyacente. El equivalente se transportó sobre una malla no reabsorbible, y se posicionó con sutura Vicryl® 4-0 en la zona del defecto. Se indicó al paciente el uso de una placa de acetato para evitar contacto con la superficie dorsal lingual como método de protección de la función masticatoria (figura 2). Posteriormente, se realizaron las evaluaciones posoperatorias durante un periodo de 4 semanas.



Figura 2. a) Estado inicial del defecto de fisura palatina; b) equivalente de mucosa oral; c) desepitelización de la zona receptora; d) posicionamiento de equivalente de mucosa oral

Fuente: fotografías tomadas en laboratorio GITTC

Resultados

Se obtuvo un equivalente de mucosa oral constituido por una monocapa de queratinocitos distribuida uniformemente en el gel de fibrina y fibroblastos. La superficie externa del equivalente de mucosa oral se dispuso en la malla de transporte de tal manera que los queratinocitos quedaran externamente para dar una estructura similar al epitelio adyacente.

Para el posoperatorio de la aplicación del equivalente de mucosa oral, se observó a los tres días un proceso inflamatorio adyacente a la zona quirúrgica, sin signos de infección. La actividad masticatoria y de deglución fue normal y se reportó un menor compromiso de la fonación nasal con una mejoría

cercana al 80%. A los 8 días se retiró parcialmente la malla que transportaba el equivalente y se observó un tejido eritematoso y un cierre parcial de la fisura palatina, sin reacciones adversas. Posteriormente, se realizó una evaluación a los 6 meses para observar si existían cambios en la comunicación oro-nasal; en esta se vio que el paciente presentó una disminución del tamaño de la fisura palatina por una contracción durante la fase tardía de cicatrización. Según la evaluación clínica maxilofacial, al paciente no se le realizaron otras aplicaciones debido a que se realizaría posteriormente una osteotomía segmentaria, la cual permitiría un movimiento que ayudaría al cierre total de la fisura palatina y a la corrección de la maloclusión presente (figura 3).



Figura 3. Evolución del proceso de cicatrización del equivalente de mucosa oral tres días posoperatorios con disminución de la fisura palatina. A los 6 meses se observa contracción en 30%

Fuente: fotografías tomadas en laboratorio GITC

En relación con los estudios histológicos del equivalente de mucosa oral, se observó que este estaba constituido principalmente por fibroblastos y una matriz rica en colágeno determinada con las tinciones de Van Gienson y tricromico de Masson, en la que se observó la distribución uniforme de las fibras colágenas (figura 4). En el ensayo de SEM se observó la microestructura del gel de fibrina, caracterizada por celdillas, sitios posibles de alojamiento de los fibroblastos.

Discusión

A la fecha, los estudios de implantes de equivalentes de mucosa oral en modelos animales con defectos en el paladar¹¹ han demostrado que dichos equivalentes inducen un proceso de regeneración y desarrollan

características histológicas similares al tejido de origen: 1) capa basal con células cuboidales y columnares, que posteriormente realizan un proceso de estratificación similar al epitelio normal; 2) lámina propia con red de fibras colágenas laxas y densas; 3) submucosa con presencia del sistema vascular, nervioso y fibras de elastina que también están presentes en las paredes de los vasos sanguíneos; 4) mucoperiostio que se une al hueso palatino por fibras de Sharpey y que contiene algunos osteoclastos.¹¹ Además, los equivalentes de mucosa oral formados con componentes celulares como fibroblastos o queratinocitos secretan varias citoquinas (IL6, IL8, IL1 α), proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento (EGF, FGF, VEGF), que intervienen de manera activa en los procesos de proliferación, migración, diferenciación, adherencia de

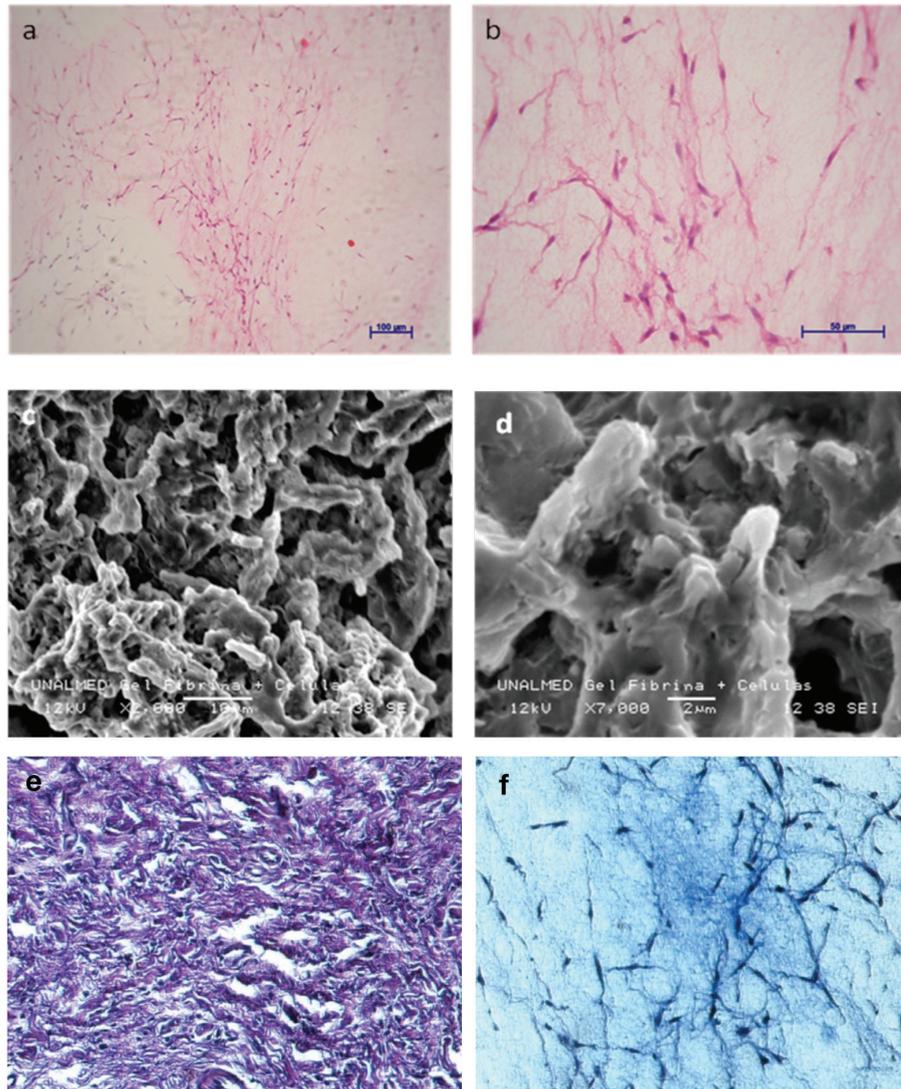


Figura 4. a) Corte histológico de equivalente de mucosa oral, 20 días de cultivo, constituido por fibroblastos y una matriz de colágeno de 100 μm ; b) magnificación de corte histológico 50 μm ; c) microscopía electrónica de barrido en gel fibrina y fibroblastos 10 μm , en el que se observan microcavidades que sirven de nichos para las células sembradas; d) microscopía electrónica de barrido de gel de fibrina-fibroblastos 2 μm , en el que se observan las cavidades que alojan los fibroblastos; e) corte histológico de equivalente de mucosa oral con tinción Van Gieson que determina la cantidad de fibras colágenas del equivalente; f) corte histológico con tinción de tricrómico de Masson que revela la producción de matriz colágena por los fibroblastos

Fuente: fotografías tomadas en laboratorio GITC

las células epiteliales, cicatrización y promoción de la angiogénesis, lo que conduce a la pronta regeneración celular.^{12, 13} Los hallazgos obtenidos en este estudio sugieren la dificultad de obtener *in vitro* una conformación de lámina basal identificable en el equivalente de mucosa oral; adicionalmente, se espera que *in vivo* el microambiente, aporte sanguíneo y citoquinas puedan

determinar el proceso de estratificación del equivalente de mucosa oral durante el proceso de integración al epitelio adyacente.

El uso de equivalentes en la cirugía reconstructiva de la mucosa intraoral ha sido sugerido para diferentes padecimientos, como secuelas congénitas, traumáticas o tumorales. Entre los substitutos orales usados

con mayor frecuencia se encuentran: 1) láminas de queratinocitos, pero su fragilidad, por la ausencia del componente dérmico, dificulta su aplicación e incorporación.¹⁴ 2) Bicapas artificiales de dermis que consisten en láminas de biocompuestos (colágeno bovino tipo I, proteoglicanos como el condroitin-6-sulfato y glicosaminoglicanos); en estas dos se presenta pérdida de la superficie por contracción de la lámina, y su papel es solamente de soporte.^{15, 16} 3) Substitutos híbridos de mucosa oral que consisten en una capa de epitelio y una capa de dermis.^{9, 17, 18} Este tipo de substitutos son los ideales ya que al contener los dos elementos, epitelio (queratinocitos) y dermis (fibroblastos), sintetizan proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento similares a los secretados in vivo, favoreciendo significativamente la regeneración; además, superan las desventajas de los equivalentes mencionados. Diversos grupos han logrado una aplicación clínica exitosa de substitutos híbridos de mucosa oral en cirugía periimplantaría, preprotésica^{19, 20} y vestibuloplastias,²¹ demostrando la reconstrucción de pequeños defectos en periodos cortos de tiempo (entre 7 días y 3 meses).²⁰⁻²⁴

A su vez, los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que durante el periodo de regeneración se observa una secuencia y un orden topográfico en la aparición de marcadores extracelulares (proteínas de matriz extracelular) e intracelulares (citoqueratinas), con un patrón de distribución similar al que se describe en la mucosa oral.²⁴ En los pacientes con secuelas de CL/P, los equivalentes de mucosa oral pueden brindar una buena oportunidad para el proceso de regeneración del tejido faltante, además de diferentes aplicaciones según la necesidad y propósito de reconstrucción. Esto sugiere que es un proceso que tiene buena disponibilidad de tejidos según las necesidades del tratamiento, no requiere una nueva toma de biopsia ya que se tiene un banco de células disponibles para una nueva aplicación y es un procedimiento mínimamente invasivo.

Referencias

- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15: 270-8.

- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 Spec N.º 1: R73-R81.
- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002; 61: 248-256.
- Hillerup S, Hjorting-Hansen E, Schwartz O. Reconstruction of alveolar process in a cases of cleft lip, jaw and palate. *Tandlaegebladet.* 1985; 89: 511-3.
- Hillerup S, Hjorting-Hansen E, Dahl E. Maxillary surgery in cleft palate reconstruction. Surgical reconstruction of teeth, mouth and jaws in cleft lip and cleft palate. *Ugeskr Laeger.* 1987; 149: 1521-5.
- Langdon J, Williams DM, Navsaria H, Leigh IM. Autologous keratinocyte grafting: a new technique for intra-oral reconstruction. *Br Dent J.* 1991; 171: 87-90.
- Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 32: 188-97.
- Kinikoglu B, Auxenfans C, Pierrillas P, Justin V, Breton P, Burillon C *et al.* Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent. *Biomaterials.* 2009; 30: 6418-25.
- Izumi K, Takacs G, Terashi H, Feinberg SE. Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 57: 571-7.
- Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59: 169-75.
- 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.
- Gonzalez S, Junquera L, Peña I García V, Gallego L, García E *et al.* In vitro culture with collagen and human fibroblasts of a full-thickness oral mucosa equivalent. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2009; 31: 98-106.
- Hotta T, Yokoo S, Terashi H, Komori T. Clinical and histopathological analysis of healing process of intraoral reconstruction with ex vivo produced oral mucosa equivalent. *Kobe J Med Sci.* 2007; 53: 1-14.
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975; 6: 331-43.

15. Saddiq ZA, Barbenel JC, Grant MH. The mechanical strength of collagen gels containing glycosaminoglycans and populated with fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 89: 697-706.
16. Ho G, Barbenel J, Grant MH. Effect of low-level laser treatment of tissue-engineered skin substitutes: contraction of collagen lattices. *J Biomed Opt J Biomed Opt*. 2009; 14: 034002 doi: 10.1117/1.3127201.
17. Ueda M, Ebata K, Kaneda T. In vitro fabrication of bioartificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: basic research and clinical application. *Ann Plast Surg*. 1991; 27: 540-9.
18. 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 Endod*. 1998; 86: 393-400.
19. Lauer G, Otten JE, von Specht BU, Schilli W. Cultured gingival epithelium. A possible suitable material for pre-prosthetic surgery. *J Craniomaxillofac Surg*. 1994; 22: 18-22.
20. Bodner L, Grossman N. The use of cultured mucosal graft for preprosthetic surgery. *Refuat Hapeh Vehashinayim*. 2001; 18: 32-4.
21. Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blaauw EH, Witjes MJ, Vissink A. Use of cultured mucosal grafts to cover defects caused by vestibuloplasty: an in vivo study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 53: 872-8.
22. Lauer G. Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical application. *J Craniomaxillofac Surg*. 1994; 22: 18-22.
23. Bodner L, Grossman N. Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: a clinical study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61: 169-73.
24. 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: 798-805.