Estudio del incremento del tejido gingival tras la inserción de una matriz biocompatible: modelo experimental en minipig.

Joan Soliva Garriga

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO DEL INCREMENTO DEL TEJIDO GINGIVAL TRAS LA INSERCIÓN DE UNA MATRIZ BIOCOMPATIBLE:

MODELO EXPERIMENTAL EN MINIPIG

JOAN SOLIVA GARRIGA

Departament d'Odontologia Restauradora

Facultat d'Odontologia

Universitat Internacional de Catalunya.

Directores: Dra. Anna Puigdemont Rodríguez

Dr. Miquel Roig Cayón

La Dra. ANNA PUIGDEMONT RODRIGUEZ catedrática del Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona y el Dr. MIGUEL ROIG CAYON, catedrático de Odontología Restauradora de la Facultad de Odontología de la Universitat Internacional de Catalunya,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Estudio del incremento del tejido gingival trás la inserción de una biomatriz compatible: modelo experimental en minipig”, presentado por el licenciado JOAN SOLIVA GARRIGA para la obtención del título de Doctor en Odontología, se ha realizado bajo nuestra dirección y considerado satisfactoriamente finalizado, autorizamos su presentación para que pueda ser evaluado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente en Barcelona a 31 de Mayo del 2017

Firmado: Dra. Anna PUIGDEMONT RODRIGUEZ Dr. Miguel ROIG CAYON

A veces sentimos que lo que hacemos

Es tan solo una gota en el mar,

Pero el mar sería menos mar

Si le faltara esa gota

Madre Teresa de Calcuta.

Agradecimientos

Agradecimientos:

En un momento trascedente de mi vida, al presentar mi tesis doctoral, con ya una larga, quizás excesiva, trayectoria profesional y docente a mis espaldas me resulta muy emotivo, pero no muy difícil el hecho de enfrentarme a un papel que pone agradecimientos. Porque una trayectoria dilatada en el tiempo, comporta una lista muy larga de hechos y personas que merecen figurar, y con letras grandes, en el capítulo de agradecimientos. Cualquier meta alcanzada nunca es el resultado del esfuerzo de una sola persona sino la confluencia de múltiples caminos, de la ayuda, la amistad y el compañerismo de muchísima gente y por este motivo me causa gran satisfacción mirar hacia atrás, ver un trabajo terminado y pensar que todo ha sido el resultado de muchos esfuerzos, que esta vez y a través mío, se han materializado en este estudio.

Quiero empezar agradeciendo de forma muy sincera a mis directores. Ambos me han hecho sentir especial. Sin ellos no habría ni empezado. A Anna Puigdemont, una gran catedrática en la Facultad de Veterinaria, incansable y con una profesionalidad y un cariño que son difíciles de olvidar e imposibles de no mencionar. A Miquel Roig, otro gran catedrático, que siempre me ha apoyado, me ha convencido y me ha impulsado a realizar la tesis y creo que es difícil convencer a un veterano. Ambos, grandes maestros en los que uno encuentra siempre un referente al que seguir.

En la lista de agradecimientos quiero que figuren en primer lugar mis padres, que han sido totalmente decisivos en mi forma de ser, de afrontar la vida, responsables de mis ganas de vivir, de aprender y de luchar.

A mi familia, mi esposa Montse, con muchos años a mi lado, conviviendo y trabajando juntos. Ya hemos alcanzado grandes metas de las que estar muy orgulloso y con la confianza de seguir alcanzado otras muchas más que el futuro nos vaya

deparando. Y, además, ha soportado pacientemente todas las horas robadas por la dedicación que ha supuesto la realización de este trabajo. A mis hijos, primero por ser como son, pero más detalladamente conviene resaltar a mi hijo Joan que me ayudó en el tratamiento matemático de los resultados y a mi hija Laia que ha colaborado decisivamente en la realización de este trabajo, desde la asistencia a las cirugías hasta la paginación y el diseño del trabajo.

A todo el personal de mi consulta que ha contribuido a mi realización profesional y que han aportado su granito de arena clasificando fotografías y vaciando modelos. Pero quiero mencionar de forma especial, a Maite y Raquel, que llevan a mi lado desde mis inicios en la odontología hasta ahora, que llega a un punto culminante con este trabajo. Suyos han sido mis éxitos y fracasos y por supuesto, este trabajo también es en parte suyo.

A mis amigos que siempre han estado allí y le han dado una dimension muy especial a mi vida y que, a pesar de llevar muchos años a mi lado, han comprendido y aceptado que les haya cambiado temporalmente por una tesis.

A mis compañeros en la UIC que han colaborado en mi desarrollo profesional. A todos los profesores del departamento de Prótesis y Restauradora. Quiero mencionar a Luis Jané, que aparece del silencio y consigue redimensionar el concepto de amistad.

Quiero mencionar la excelencia profesional que he podido observar durante mis estancias en la Facultad de Veterinaria de la UAB. Agradecer sinceramente, a todo el personal de la Clínica Veterinaria, del quirófano y del estabulario, el buen trato profesional y el cariño dado tanto a mi persona como también al *minipig*.

A la Dra. Laura Ramió por su colaboración en el diseño y elaboración de los estudios *in vitro*.

A la Dra. Dolors Fondevila par su colaboración en el análisis e interpretación de todas las muestras histológicas.

A Odontecnic, a Joan Golobart y Armando, y también a Borja Baldrich, de la UIC, que han colaborado en la realización de los estudios volumétricos.

A Histocell, empresa propietaria de Neofibrina, que ha propuesto este estudio y ha colaborado de forma determinante en su ejecución.

En fin, tengo mucho que agradecer, principalmente cuando miras hacia atrás y ves que todo lo que haces y todo lo que eres, lleva la energía, el compromiso e incluso la obstinación de muchas personas que te han acompañado en algún momento u otro de tu vida y en mi caso esto es una lista larguísima, a todos ellos, mi sincero agradecimiento.

Indice de contenidos

Indice de Contenidos

Lista de abreviaturas....17

ABSTRACT....23

1.- Introducción....29

2.- Justificación y marco teórico....35

2.1.- Cambios volumétricos secundarios a la extracción dental. 35

2.2.- Necesidad de compensar las pérdidas volumétricas producidas por las extracciones dentales 37

2.2.1.- Preservación alveolar 38

2.2.2.- Aumento de partes blandas.... 39

2.3.- Implante inmediato.... 40

2.3.1.- Resultados estéticos de los implantes 42

2.3.2.- Necesidad de protocolos para optimizar los resultados estéticos de los implantes 46

2.4.- Bioingeniería de la mucosa oral 48

2.4.1.- Antecedentes.... 48

2.4.2.- Geles de fibrina-agarosa 50

2.4.3.- Biomatrices en odontología 48

2.4.3.1.- Matriz dérmica acelular 48

2.4.3.2.- Matriz porcina de colágeno 49

2.5.- Modelos experimentales en animales 57

2.6.- Métodos para cuantificar las variaciones volumétricas. 58

3.- Hipótesis 63

3.1.- Hipótesis nula 63

3.2 Hipótesis alternativa.... 63

4.- Objetivos 67

4.1.- Objetivo principal 67

4.2. Objetivos secundarios 67

5.- Material y métodos 71

5.1.- Materiales del estudio 71

5.1.1.- Biomatriz 71
5.1.2.- Animal 71
5.2.- Estudios in vitro con Neofibrina. 71
5.2.1.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos 72
5.2.2.- Viabilidad celular 72
5.2.3.- Estudio de la penetración de los fibroblastos en una matriz de fibrina agarosa 73
5.3.- Estudios in vivo: protocolo experimental 74
5.4.- Protocolo de toma de registros 80
5.5.- Metodologia para valorar la eficacia del injerto para aumentar el grosor del tejido gingival 84
5.5.1.- Análisis volumétricos 84
5.5.2.- Análisis histológico 87
6.- Resultados 91
6.1.- Resultados in vitro de la biomatriz 71
6.1.1.- Estudios de permeabilidad de la Neofribrina® a los fibroblastos 71
6.1.1.1.- Resultados histológicos del estudio de la biomatriz de Neofibrina…. 86
6.1.1.2.- Resultados histológicos de los cultivos de fibroblastos en la biomatriz de Neofibrina 88
6.2.- Resultados del procedimiento quirúrgico. 88
6.3.- Resultados volumétricos 90
6.3.1.- Incremento de volumen entre T0 yT15 93
6.3.2.- Incremento de volumen entre T15 y T45 96
6.3.3.- Incremento de volumen entre T45 y T90 100
6.4.- Resultados histológicos 104
6.4.1.- Histología zona control 104
6.4.2.- Histología de la zona 1 106
6.4.3.- Histología de la zona 2 109
6.4.4.- Histología de la zona 3 111
6.4.5.- Histología de la zona 4 113
6.4.6.- Histología de la zona 5 115
7.- Discusión 129
7.1.- Selección de la biomatriz 129

7.2.- Valoración de la selección del animal de experimentación 130

7.3.- Valoración de los resultados quirúrgicos 131

7.4.- Valoración de los resultados volumétricos 133

7.5.- Valoración de los resultados histológicos 137

7.6.- Valoración global de los resultados 138

8.- Limitaciones del estudio 143

9.- Perspectivas de futuro 147

10.- Conclusiones. 151

11.- Bibliografía 155

Listado de abreviaturas

LISTADO DE ABREVIATURAS:

MFA	Matriz de fibrina-agarosa
CRA	Colgajo de reposición apical
CRA/V	Colgajo de reposición apical con vestibulopastia
V-VP	Vestibuloplastia
MC	Matriz de colágeno
MDA	Matriz dérmica acelular
PDGF	Factores de crecimiento derivados de las plaquetas
T0	Fase previa al estudio
T15	Tiempo de 15 días tras el injerto
T45	Tiempo de 45 días tras el injerto
T90	Tiempo de 90 días tras el injerto
H&E	Tinción deHematoxilina-Eosina

Abstract

Abstract

El rápido desarrollo de la implantología, que nos permite reponer dientes ausentes mediante prótesis retenidas por implantes osteointegrados, ha provocado que cada vez más se abran nuevos retos y uno de los desafíos a los que actualmente se enfrenta la odontología es conseguir buenos resultados estéticos en las prótesis sobre implantes. El principal problema estético radica en la reabsorción de los tejidos blandos secundarios a las extracciones dentales que comporta una posición más apical de la encía al reponer el diente.

Para conseguir mejores resultados, se recurre a injertos de tejido conectivo procedente del propio paciente para engrosar el tejido gingival y de este modo mejorar el resultado estético de nuestras prótesis. Sin embargo, a fin de poder evitar el tener que recurrir a extraer el injerto del paladar se están evaluando y perfeccionando diferentes biomatrices.

Para este trabajo se ha diseñado un modelo experimental en *minipig* para determinar si la matriz de fibrina-agarosa, que se ha utilizado en diferentes indicaciones en cirugía reparativa de la piel y del tejido gingival, puede provocar aumentos de grosor del tejido gingival.

En primer lugar, se han realizado estudios *in vitro* para valorar el comportamiento de la matriz al ser introducida en un cultivo de fibroblastos y poder determinar la capacidad de penetración de las células en su interior y se comprueba que presenta un efecto membrana que bloquea el paso de los fibroblastos en su interior.

Posteriormente se ha realizado un estudio en un modelo animal, injertando la biomatriz dentro del tejido gingival del animal para determinar su histocompatibilidad y su capacidad de aumentar el grosor del tejido conectivo. El aumento de grosor se ha analizado mediante el estudio volumétrico del tejido gingival, durante 3 meses de seguimiento. En los resultados se observa que la matriz provoca un aumento de grosor en la fase inicial del injerto que se mantiene durante el tiempo del estudio.

Todas las muestras obtenidas han sido analizadas histológicamente para determinar su histocompatibilidad y la calidad del tejido conectivo obtenido. Los resultados histológicos demuestran una ausencia prácticamente total de

manifestaciones inflamatorias y un tejido conectivo resultante de aspecto maduro y bien organizado.

A tenor de este estudio piloto, se abren unas nuevas perspectivas para realizar futuras investigaciones con este material para poder obtener una buena matriz que nos permita incrementar el volumen del tejido gingival sin necesidad de recurrir a injertos autólogos.

Introducción

1.- Introducción

La ingeniería tisular en particular, y la biomedicina en general, están cambiando profundamente toda la medicina y está en la base de gran parte de los avances experimentados estos últimos tiempos. El conocimiento cada vez más profundo de los procesos moleculares que determinan los cambios tisulares y la posibilidad de poderlos realizar en un laboratorio, ha abierto un ingente campo de posibilidades en el tratamiento de muchas situaciones patológicas.

La odontología también está experimentando cambios muy importantes debidos a los avances tecnológicos. Se disponen de imágenes en 3D, cada vez de mejor calidad, que permiten comprender mejor el desarrollo de diferentes entidades patológicas y planificar mejor los tratamientos. Se pueden diseñar prótesis totalmente individualizadas según las necesidades de cada paciente y se dispone de materiales cada vez más biocompatibles y estéticos que mejoran la calidad y duración de nuestros tratamientos.

Hace a casi 50 años que apareció la implantología (Branemark PI y cols. 1969), que es la parte de la odontología que procura la reposición de dientes ausentes mediante prótesis retenidas por implantes osteointegrados. La aparición de la implantología ha cambiado la odontología de forma muy importante ya que ha abierto muchas posibilidades a la restauración protésica. Los procesos biológicos que rigen la implantología son cada vez más conocidos y han permitido que esta especialidad evolucione de forma muy rápida. Pero este desarrollo también ha mostrado las diferencias entre el diente natural y el diente repuesto protésicamente. El implante se coloca en espacios que van a cicatrizar o que ya han cicatrizado secundariamente a extracciones dentarias. Secundariamente a las extracciones dentales, se produce una reducción volumétrica de la cresta ósea residual y esta reducción compromete estéticamente y funcionalmente la restauración protésica del diente ausente.

Para compensar esta reducción volumétrica se han propuesto múltiples tratamientos, tanto de preservación como de regeneración ósea, pero a pesar de obtener buenos resultados no se consigue una evolución predecible y estable en el tiempo. Otra posibilidad terapéutica muy útil en muchos tratamientos y que nos permite compensar estas pérdidas de volumen, es el aumento de grosor de partes blandas. Este engrosamiento gingival se consigue mediante injertos de tejido conectivo El tratamiento estándar se realiza a partir de tejido conectivo del propio

paciente, por lo que es necesario recurrir a una zona donante, ya sea el paladar o la zona de la tuberosidad retromolar. Este tipo de tratamiento consigue resultados satisfactorios, pero plantea problemas de morbilidad en la zona donante y de limitación del tamaño del injerto. Por estos motivos y para simplificar la técnica quirúrgica se han propuesto diferentes biomateriales que nos permitan realizar intervenciones para aumentar el volumen de las partes blandas sin que sea necesario recurrir a zonas donantes del propio paciente.

Se están utilizando matrices dérmicas para poder conseguir estos objetivos. Estos biomateriales también han sido empleados en diferentes indicaciones de tratamientos periodontales.

El desarrollo de estas biomatrices es un proceso altamente complejo. Es el resultado de una multitud de trabajos y colaboraciones entre especialistas de muy diversas áreas.

Es necesario un trabajo previo de laboratorio en el que se desarrolla un producto con las características mecánicas y de biocompatibilidad óptimas. A partir de aquí, se debe estudiar su idoneidad in vitro. Posteriormente entra en fase de experimentación animal donde van a trabajar en equipo veterinarios, bioingenieros, odontólogos, anatomopatólogos e informáticos. Finalmente se pasará a la fase de investigación clínica, en la que volverá a ser necesario reunir un equipo complejo de profesionales para la realización de los estudios.

Debido a la gran complejidad que representan los estudios de desarrollo de un nuevo biomaterial, es de vital importancia la puesta a punto de modelos experimentales y el desarrollo de protocolos actualizados que permitan reproducir la pauta experimental, así como la correcta evaluación de los resultados.

La experimentación animal nos permite desarrollar y mejorar los productos que nacen de la investigación primaria en el laboratorio, pero es fundamental establecer modelos de experimentación adecuados para poder obtener resultados fiables y comparables a los de otros estudios.

Es en este ámbito en el que se plantea la realización de este trabajo. Dentro del campo de desarrollo de una matriz dérmica denominada Neofibrina®, matriz de base fibrina-agarosa. Se cree que esta biomatriz pueda tener sus indicaciones en odontología, motivo por el cual se desarrolla un protocolo de experimentación animal

que permite valorar la eficacia de una biomatriz en el desarrollo de aumentos volumétricos de un tejido gingival y en el análisis de la calidad del tejido resultante.

Justificación y marco teórico

2.- Justificación y marco teórico

La pérdida de dientes ocasiona múltiples trastornos en el mantenimiento de una buena salud de la dentición. La ausencia de una pieza dental cambia la forma de masticar, se pierden los puntos de contacto de los dientes adyacentes, puede haber extrusión del diente antagonista y reduce la eficiencia masticatoria. De forma adicional la pérdida dental ocasiona una sucesión de fenómenos biológicos que provocan cambios significativos en todo el sistema estomatognático (Gerrisen y cols. 2010). Por estos motivos siempre ha resultado un reto importante para la odontología reponer adecuadamente los dientes ausentes.

2.1.- Cambios volumétricos secundarios a la extracción dental.

Conocemos que la extracción dental provoca cambios en el hueso alveolar desde los primeros estudios de Araujo y Lindhe (2005) y Cardaropoli y cols. (2003 y 2005) realizados en perros, en los que describieron como la extracción dental conlleva una reabsorción tisular que provoca unos cambios dimensionales importantes en la cresta ósea. La cicatrización alveolar secundaria a una extracción dental se realiza en distintas fases. En un primer momento, el alveolo se rellena con un coágulo, luego éste es reemplazado por una matriz de tejido conectivo. Posteriormente empieza una diferenciación en tejido óseo hasta su maduración en hueso lamelar y médula ósea, formando una cortical y una esponjosa. De todos estos trabajos se demuestra que la extracción dental produce unas alteraciones marcadas en la cresta residual con una disminución evidente del volumen del proceso alveolar.

Schropp y cols (2003) estudiaron en humanos la evolución de los sitios a los que se les ha realizado una extracción dental, con mediciones clínicas y radiográficas a los 3, 6 y 12 meses. Las mediciones clínicas se realizaron sobre modelos con un calibrador digital. En este estudio demostraron que los cambios más importantes se producen durante el primer año post-extracción. La anchura del proceso alveolar se reduce aproximadamente un 50% durante el tiempo de observación, y se puede decir que esto corresponde en mm, a una pérdida de 5-7 mm. Los dos tercios de toda la reabsorción se produce en los 3 primeros meses post-extracción.

Figura 1. Imagenes en que se observa la reabsorción horizontal y vertical secundaria a la extracción de un diente.

Posteriormente ha habido muchos artículos realizando mediciones. Van der Weijden y cols. (2009) realizaron una revisión sistemática y obtuvieron los siguientes resultados: la media de reducción de anchura de la cresta alveolar fue de 3.87 mm, la pérdida de altura en la zona media vestibular fue de 1.67 mm. A nivel radiográfico la media de reducción de altura de la cresta fue de 1.53 mm.

Tan y cols. (2012) realizaron otra revisión sistemática y obtuvieron resultados parecidos: en el tejido duro la reducción horizontal fue de 3.79 ± 0.23 mm y la vertical de 1.24 ± 0.11 en zona media vestibular, 0.84 ± 0.62 en mesial y 0.80 ± 0.71 en distal a los 6 meses. En porcentaje estos resultados son: una pérdida vertical de entre 11-22% y una pérdida horizontal de 29-63%. A los 3 meses la pérdida horizontal fue de media del 32 %.

A tenor de estos resultados podemos concluir que después de una extracción dental se produce una cicatrización de los tejidos duros y blandos que conlleva una pérdida volumétrica que ocurre durante el primer año, principalmente durante los 3 primeros meses. Esta pérdida es más acusada en anchura que en altura.

2.2.- Necesidad de compensar las pérdidas volumétricas producidas por las extracciones dentales

Como hemos visto, las extracciones dentales provocan una reabsorción y cambios en la forma de la cresta ósea residual. Esto implica que, si se pretende replicar la forma inicial, que siempre será la mejor fórmula, la más estética y la más funcional, deberemos pensar diferentes estrategias para obtener una forma y un volumen lo más parecido al que se disponía antes de la extracción dental.

Figura 2. Defecto horizontal secundario a una extracción dental.

Para compensar la contracción volumétrica que comporta la pérdida de dientes podemos recurrir a tratar el hueso remanente mediante una preservación alveolar en que se trataría de rellenar con un biomaterial el alveolo post extracción con la intención de alterar y reducir su contracción. También, si el defecto óseo está muy consolidado, debemos recurrir a técnicas de regeneración ósea guiada, con la intención de recuperar el hueso perdido con anterioridad.

Sin embargo, estas técnicas a menudo no son suficientes para reponer el volumen necesario para que el resultado final de una restauración con implantes sea completamente satisfactorio, por lo que, en muchas ocasiones, principalmente cuando la demanda estética es elevada, hay que recurrir a técnicas de aumento del grosor de las partes blandas.

2.2.1.- Preservación alveolar

La necesidad de intentar mantener los volúmenes iniciales del proceso alveolar para poder conseguir una rehabilitación de la pérdida dental más estética y funcional ha provocado la aparición de gran cantidad de protocolos y técnicas quirúrgicas que minimizan la contracción secundaria a la extracción dental. El relleno del alveolo post-extracción con un biomaterial para poder preservar el volumen inicial es una de las técnicas más usadas.

Vignoletti y cols. (2012) publicaron una revisión sistemática de los procedimientos quirúrgicos destinados a la preservación de la cresta después de una exodoncia. La preservación alveolar se consigue mediante la colocación de biomateriales dentro del alveolo, pero existe gran variabilidad quirúrgica, con colgajo o sin, usando membranas o no, buscando el cierre por primera intención o dejando que se cierre espontáneamente. Los resultados obtenidos dan una disminución media de la pérdida de altura en relación a un grupo control de 1.47 mm y de anchura de 1.83 mm. Resultados parecidos obtiene Vittorini Orgeas y cols. (2013) o Avila-Ortiz y cols. (2014) en sus revisiones sistemáticas. De estos resultados se puede concluir que la preservación alveolar es eficaz en limitar las alteraciones en altura y anchura de la cresta residual en los espacios post extracción, sin tener evidencia de que un material o una técnica quirúrgica concreta obtengan mejores resultados.

Sin embargo, es interesante resaltar la publicación de Araujo y Lindhe (2009) que, si bien confirmaron que el uso de un biomaterial dentro de un alveolo fresco puede limitar sus pérdidas dimensionales, también demostraron que el biomaterial también interfiere y retrasa la curación y esto implica que también puede alterar el calendario de la rehabilitación y el proceso de osteointegración de un implante.

Podemos decir que la preservación alveolar limita la contracción alveolar secundaria a la exodoncia, pero no podemos compensarla completamente y los resultados que obtenemos presentan una variabilidad importante. Además, ésto

supone un coste extra (el del biomaterial) y puede retrasar la rehabilitación mediante implantes.

2.2.2.- Aumento de partes blandas

Otra forma de compensar la pérdida de volumen secundario a las extracciones dentarias es mediante un aumento de volumen de las partes blandas, ya sea como tratamiento único o como tratamiento complementario a una preservación alveolar o a una regeneración ósea.

Clásicamente se ha venido realizando mediante injertos de tejido conectivo autólogo. La zona donante por excelencia ha sido el paladar del paciente, zona en la que, debido al grosor que presenta la encía a este nivel, pueden ser extraídos fragmentos de tejido conectivo con relativa baja morbilidad.

Los injertos de tejido conectivo autólogos han sido usados desde hace mucho tiempo en odontología. Langer y Calagna ya describieron el injerto de tejido conectivo subepitelial en el año 1980. Desde entonces se han utilizado en diferentes patologías como en el tratamiento de las recesiones gingivales, aumentos de volumen de zonas póntico, aumento de volumen alrededor de implantes, etc.

Posteriormente Raetzke (1985) describió la técnica del sobre para la cobertura de recesiones gingivales. Realizó una incisión a espesor parcial creando un sobre donde se introduce el injerto, que queda en parte cubriendo el defecto, pero en su mayoría y por ambos lados en íntimo contacto con los tejidos que forman el sobre y le aportan soporte y vascularización.

Thoma y cols. (2009) realizaron una revisión sistemática de las técnicas de aumento de tejidos blandos que se describen en la literatura. La técnica quirúrgica que mejores resultados ofrece para ganar encía queratinizada es el colgajo de reposición apical + vestibuloplastia. Sin embargo, si le añadimos un injerto de tejido conectivo autólogo mejoran los resultados de forma significativa, principalmente en la consecución de más encía adherida. Los resultados de su revisión en lo que se refiere al aumento de volumen de tejido conectivo no son concluyentes debido a la falta de homogeneidad en los artículos revisados.

No obstante, es alrededor de los implantes donde se ha demostrado que es fundamental el hecho de compensar las pérdidas volumétricas si lo que se pretende

restaurar con los tejidos a su posición original. En otro artículo Thoma y cols. (2014) publicaron otra revisión sistemática sobre la eficacia de aumento de los tejidos blandos alrededor de los implantes. Se comprobó que la realización de una intervención consistente en un colgajo de reposición apical + vestibuloplastia (CRA/V) al que se añade un injerto de tejido conectivo o un injerto gingival libre o se injerta una matriz de colágeno provoca un aumento de la encía queratinizada en un rango que va 1.4 a 3.3 mm. Los resultados obtenidos con CRA/V a los que se añade un injerto son superiores a los obtenidos en los controles de CRA/V sin injerto o a los controles que no recibieron tratamiento. Desde un punto de vista estético, se consiguen mejores resultados en forma de mejores papilas o niveles de mucosa marginal más altos en los casos en que se ha realizado injertos de tejido conectivo en relación a los casos que no se ha injertado. Por lo tanto, la conclusión es clara, los injertos de tejido conectivo aumentan el grosor de los tejidos blandos y provocan un mejor resultado estético.

2.3.- Implante inmediato

El implante inmediato se define como el implante colocado en el mismo acto quirúrgico que la extracción.

La relación del tiempo transcurrido entre la exodoncia y la colocación del implante ha sido motivo de muchos estudios y controversias, pero la clasificación que más se ha aceptado es la propuesta por Hämmerle y cols. (2004) que resume las conclusiones del “Third ITI Consensus Conference 2003” y que posteriormente recogieron Chen y Buser (2009). Según el tiempo transcurrido entre la exodoncia y la colocación del implante se distinguen 4 tipos: tipo 1 implante inmediato, que se coloca en el alveolo de extracción sin esperar a la cicatrización ni de partes blandas ni a la cicatrización ósea. Los tipos 2 y 3, en los que el implante se coloca a las 4 - 8 semanas y a las 12 -16 semanas respectivamente, son de colocación temprana con cicatrización de partes blandas, con menor o mayor maduración ósea. El tipo 4 es de colocación tardía, a partir de los 6 meses de la extracción, cuando ya se ha completado toda la cicatrización, tanto ósea como de partes blandas.

Los implantes inmediatos acortan el tiempo de tratamiento y generalmente se acompañan de provisionalización inmediata, hecho que le confiere una gran demanda puesto que el paciente no está en ningún momento desdentado. Desde hace años que se están valorando los resultados que se obtienen con los implantes inmediatos. Kan y

cols. (2003) hicieron el seguimiento de 35 implantes colocados de forma inmediata post- extracción y a los que se les realizó una provisionalización no funcional también inmediata. Durante el seguimiento de 1 año todos los implantes siguieron osteointegrados y los pacientes presentaban un alto nivel de satisfacción. A nivel vestibular, en su zona media había una pérdida de altura de 0.55 ±0.53 mm. Es decir, presenta buenos resultados en osteointegración y supervivencia del implante, pero estéticamente puede presentar problemas.

En un interesante estudio prospectivo multicéntrico, que se publicaron los resultados a 1 año, a los 3 años y a los 5 años (Cooper y cols. 2010, De Bruyn y cols. 2013, Cooper y cols. 2014) se compararon los resultados de los implantes OsseoSpeed® colocados de forma inmediata post extracción con los que se obtuvieron al colocarlos en crestas ya cicatrizadas. No se encontraron diferencias en cuanto a supervivencia de los implantes. En ambos grupos los resultados a nivel radiográfico y de partes blandas no mostraron diferencias significativas desde que se coloca la corona definitiva hasta el final del periodo de seguimiento.

En la revisión que hicieron Chen y Buser (2009) de 91 artículos que estudiaban los implantes post-extracción, extrajeron las siguientes conclusiones: La tasa de supervivencia de los implantes post-extracción era alta, superior al 95%, los implantes inmediatos presentaban frecuentemente recesiones de la encía vestibular, los factores de riesgo para estas alteraciones eran biotipo fino, implantes posicionados vestibularmente, y una falta de integridad de la cresta ósea vestibular o que ésta fuese muy fina.

Pero para obtener buenos resultados es importante la selección correcta del caso y además, como exponen Barone y cols. (2016), que el odontólogo responsable del caso sea un profesional con experiencia. En dicha publicación a 3 años, los clínicos con experiencia tuvieron unos resultados francamente mejores, tanto a nivel de resultados estéticos como en el grado de satisfacción del paciente.

Parece claro que, siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía y realizados por profesionales expertos, los implantes inmediatos son una buena estrategia. Reducen el tiempo de tratamiento ya que no se espera a la cicatrización alveolar y aumentan el grado de satisfacción del paciente al poder disponer de una restauración provisional el mismo día en que se realiza la extracción del diente, pero son muy sensibles a una técnica correcta y pueden presentar alteraciones estéticas con relativa frecuencia.

2.3.1.- Resultados estéticos de los implantes

El hecho de conseguir un buen resultado estético cuando hay que sustituir un diente por una restauración implantosoportada es uno de los retos más exigentes en el campo de la odontología.

Para poder realizar implantes inmediatos con un resultado satisfactorio es necesario conocer todos los procesos biológicos que se suceden durante este tratamiento. Botticelli y cols. (2004) estudiaron los cambios que se producen en el hueso alveolar después de la extracción y colocación inmediata de un implante. Los espacios que quedan entre el alveolo y el implante se van rellenando de hueso de nueva formación a partir del coágulo que se forma durante la intervención, pero esta formación de hueso viene acompañada de una reabsorción de la parte externa de la cresta. Este hecho indica que la colocación del implante no evita la contracción volumétrica que se produce en el hueso durante la cicatrización. Los mismos resultados pueden observarse en el artículo de Covani y cols. (2004) que estudiaron los cambios de la cresta ósea después de implantes inmediatos o implantes tardíos, midiendo la anchura de la cresta a nivel vestíbulo-palatino. Al grupo de implantes tardíos se les había realizado la extracción de 6 a 8 semanas antes. En ambos grupos se observa como la contracción ósea a este nivel continúa como correspondería a pesar de la colocación de los implantes. También se observa que si el defecto alrededor del implante mide más de 1.5 mm de gap, la curación se realiza con tejido conectivo más que tejido óseo.

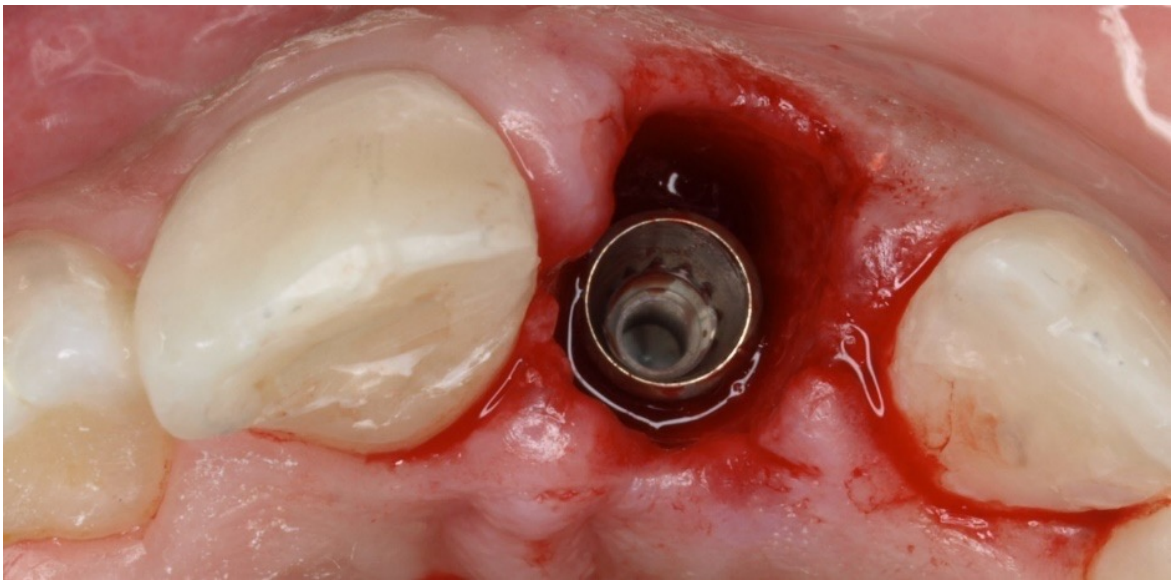

Figura 3. Imagen de un implante inmediato colocado en el alveolo de un diente extraído y donde puede apreciarse el gap entre el implante y la tabla vestibular.

A partir de este momento empezaron a aparecer artículos rellenando el gap entre el implante y la cresta ósea. Araujo y cols. (2011) demostraron en un estudio en perros que el uso de un biomaterial (Bio-Oss Collagen®) entre el implante y la cresta vestibular, modificaba el proceso de curación del tejido óseo de forma que limitaba la contracción y aumentaba la altura donde empieza en el contacto del implante con el hueso.

Sin embargo, los resultados obtenidos por el relleno del gap no son homogéneos, ni totalmente predecibles. Factores como la falta de integridad de la tabla vestibular o que esta sea muy fina nos pueden conducir a una pérdida de volumen de los tejidos gingivales principalmente a nivel de zénit de la corona (Chen y Buser 2014). Este hecho puede tener repercusiones estéticas en el resultado final de la restauración, en forma de diente más largo o diferencias de altura a nivel gingival entre los incisivos.

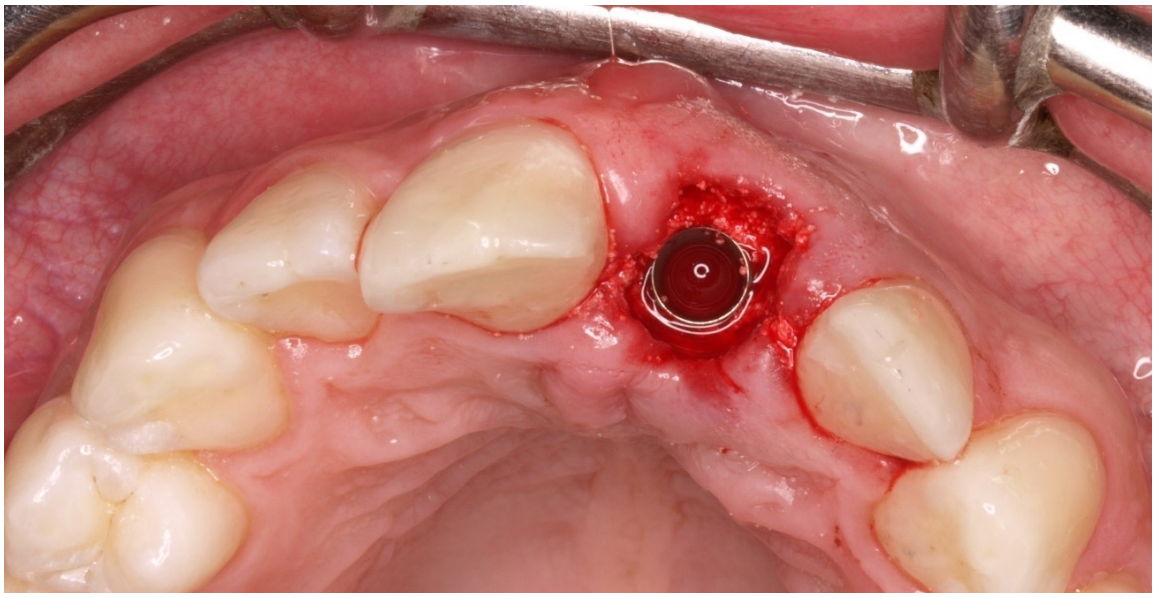

Figura 4. Imagen del relleno del gap entre un implante inmediato y la pared vestibular.

Para mejorar los resultados estéticos obtenidos en implantologia del sector anterior se observó que el aumento de partes blandas produce resultados más previsibles y más estables en el tiempo. Caneva y cols. (2013) presentaron un estudio en perros a los que colocaron implantes inmediatos post-extracción conjuntamente con injertos de tejido conectivo y observaron que los resultados finales se obtenían encías más gruesas y más coronalmente posicionadas. En una revisión sistématica sobre la eficacia del aumento del tejido blando en implantología, Thoma y cols. (2014) comprobaron que los injertos autólogos de tejido conectivo alrededor de los implantes provocaban un aumento del grosor del tejido gingival, confiriendo una mejor estética, en comparación con las zonas en las que no se realizaba dicho injerto.

Para asegurar el éxito estético del implante en la zona anterior con la restauración de la forma y el volumen previo a la exodoncia es necesario realizar injertos de tejido conectivo para poder aumentar el grosor de los tejidos blandos y compensar posibles pérdidas volumétricas. La pérdida de volumen es más evidente cuando se produce entre dientes, ya que se crea una concavidad que contrasta con la convexidad del relieve de las raíces de los dientes adyacentes. La estabilidad del resultado estético se relaciona con el grosor del tejido blando, así los casos con biotipo gingival grueso, el nivel de la encía es más estable con el paso del tiempo. Los pacientes con biotipo fino necesitan más injertos de tejido conectivo, para aumentar su grosor y prevenir potenciales recesiones y para evitar que el color gris del implante cambie el color de la encía. (Kan y cols. 2011, Fu y cols. 2011).

Figura 5. Corona sobre implante en un incisivo central en donde puede observarse que es más larga y la coloración gris de la encía por no aumentar los tejidos blandos.

Para conseguir un aumento del grosor de partes blandas alrededor de los implantes Eghbali y cols. (2016) propusieron una técnica quirúrgica que consistía en la realización de un sobre mediante la ayuda de ultrasonidos para la colocación de un injerto de tejido conectivo para conseguir mejores resultados, más reproducibles y más estables en el tiempo.

Ioannou y cols. (2015) realizaron una extensa revisión de todas las técnicas quirúrgicas de partes blandas alrededor de los implantes para mejorar la estética a nivel del frente anterior. Expusieron que la cirugía gingival se puede realizar tanto el día de la colocación del implante como en una segunda cirugía antes del procedimiento rehabilitador protésico. También mostraron las diferentes zonas donantes de tejido conectivo: la tuberosidad, tejido palatino profundo de la zona molar y el tejido palatino procedente de la zona del paladar más anterior y establece las distintas indicaciones para cada técnica. El injerto obtenido de la zona posterior y tuberosidad es un injerto mucho más fibroso, con menos tendencia a encogerse e incluso al contrario se han descrito crecimientos de grosor posteriores a la cirugía.

2.3.2.- Necesidad de protocolos para optimizar los resultados estéticos de los implantes

"El resultado estético de las restauraciones implanto-soportadas depende fundamentalmente del volumen de tejido conectivo". Con esta afirmación Ueli Grunder (2011) empezó su artículo, en el que nos comparaba los resultados de los pacientes tratados con implantes con y sin injerto de tejido conectivo. El grupo no injertado perdió 1.063 mm mientras que en el grupo que recibió tejido conectivo tuvo una ganancia 0.34 mm. Grunder describió su técnica para injertar tejido conectivo procedente del paladar mediante una incisión a espesor parcial, utilizando la técnica del túnel sin ninguna incisión que comprometiese a las papilas. El injerto se estabilizaba mediante sutura de Goretex.

Desde entonces se han sucedido protocolos, algoritmos de decisiones según muchas variables, para conseguir un buen resultado con los implantes en el sector anterior.

Hsu y cols. (2012) comentaron que cuando tratamos pacientes con implantes inmediatos reposicionando dientes del sector anterior, sobre todo aquellos que la tabla vestibular es menor a 2 mm, que son la gran mayoría (Huynh-Ba y cols. 2009, demostraron que en el sector anterior el promedio de anchura de la tabla vestibular es de 0.8mm), sería necesario colocar biomaterial de relleno óseo en la zona del gap en combinación con alguna técnica de aumento de partes blandas, especialmente en los pacientes con biotipo fino.

Un protocolo parecido es el que presentaron Cabello y cols. (2012, 2015) al que denominaron "*trimodal approach*" que pretende conseguir un resultado estético y estable en el tratamiento con implantes en el sector estético. Para minimizar el posible impacto estético de la remodelación del hueso alveolar después de la exodoncia, proponen un protocolo que comporta:

- La colocación de un implante inmediato dando mucha relevancia en la posición correcta 3D del mismo y en no levantar colgajo durante la cirugía.

- La realización de una corona provisional que dé soporte a los tejidos blandos que disponíamos antes de la extracción.

- El relleno del gap óseo entre el implante y la cresta vestibular con diferentes materiales biológicos y el engrosamiento de las partes blandas mediante un injerto de tejido conectivo.

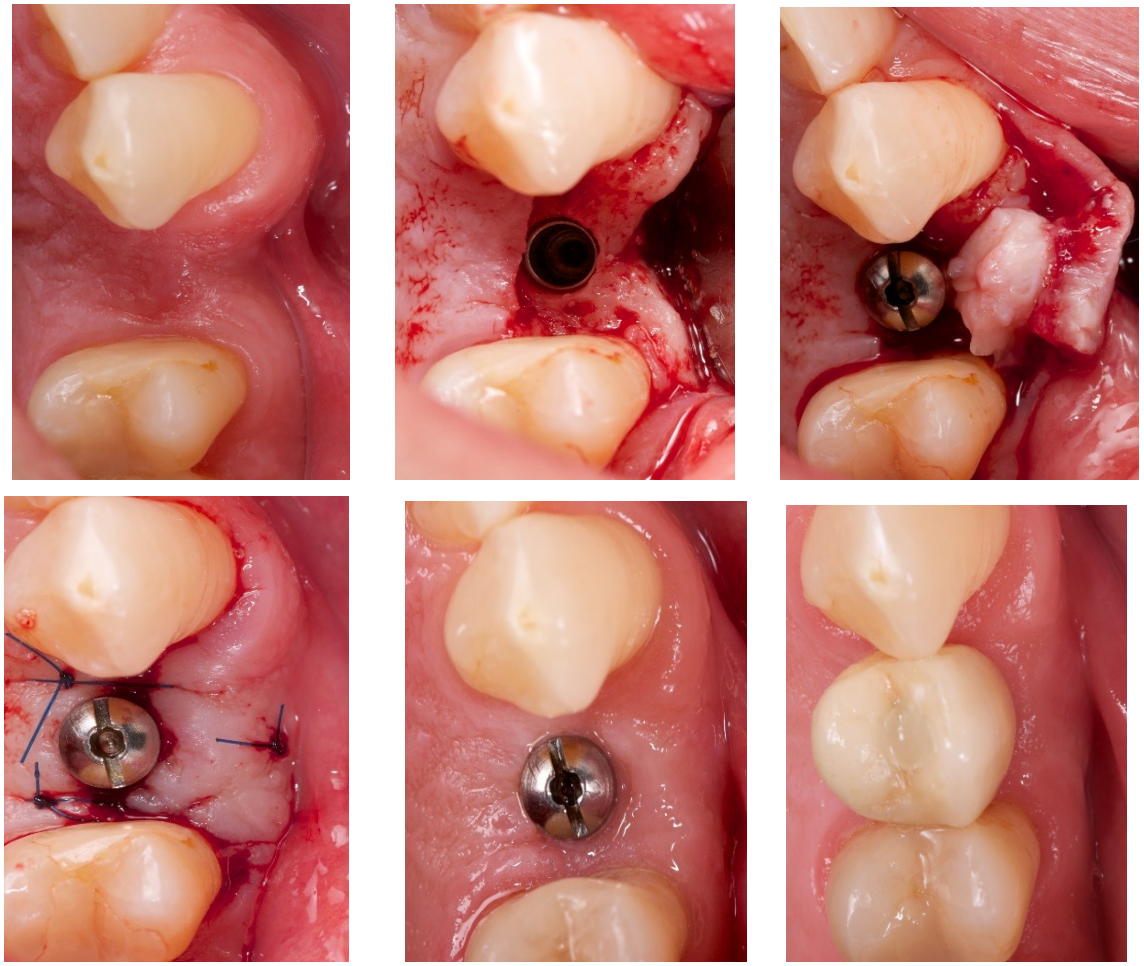

Figura 6. Secuencia de la restauración de un premolar corrigiendo el defecto de volumen con un injerto de tejido conectivo. Fotos cedidas por Herminio García, Departamento de Prótesis, UIC.

Podemos concluir que hoy en día es necesario un buen conocimiento de los procesos biológicos que se suceden en la cicatrización alveolar post exodoncia, en la osteointegración del implante en el hueso y en las técnicas de aumento de volumen de los tejidos periimplantarios. Cualquier tratamiento que pretenda un resultado de alta calidad, principalmente si queremos reponer dientes ausentes en el sector anterior, debe basarse en protocolos con aumentos de tejidos con buena predictibilidad y estabilidad en el tiempo. Aunque en muchas ocasiones es conveniente actuar sobre el hueso y también sobre tejido gingival, los aumentos de partes blandas nos ofrecen resultados más predecibles.

2.4.- Bioingeniería de la mucosa oral

Debido al hecho de que la falta de volumen es un problema importante en la rehabilitación con implantes, en muchos casos tenemos que recurrir a injertos autólogos de tejido conectivo que nos van a aportar un tejido gingival más grueso. Estos injertos requieren una zona donante y esto conlleva una segunda área quirúrgica, hecho que implica una mayor morbilidad, un aporte limitado de material y un aumento del tiempo de intervención. Para reducir estas limitaciones se ha recurrido de la bioingeniería como una posible solución alternativa.

Desde hace años que se trabajan diferentes aspectos para conseguir resultados que permitan obtener equivalentes de la mucosa oral. Wolff y cols. (2016) revisaron las distintas técnicas quirúrgicas y los distintos materiales que hay para realizar injertos de partes blandas en la cavidad oral. A pesar de que el estándar de referencia es el injerto de tejido conectivo autólogo, reconocieron que las diferentes biomatrices obtenidas por ingeniería tisular pueden resultar una alternativa interesante. Para ello recomiendan el uso de soportes que faciliten la revascularización y la reepitelización del tejido.

2.4.1.- Antecedentes

Los primeros estudios pilotos sobre injertos de material obtenido por bioengeniería se realizaron en pacientes oncológicos en los que había que cerrar

grandes defectos secundarios a las cirugías agresivas necesarias para la extirpación de los tumores y en las que la limitación del tejido restante hacía difícil obtener el cierre primario de la herida u obtener suficiente vestíbulo para poder corregir los resultados mediante prótesis. Lauer y Schimming (2001) presentaron 6 casos de cirugía oncológica en los que se cerró la herida mediante un injerto de mucosa gingival obtenida por ingeniería tisular, 5 de estos pacientes presentaron una buena evolución, con cierre de la herida en primera intención, manteniendo la movilidad de la lengua y dejando un área que permita el uso satisfactorio de una prótesis bucal. El tejido injertado era mucosa del paladar del propio paciente que había sido extraída de 3 a 5 semanas antes de la cirugía y que había sido cultivado en el laboratorio para aumentar su tamaño. El tejido obtenido era tejido queratinizado y suponía un avance pues los injertos de tejido provenientes del paladar eran limitados de tamaño y solo permitían recubrir pequeños defectos.

Saubier y cols (2005) hicieron una recopilación de las indicaciones de los casos tratados con esta técnica y concluyeron que los resultados obtenidos son muy buenos y que a los 6 meses la zona trasplantada presentaba una capa epitelial totalmente regular y aparecía una membrana basal. Los buenos resultados obtenidos venían limitados por la capacidad del laboratorio en la fase prequirúrgica y los elevados costes que representaba esta técnica. Estos autores concluyeron que para mejorar los resultados era necesario alcanzar un mejor conocimiento de los cultivos celulares y de las biomatrices.

En el 2010 Peña y cols. publicaron la obtención *in vitro* de un equivalente de la mucosa oral. Para ello utilizaron un gel de fibrina obtenido medinate una extracción de sangre del propio paciente que se utilizó como *scaffold* y en la que se insertaron fibroblastos y se sembraron queratocitos obtenidos de una muestra de mucosa oral, también del propio paciente. El resultado es un equivalente a la mucosa oral que puede usarse en cirugía y que presenta una capa de células epiteliales de forma cúbica similares a las que se hallan en la capa basal de la mucosa oral, por encima de una capa de fibrina embebida de fibroblastos. Este tejido ha sido testado con éxito como refieren Llames y cols. (2013) en la reconstrucción de un paciente pediátrico afecto de microsomía hemifacial y anquiloglosia.

2.4.2.- Geles de fibrina-agarosa

En el presente estudio vamos a testar el gel de fibrina-agarosa para conseguir o de volumen del tejido gingival, en concreto vamos a experimentar con Neofibrina®. Esta matriz de fibrina-agarosa (MFA) es un nuevo hidrogel de agarosa tipo VII y fibrina que ha sido utilizado con éxito varias veces para crear modelos biocompatibles de diferentes tejidos

Este material se ha desarrollado y producido bajo condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP-like) y se ha caracterizado mediante una técnica de citometría de flujo (Histocell S.L. Laboratories, Bilbao, España).

La MFA constituye un soporte natural diseñado para la regeneración tisular. Para su desarrollo se ha utilizado fibrina procedente de plasma humano y agarosa. El gel de fibrina es unos de los hidrogeles hechos a base de polímeros naturales que ha sido usado en ingeniería tisular como *scaffold* en distintos modelos. Pero sus propiedades mecánicas eran bastante limitadas. Sin embargo, éstas mejoran de forma sustancial mediante la adición de agarosa y la posterior hidratación. Scionti y cols. (2013) publicaron un artículo mostrando de qué modo el contenido de agarosa y agua pueden mejorar sus propiedades biomecánicas.

Figura 7. Obtención de diferentes formas de MFA para diferentes indicaciones de regeneración de tejidos blandos incluyendo la reparación de la mucosa oral.

Esta combinación de componentes resulta en un biomaterial con propiedades elásticas y a la vez suficientemente resistente para poder ser aplicado en procesos de reparación de la mucosa oral con el objetivo de proporcionar un soporte apropiado para la colonización de células circundantes que remplacen el tejido perdido o dañado. La MFA puede ser manejada fácilmente por el médico o el odontólogo para adaptarla al sitio del defecto de la mucosa. Otra característica de esta matriz es que permite su aplicación tanto en estado seco o hidratado en función de las necesidades de cada intervención (Figura 8).

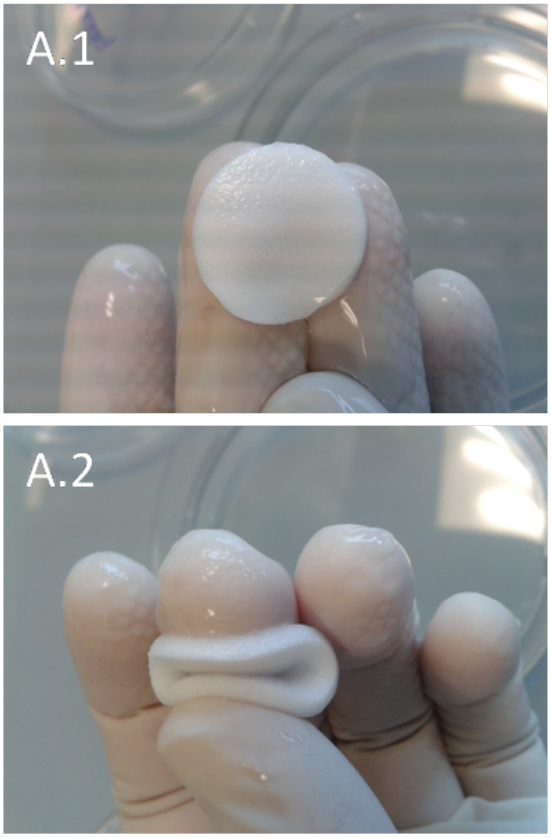

Figura 8. Imágenes de la MFA donde se puede observar el aspecto macroscópico del biomaterial en su estado hidratado y sus propiedades elásticas cuando se dobla manualmente, mostrando que es un material de fácil manejo.

Tal como se ha comentado otra propiedad interesante en un material de estas características es su porosidad (Figura 9), que le permite alcanzar una hidratación inmediata y por tanto un aumento de volumen cuando se pone en contacto con una zona húmeda. Esta porosidad también facilitará que se rellene por el coágulo y

posteriormente pueda dar lugar al reclutamiento de las poblaciones celulares circundantes, fibroblastos y células mesenquimales en este caso, hasta su sustitución por un tejido dérmico rico en fibras de colágeno.

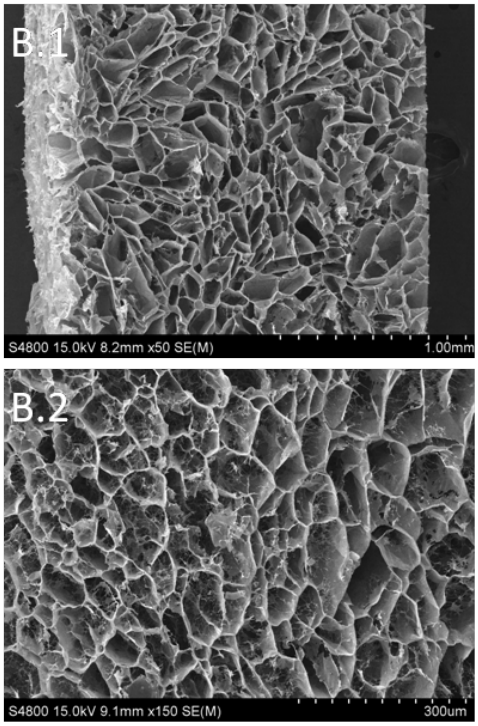

Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de una sección longitudinal de material de matriz de fibrina-agarosa muestran la porosidad homogénea de su estructura interna. (B.1.) 1.00mm (B.2.) 300 µm.

Las MFA han sido utilizada en diferentes campos de la bioingeniería. Alaminos y cols. (2006) usaron esta matriz para conseguir un sustituto de córnea y Carriel y cols. (2015) en un interesante trabajo, modificaron la matriz de fibrina-agarosa para conseguir un perineuro que pudiera reparar las lesiones de nervios periféricos.

Pero, para lo que más se han usado MFA, han sido como soporte de la piel y de la mucosa gingival. Carriel y cols. (2012) utilizan la MFA como soporte para construir piel humana perfectamente estratificada, con todas sus capas. Realizaron cultivos de fibroblastos y de queratinocitos, los hicieron crecer sobre la MFA y analizaron su desarrollo ex vivo a la 1, 2, 3 y 4 semanas. Este sustituto de la piel fue injertado en ratón *nude* inmunodeficientes y se analizaron los resultados con microscopía electrónica, inmunofluorenscencia y histoquímicos. A los 30 días pudieron diferenciar claramente una dermis y una epidermis y concluyeron que el equivalente de piel

obtenido con un modelo de fibrina agarosa era capaz de reproducir la estructura y la histología de la piel nativa.

Por lo que se refiere a tejido gingival, Sánchez-Quevedo y cols. (2007) fueron los primeros en publicar los resultados histológicos y histoquímicos de una mucosa oral elaborada sobre una MFA. Se extrajeron fibroblastos y queratinocitos de una mucosa oral humana por medio de una pequeña biopsia que se aislaron y se cultivaron. Estos cultivos se utilizaron para la confección de una mucosa oral artificial sobre una matriz extracelular de fibrina-agarosa. El resultado final es de un tejido parecido a la mucosa oral, con una capa epitelial poliestratificada y con muchas similitudes histoquímicas al tejido gingival humano, principalmente en la expresión de las citoqueratinas 10 y13. Este trabajo lo continuaron en una publicación Alaminos y cols. (2007) que analizaron los patrones morfológicos y la expresión genética de las células que se desarrollan en la mucosa oral obtenida en el laboratorio y observaron mucha similitud respecto al tejido nativo original. San Martin y cols (2013) estudiaron el comportamiento de los fibroblastos en una mucosa oral confeccionada sobre matrices de fibrina y de fibrina-agarosa y analizaron el comportamiento de los fibroblastos en ambos *scaffolds*, valorando su crecimiento, la síntesis de ciertas proteínas y la estructuración del colágeno. Viñuela-Prieto y cols. (2015) intentaron conseguir la diferenciación secuencial de los queratinocitos en un sustituto de la mucosa oral basado en la matriz de fibrina-agarosa. A las 3 semanas consiguieron una capa epitelial muy parecida a la humana.

Los estudios experimentales que incluyen una MFA se suceden cada vez con objetivos más exigentes. Martin-Piedra y cols. (2017) desarrollaron un sustituto multicapas del paladar que incluía hueso, realizado con células de conejo y técnicas nanotecnológicas de compresión plástica. La matriz obtenida fue injertada en un conejo y se observa una buena diferenciación celular, pero con resultados inferiores a los controles.

Campos y cols. (2016) intentaron mejorar la estructura y las propiedades biomecánicas de los geles de fibrina-agarosa y de los geles de fibrina-agarosa nanoestructurados, usando el glutaraldehido como agente que podía causar un entrecruzamiento tipo "*cross-link*". El gel de fibrina-agarosa nanoestructurado *"cross-linked*" permite controlar la porosidad y la densidad de las fibras, optimizando sus propiedades biológicas y biomecánicas para su uso en ingeniería tisular.

La MFA es una matriz que puede ser mejorada en el laboratorio para conferirle unas propiedades que más se adapten a la finalidad que se necesite destinar. Del mismo modo que disponemos de tejido conectivo autólogo que presenta diferente composición y diferentes propiedades, según sea de paladar anterior, posterior o de tuberosidad, con diferente cantidad de grasa y de tejido fibroso, podemos modificar las biomatrices en el laboratorio para obtener resultados que se adapten más a las necesidades de nuestros pacientes.

2.4.3.- Biomatrices en odontología

En odontología se han utilizado diferentes biomatrices con indicaciones bastante parecidas, la mayoría de ellas para la sustitución del injerto de tejido conectivo autólogo que, como ya se ha comentado, siempre supone una mayor morbilidad al precisar una zona donante (Wolff y cols. 2016). De todas ellas, las más utilizadas y las que tienen más soporte bibliográfico son la matriz dérmica acelular y la matriz porcina de colágeno (Nart y cols. 2011):

2.4.3.1.- Matriz dérmica acelular.

La matriz dérmica acelular (MDA) más utilizada es el Alloderm® (Life Cell Corporation, The Woodlands, TX, USA). Se trata de un tejido dérmico *ex vivo*, procedente de cadáver, que se obtiene a partir de un banco de tejidos de donantes seleccionados. El proceso de fabricación incluye la eliminación de la epidermis manteniendo la membrana basal, posteriormente se digieren las células de la dermis con enzimas de bajo peso molecular para evitar lesionar el tejido. La matriz obtenida carece de células, por lo que está libre de antígenos de superficie que pudieran afectar su histocompatibilidad o que pudieran provocar el rechazo del injerto. Posteriormente el tejido es secado y congelado sin dañar los compontes que puedan promover la posterior revascularización y repoblación por células del receptor.

Las indicaciones de esta matriz han sido básicamente como alternativa a los injertos de tejido conectivo del propio paciente.

Gapski y cols. (2005) publicaron un meta-análisis sobre los estudios del uso de la matriz dérmica acelular en cirugía mucogingival y observaron que existen pocos

estudios que sean ensayos clínicos randomizados, en los que se compare el uso de MDA con el injerto de tejido conectivo, o con el colgajo de reposición apical o al injerto gingival libre. Además, la heterogeneidad de estos trabajos hace difícil obtener resultados, aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre el uso de MDA y las otras técnicas quirúrgicas probadas en las variables estudiadas.

Nuñez y cols. (2009) publicaron un estudio en *minipigs* en los que realizaba un colgajo de reposición apical para el tratamiento de las recesiones radiculares tipo I de Miller. Al realizar las cirugías en un grupo se interponía tejido conectivo y el otro MDA. Los resultados que se obtuvieron no diferían de forma significativa entre ambos grupos.

Así, en 2015, se publicó (Tatakis y cols. 2015) un consenso realizado en la *American Academy of Periodontology* sobre cubrimiento radicular de las recesiones gingivales De las conclusiones se puede extraer que, aunque se recomienda el injerto de tejido conectivo autólogo como el tratamiento de elección para el tratamiento de estos defectos, los resultados observados por el injerto de una matriz dérmica acelular en combinación con un colgajo de reposición apical puede ser una alternativa a considerar que evita la necesidad de una zona donante.

Este modelo también se ha usado para aumentar el grosor de la mucosa adyacente a los implantes. Farina y Zaffe (2015) compararon zonas control con zonas en las que se realizaron un injerto y demostraron que el uso de una matriz dérmica acelular provocaba un aumento de grosor de la mucosa principalmente en sujetos que presentaban un biotipo periodontal fino.

2.4.3.2 Matriz porcina de colágeno.

La matriz de colágeno (MC) más usada es Mucograft® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza). Se trata de una matriz tridimensional, que consta de dos capas, una más compacta que es posible suturar y que se debe colocar de forma externa y otra, interna, con una estructura más esponjosa que permite la estabilización del coagulo sanguíneo y facilita la penetración de células del tejido conectivo adyacente.

Esta matriz se degrada en un periodo de 3 a 10 semanas, según la cirugía realizada y la reepitelización se produce aproximadamente en un plazo de tiempo comprendido entre las 4 y las 8 semanas.

Vignoletti y cols. (2011) realizaron un estudio en *minipig* para el tratamiento de las recesiones gingivales tipo I de Miller, mediante el injerto de una matriz de colágeno combinado con un colgajo de reposición apical. El estudio comparaba los resultados clínicos e histológicos de realizar solo el colgajo de reposición apical o de añadir un injerto MC al mismo tratamiento. Los resultados fueron clínicamente muy similares y el injerto MC se incorporó al tejido conectivo del huésped sin ningún signo de componente inflamatorio.

Thoma y cols. (2010) publicaron los resultados de un estudio volumétrico realizado sobre perros para valorar el aumento de volumen que se puede conseguir en el tejido conectivo mediante el uso de matrices de colágeno. Para ello crearon unos defectos en los maxilares de los perros, en los que realizaron unos injertos de tejido conectivo y en otros injertaron MC. Con ambas cirugías obtuvieron diferencias volumétricas significativas en relación a la zona control, pero no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de injertos. El trabajo concluía que la MC puede ser una opción alternativa al injerto de tejido conectivo, dentro de las limitaciones de este estudio. En el año 2011, los mismos autores publicaron los resultados histológicos y los resultados histomorfométricos obtenidos por la matriz de colágeno de este estudio, que fueron similares a los que se habían obtenido con el injerto de tejido conectivo autólogo.

En el 2014 Thoma y cols., publicaron una revisión sistemática sobre el aumento de partes blandas alrededor de los implantes. Las conclusiones evidenciaron que la MC provoca una ganancia inferior en encía queratinizada alrededor de los implantes en relación con los injertos de tejido conectivo autólogo, pero presentaba un resultado superior en cuanto a morbilidad para el paciente y en tiempo operatorio. Estas conclusiones también son manifestadas por Atieh y cols. (2016) que, si bien no encontraron diferencias entre los resultados estéticos obtenidos por la MC versus el injerto de tejido conectivo, sí que evidenciaron una menor morbilidad postoperatoria y una duración de la intervención inferior en los pacientes tratados con MC.

Cardaropoli y cols. (2014) publicaron un ensayo clínico randomizado, con 32 pacientes, para el tratamiento de las recesiones múltiples, comparando un colgajo de reposición apical solo o con la interposición de una matriz de colágeno xenogénica. Los resultados concluyeron que el grupo con MC presentaron mejores resultados en cuanto a porcentaje de cubrimiento de las recesiones que el grupo que se trató únicamente con un colgajo reposicionado apicalmente.

También en el 2014 McGuire y cols. presentaron un estudio clínico randomizado para valorar la MC como alternativa al injerto gingival libre para ganar encía queratinizada en el área vestibular. Este trabajo mostró que los casos tratados con MC presentaban una menor morbilidad, un aporte ilimitado de tejido para injertar y una mayor satisfacción del paciente.

Burkhardt y cols. (2016) compararon el injerto de tejido conectivo con la matriz de colágeno para mejorar la estabilidad de las heridas en un estudio experimental realizado en perros y en este caso encontraron una mayor resistencia a fuerzas disruptivas en los colgajos en los que se había interpuesto tejido conectivo que los tratados con MC.

En otro artículo Thoma y cols. (2017) realizaron un estudio en perros para comparar el injerto de tejido conectivo subepitelial con la matriz de colágeno para conseguir un aumento de volumen de las partes blandas alrededor de los implantes dentales. Los aumentos conseguidos son similares en los 2 tratamientos y alcanzaban el máximo al cabo de un mes para ir disminuyendo hasta los 6 meses.

Schmitt y cols. (2016) en un estudio realizado en perros, publicaron los resultados de un estudio volumétrico comparativo entre el injerto autologo de tejido conectivo y la matriz de colágeno porcino, Los resultados de la MC a los 10 meses, no eran inferiores en volumen a los obtenidos por el tejido conectivo.

En definitiva, la matriz de colágeno puede ser una buena alternativa a los injertos autólogos de tejido conectivo ya que se consiguen en general resultados parecidos, se disminuye la morbilidad postoperatoria y se consigue un aporte ilimitado. Si bien, aún debemos de definir bien las indicaciones y realizar estudios con seguimientos más largos.

2.5.- Modelos experimentales en animales

Para probar la eficacia de nuevos productos o de nuevas indicaciones para productos ya existentes conviene recurrir a modelos experimentales que permitan comparar los resultados. Los modelos experimentales en animales deben servir para seleccionar el animal más adecuado y la metodología más útil para valorar los resultados en función de los objetivos del estudio.

Se han publicado modelos animales en diferentes estudios. En el campo de la odontología, podemos citar a Oz y cols. (2010) que publicaron un modelo experimental en ratones mediante la administración de dextrano sulfato sódico o ácido sulfónico trinitrobenceno para provocar una respuesta inflamatoria severa tanto intestinal como oral y propusieron este modelo para trabajos sobre enfermedad inflamatoria intestinal y para estudios sobre enfermedad periodontal, ya que la inflamación que se produce a nivel gingival es muy parecida en patogenicidad y pérdida ósea a la que se observa en la enfermedad periodontal. Kevasalu y cols. (2007) propusieron un modelo diferente que contemplaba la administración de un combinado bacteriano de gérmenes periopatógenos para conseguir una reacción inflamatoria periodontal con pérdida de hueso que también permitía ser usado como modelo para el estudio de la enfermedad periodontal. Posteriormente el propio Oz y cols. (2011) publicaron una revisión sobre los distintos modelos animales experimentales que se han desarrollado para el estudio de la enfermedad periodontal.

Respecto a la selección del animal que es más adecuado para este tipo de estudio, es interesante el trabajo de Wang y cols. (2007) que proponían al *minipig* como el modelo animal de referencia en la investigación orofacial y dental por razones éticas, económicas y científicas. La región oral del *minipig* es similar a la de los humanos en anatomía, desarrollo, fisiología, patofisiología y concurrencia de enfermedades.

2.6.- Métodos para cuantificar las variaciones volumétricas.

Cada vez es más frecuente la publicación de estudios volumétricos. En la actualidad disponemos de escáneres capaces leer volúmenes con mucha exactitud y transformarlos en archivos de 3 dimensiones a través de redes de mallas. Al mismo tiempo existen potentes softwares que permiten comparar, superponer, sustraer, en definitiva, hacer todo tipo de cálculos con estos archivos. Estas herramientas han propiciado que vayan apareciendo trabajos basados en estas tecnologías. Y parece lógico que, cuando lo que se pretender demostrar son cambios tridimensionales o aumentos de volumen, los resultados provengan de la realización de estudios volúmetricos.

Windisch y cols. (2007) valoraron la fiabilidad y reproducibilidad de los estudios realizados sobre imágenes tridimensionales obtenidas a través de escáneres ópticos y los resultados demostraron que es un excelente modelo para el estudio de los cambios de volumen que se producen en la cresta ósea.

Ya comentamos el trabajo de Thoma y cols. (2010) que estudió el aumento de volumen del tejido conectivo con matrices de colágeno. Obtuvieron modelos físicos obtenidos a partir de una impresión de la boca de los perros que estaban estudiando y mediante un escáner con una cámara de video 3D (Cerec 3 Bluecam, Sirona dental Systems, Bensheim) obtuvieron unos modelos digitales tridimensionales que superpusieon mediante un software de tratamiento de volúmenes (Match 3D, University Munich, Germany). En la superposición se utilizan las caras vestibulares de los dientes adyacentes como puntos de referencias para coordinar ambos archivos y se definen áreas de interés para el estudio de cada defecto. Esta área de interés presenta una forma trapezoidal y el software tiene que poder cerrar la malla para el cálculo de la diferencia de volumen.

Schneider y cols. (2011) estudiaron la evolución de los tejidos blandos después de la colocación de implantes, en pacientes a los que se les realizó regeneración ósea y aumento de partes blandas con injerto de tejido conectivo. A los pacientes se les tomaron modelos que fueron escaneados y transformados en archivos volumétricos. A pesar de que se trabajó con modelos tridimensionales, los resultados fueron mediciones lineales, tomadas en puntos de sección del modelo. Se valoró la ganancia de grosor vestibular, la longitud de la corona y la altura de la papila.

Oscar Gonzalez-Martín y cols. (2014) en su artículo sobre el resultado de los injertos de tejido conectivo en las zonas pónticas describieron una técnica para la realización de estudios volumétricos. Realizaron modelos en yeso a partir de impresiones de polivinil siloxano, que fueron escaneados con un escáner laser, obteniendo archivos *stl* de cada modelo que se estudiaron y analizaron con el programa Geomagic© (3D Systems, Rock Hill, USA) y fueron superpuestos para realizar cálculos de diferencia de volúmenes y secciones para realizar estudios perfilométricos.

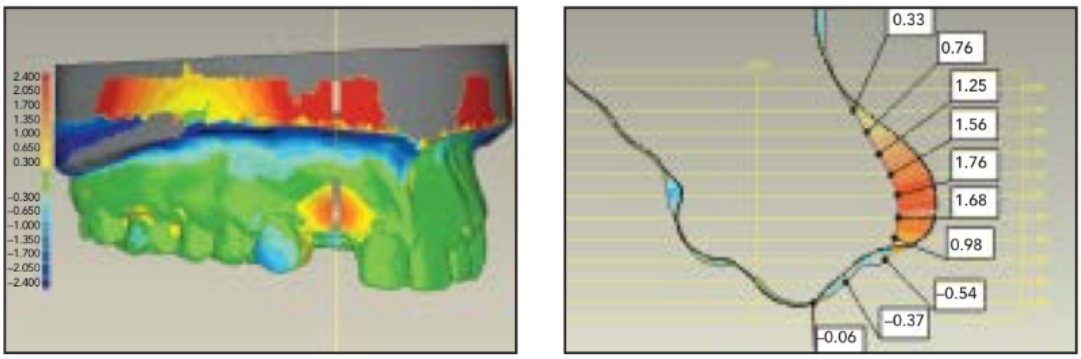

Figura 10. Imágenes de superposición de 2 archivos volumétricos y de una sección para la realización de estudios perfilométricos. De Gonzalez-Martin y cols. 2014.

Sanz-Martin y cols. (2015) estudiaron los cambios volumétricos de las zonas pónticos con y sin injerto de tejido conectivo. También obtuvieron modelos físicos con impresiones de alginato que se digitalizaron con un escáner óptico obteniéndose archivos *stl* y con un software de análisis de redes volumétricas se realizan superposiciones. Los resultados también se realizaron en mediciones lineales perfilométricas y en mediciones volumétricas.

Se puede afirmar que cada vez son más frecuentes los estudios volumétricos en la literatura y que constituyen una gran herramienta para realizar mediciones a nivel de cambios en la cresta ósea y para valorar los incrementos de volumen que producen los injertos conectivos, sean de conectivo autólogo o mediante el uso de biomatrices, en el tejido gingival.

Hipótesis

3.- Hipótesis.

3.1.- Hipótesis nula

La biomatriz de fibrina agarosa no produce un aumento de volumen en el tejido conectivo gingival del *minipig*.

3.2 Hipótesis alternativa

La biomatriz de fibrina agarosa produce un aumento de volumen en el tejido conectivo gingival del *minipig.*

Objetivos

4.- Objetivos

4.1.- Objetivo principal

- Desarrollar de un modelo experimental que permita determinar la eficacia de la matriz de fibrina agarosa para conseguir aumentos de volumen del tejido gingival.

4.2. Objetivos secundarios

- Establecer un modelo experimental para valorar *in vitro* el comportamiento de Neofibrina® en un cultivo de fibroblastos.

- Diseñar un modelo experimental en *minipig* que permita valorar el comportamiento de la MFA en el tejido gingival.

- Diseñar un protocolo para el estudio de modelos volumétricos que permita cuantificar los cambios de grosor del tejido gingival tras el injerto de la MFA.

- Valorar la estabilidad a lo largo del tiempo de los incrementos de volumen del tejido gingival que se hayan obtenido tras el injerto.

- Evaluar histológicamente los biopsias obtenidas a los 90 días tras el injerto de la MFA en el tejido gingival.

- Proponer nuevas líneas de investigación en el desarrollo de la biomatriz.

Material y métodos

5.- Material y métodos

5.1.- Materiales del estudio

5.1.1.- Biomatriz

Este trabajo ha sido diseñado como un estudio piloto para probar la eficacia de la MFA para conseguir aumentos de volumen del tejido gingival en un modelo experimental animal.

La matriz utilizada fue Neofibrina® (Histocell, S.L.España) y se probó una matriz con un grosor de 1mm (Neofibrina 1) o con un grosor de 2 mm (Neofibrina 2).

Para la realización del modelo experimental se planteó un protocolo con un equipo de trabajo multidisciplinar que estaba compuesto de veterinarios, odontólogos, expertos en ingeniería tisular e ingenieros informáticos expertos en análisis volumétricos.

5.1.2.- Animal

El procedimiento experimental se realizó en un *minipig* adulto, macho de 35 kg de peso. Antes de empezar el estudio se procedió a un periodo de aclimatización del animal de una semana a su nuevo ambiente.

Todos los procedimientos veterinarios han sido realizados siguiendo la regulación de la CEE sobre el cuidado y tratamiento de animales de laboratorio. El protocolo ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH), así como del AGAUR (número de orden DAAM: 8016).

5.2.- Estudios in vitro con Neofibrina.

Aunque el objetivo de este estudio consistía en probar la eficacia de la matriz de fibrina-agarosa MFA para provocar aumentos en el volumen del tejido gingival, previamente era necesario testar la matriz como *scaffold* para el desarrollo de mucosa

oral por medio de la ingeniería tisular. Para ello se utilizaron cultivos de fibroblastos y se estudió la capacidad de la matriz para ser colonizada por estas células.

5.2.1.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos

A partir de biopsias de piel canina cedidas por el Hospital Clínico Veterinario de la Universitat Autònoma de Barcelona, se realizó la digestión enzimática de las muestras para el aislamiento de los fibroblastos.

Las biopsias fueron talladas en porciones de 1 mm^3 y posteriormente incubadas durante 140 minutos en 15 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Probiotek™, México) por gramo de piel, que contenía 30 mg de colagenasa, 18 mg de hialuronidasa, 12 mg de proteasa y 1,5 mg de DNAsa (todos los enzimas usados fueron de Sigma-Aldritch Co.™), suplementados con Albúmina Sérica Bovina (BSA) y antibióticos.

Después de la digestión enzimática las células fueron lavadas con PBS (Probiotek™, México) y se valoró su viabilidad con azul de tripano.

Las células fueron cultivadas en DMEM al 5% en ambiente humidificado, a una temperatura 37º y con una concentración de CO_2 del 5 % durante 2 días. El medio de cultivo se cambia 2 veces por semana. Los fibroblastos se utilizaron entre la segunda y la quinta división.

5.2.2.- Viabilidad celular

La viabilidad celular fue valorada a través de la tinción con azul de tripano. En primer lugar, se observó la muestra al microscopio para observar el buen crecimiento de los fibroblastos. Después de realizar 3 lavados con PBS, se añadieron 3 ml de tripsina a la muestra y se dejaron en la incubadora hasta conseguir que los fibroblastos queden sueltos y de este modo permitir su contaje. Para inactivar la tripsina, se añadió el mismo volumen (3ml) de DMEM. Se comprobó que los fibroblastos estuvieran sueltos por visión directa al microscopio. Se cogieron 50 µl de células que se mezclaron con 50 µl de azul de tripano y re realizó su contaje en la cámara de Neubauer. Las células teñidas de azul fueron contabilizadas como células

muertas y se calculó el porcentaje en relación a las células vivas. El porcentaje de células vivas respecto al total representa la viabilidad del cultivo y debía ser superior al 95% respecto al total, para poder ser utilizadas en los estudios in vitro.

5.2.3.- Estudio de la penetración de los fibroblastos en una matriz de fibrina agarosa

Para la realización de este experimento se utilizó Neofibrina® que se había esterilizado previamente. En ambiente estéril fue dividida en 6 fragmentos para poder tener 2 muestras de cada control, a las 24 horas, a las 48 horas y a las 72 horas.

Se descongelaron fibroblastos caninos que habíamos aislado y cultivado previamente. Se procedió al protocolo de tripsinización para desagruparlos y se tiñieron con azul de tripano. Se procedió al contaje en la cámara de Neubauer para contar el número de células vivas y calcular la cantidad necesaria para reunir 100.000 fibroblastos para cada pocillo de la placa de cultivo.

En cada pocillo se colocó un cubre estéril con un fragmento de Neofibrina® adherido a él y la cantidad de medio suficiente para cubrir la matriz y contener 100.000 fibroblastos. En total se rellenaron 9 pocillos (según figura 8) con 2 muestras de Neofibrina® para las 24 horas, 2 para las 48 horas y 2 para las 72 horas y en cada muestra temporal se realizó un control exclusivamente con células.

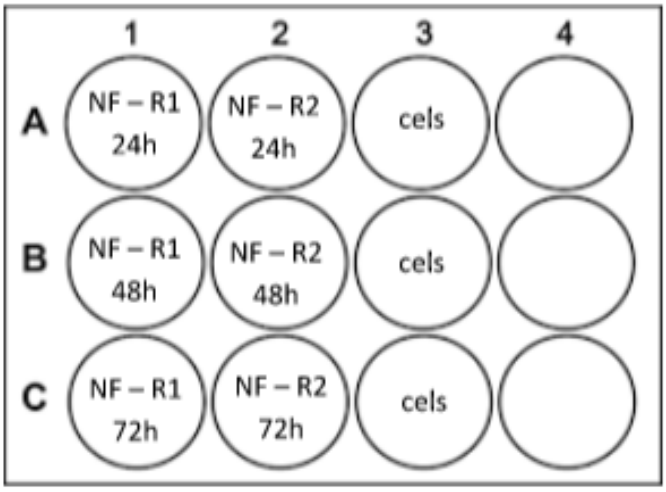

Figura 11. Esquema de la preparación en pocitos para el cultivo de fibroblastos con Neofibrina.

Una vez completados los respectivos tiempos de cultivo se recogieron las muestras y fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm y se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para su evaluación histológica.

5.3.- Estudios in vivo: protocolo experimental

El *minipig* fue mantenido en ayunas 24 horas antes de la intervención, en un espacio con temperatura y humedad controlados.

Se realizaron en total 5 actuaciones: 2 quirúrgicas, una para realizar las extracciones y otra de colocación del injerto y 3 de control y toma de registros.

Por recomendación veterinaria se realizó una higiene oral antes de empezar el protocolo quirúrgico

Figura 12. *Minipig* anestesiado

Antes de cada fase del procedimiento, el animal fue sedado con azaperona (4 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg) por via intramuscular. Posterioremente el animal fue

intubado con sonda orotraqueal. La anestesia se indujo y fue mantenida con propofol (4mg/kg) y isoflurano (1.5-2% con oxígeno).

Antes de cada intervención quirúrgica se realizó tratamiento antibiótico con cefalotina (22mg/kg) administrada de forma endovenosa. Con posterioridad el animal recibió terapia con analgésicos durante 5 días (meloxicam i.m. 0.4 mg/kg).

Después de la cirugía el animal recibió dieta blanda y se realizaron controles veterinarios para constatar el estado de bienestar del animal.

En la primera intervención se crearon unas áreas con defectos de volumen en las que posteriormente se pudieran realizar los injertos de la biomatriz. Para este fin, se extrajeron 4 dientes, todos de la mandíbula y se decidió no realizar ninguna actuación sobre maxilar superior para no comprometer la alimentación del *minipig* y de este modo minimizar los posibles riesgos veterinarios durante todo el proceso.

Los dientes extraídos fueron ambos terceros incisivos (I·3) y los terceros premolares(P·3).

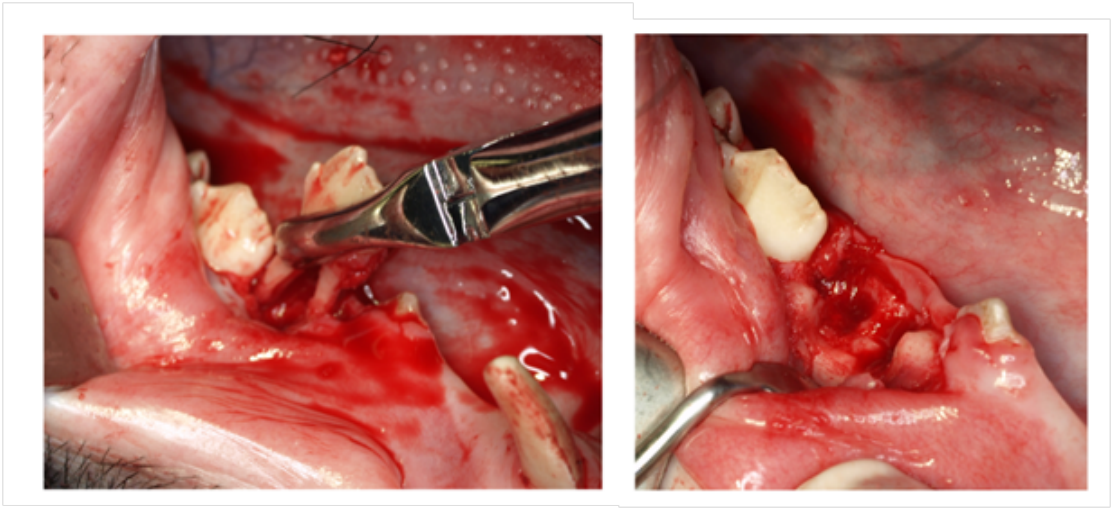

Figura 13. Extraccion del tercer premolar derecho.

Además, la mandíbula de este *minipig* presentaba una agenesia del primer premolar lo que ocasionaba un espacio edéntulo, situado a distal del canino y a mesial del segundo premolar (P·2) que también se consideraron como posibles zonas de injerto. Por lo que pudimos disponer de un total de 6 zonas de estudio. (figura 14)

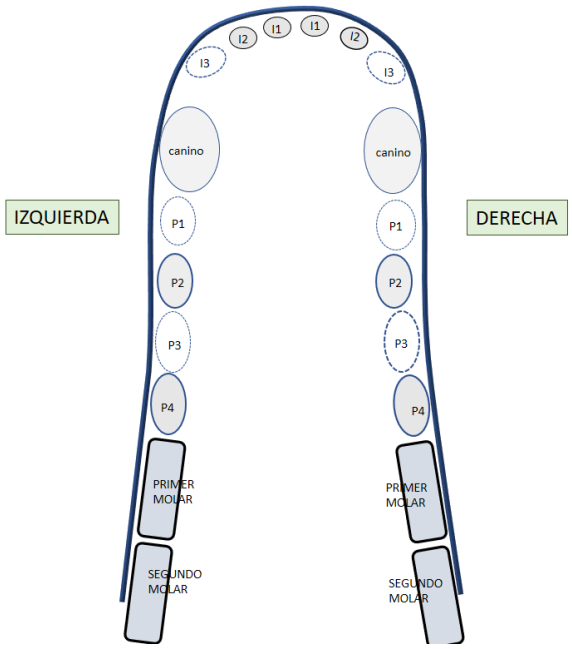

Figura 14. Esquema de las 6 zonas donde se realiza el estudio marcadas en blanco y línea discontinua.

Las extracciones fueron realizadas con levantamiento de colgajo mucoperióstico a espesor total, y con la clara intención de dejar defectos evidentes de volumen cuando cicatrizasen. Las heridas se cierran por aproximación con sutura monofilamento se 3/0 absorbible (Monosyn 3/0, B. Braun, Barcelona, España).

En el *minipig* las zonas distales al tercer premolar son de muy difícil acceso por las limitaciones en la apertura de la cavidad oral que presenta y con una zona vestibular muy corta que se continúa con la mucosa yugal, por lo que consideramos estas zonas posteriores como no aptas para el estudio y lo limitamos a la zona desde el tercer premolar hacia el exterior

Se esperó un periodo de cicatrización de 2 meses para la correcta curación de las heridas.

Después de este periodo de cicatrización, se realizó una segunda actuación, que también fue quirúrgica y que fue considerada como la visita inicial que marca el punto de partida de todo el estudio. A este tiempo lo consideraremos, por tanto, T0.

En esta visita y antes de iniciar la intervención quirúrgica, se realizaron los registros iniciales basales, mediante impresiones y fotografías, que se deberan correlacionar durante todo el estudio,

Figura 15. Fotografia del defecto creado ya cicatrizado en zona del tercer premolar izq. antes de realizar el injerto de Neofibrina®.

Después de la toma de registros se procedió a la intervención quirúrgica para la inserción de las biomatrices, bajo el mismo protocolo anestésico y medicamentoso.

La técnica quirúrgica consistió en realizar incisiones a espesor parcial de aprox. 1.5 – 2 cm, y con instrumentación crear unos sobres para albergar totalmente la matriz. Las matrices fueron introducidas en el lecho quirúrgico y no se precisó de suturas para fijarlas y se estabilizaron con el cierre y la sutura de las heridas.

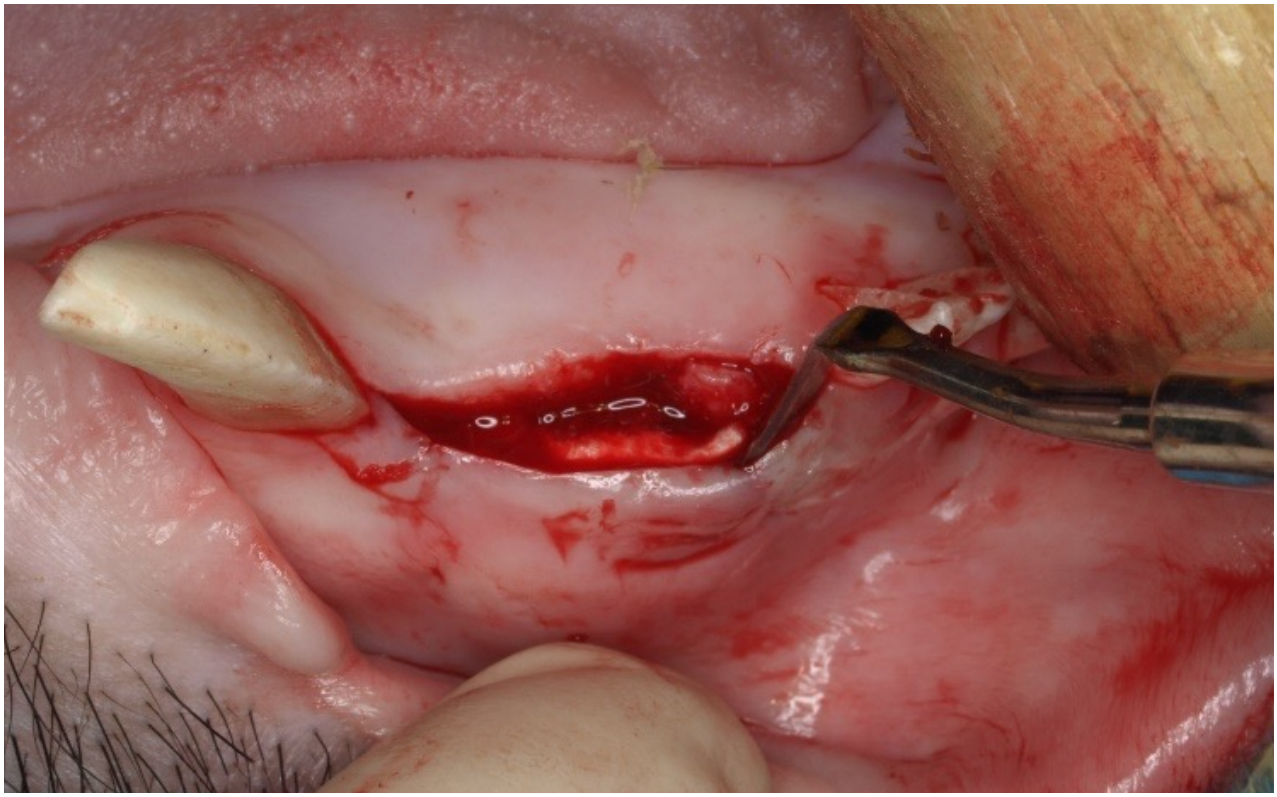

Figura 16. Inserción de neofibrina en incisión en sobre de tejido gingival

Con la técnica quirúrgica empleada, la biomatriz quedó totalmente enterrada en la encía, a fin de evitar la posible degradación por exposición a la cavidad oral. Durante toda la cirugía se pretendió que la encía que cubriera el injerto fuera mayoritariamente encía adherida. De esta forma, se trató de reproducir las condiciones en que se realizan las intervenciones de aumento de volumen en la zona de la encía periimplantaria.

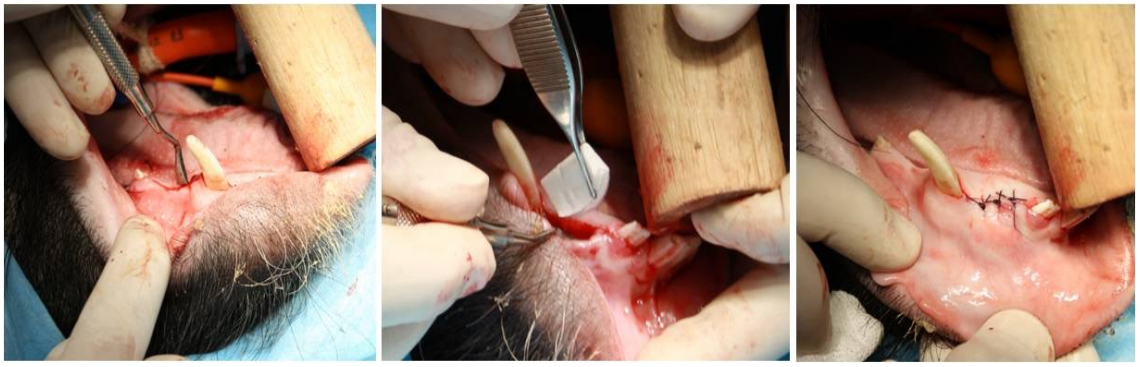

Figura 17. Cirugía de inserción de Neobrina en zona 4.

Posteriormente las incisiones fueron suturadas completamente con sutura de puntos simples que fijaron el injerto y cerraban totalmente la incisión. Se utilizó también sutura monofilamento 3/0 reabsorbible (Monosyn 3/0, P Braun, Barcelona, Spain) como se observa en la Figura 17.

Se disponía de 6 áreas para injertar y se decidió aleatoriamente dejar una de control y en las otras 5 probar la biomatriz hidratada y sin hidratar y a espesor normal (Neofibrina 1) y a doble espesor (Neofibrina 2). Por lo tanto, se establecieron 6 zonas de estudio para cada visita, que quedaron definidas de la siguiente manera y que así serán denominadas a partir de este momento (Figura 18):

- ZONA CONTROL: Correspondiente al primer premolar izquierdo agenésico. En esta zona no se realizó ninguna inervención.

- ZONA 1: Correspondiente a la zona del tercer incisivo izquierdo. Se injertó Neofibrina 2 hidratada.

- ZONA 2: Correspondiente al tercer premolar izquierdo. Se injertó Neofibrina 1 no hidratada.

- ZONA 3: Correspondiente al tercer incisivo derecho. Se injerto Neofibrina 1 hidratada.

- ZONA 4: Correspondiente al primer premolar derecho. Se injertó Neofibrina 2 no hidratada.

- ZONA 5: Correspondiente al tercer premolar derecho. Se injerto Neofibrina 1 no hidratada. En esta zona se cambió la técnica quirúrgica y se practicó un sobre a vestibular y a lingual colocando el injerto en silla de montar.

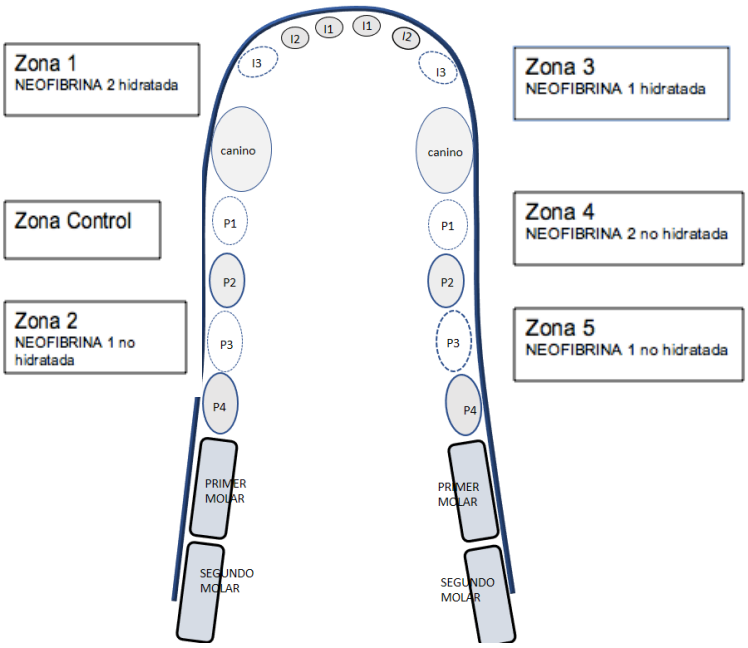

Figura 18. Esquema de la cirugía realizada en cada zona

Para valorar la evolución, se realizaron 3 visitas más. En todas se realizaron fotografías y se tomaron registros. En la primera, a los 15 días (T15) tras la intervención, visita en la que también se procedió a la retirada de puntos. La segunda a los 45 de la intervención (T45) y la tercera a los 3 meses (T90). En esta última visita, después de tomar los modelos de alginato, se extrajeron biopsias de aproximadamente 2x1 cm de todas las zonas estudiadas para su análisis histológico. Finalmente se procedió a la eutanasia del animal con una sobredosis de pentobarbital sódico.

5.4.- Protocolo de toma de registros

Para poder realizar un estudio comparativo de los grosores del tejido gingival del *minipig* necesitamos tomar unos registros en cada visita que pudieran ser superpuestos y analizados.

Para ello decidimos probar de hacer un escaneo de la boca del *minipig* en la fase previa a la colocación del injerto, con el escáner intraoral Planmeca PlanScan® (Planmeca, Finlandia). Sin embargo, surgieron dificultades técnicas debidas a las grandes diferencias anatómicas entre la boca del animal y la boca humana (principalmente la gran dimensión y curvatura que presenta el canino) que provocaba que el software de reconocimiento dental se bloqueara y no se consiguiera obtener una buena imagen volumétrica de la boca del *minipig*.

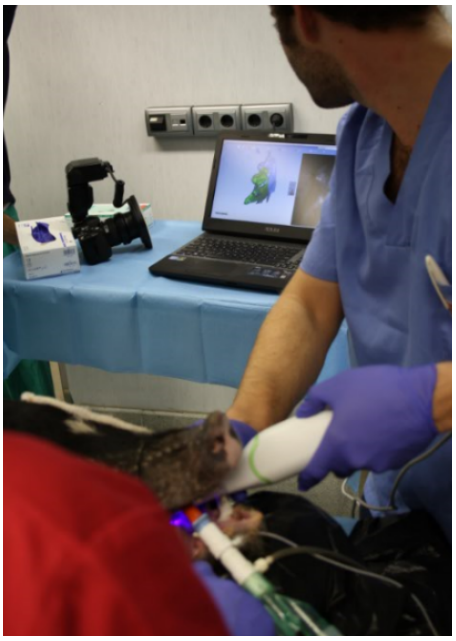

Figura 19. Imagen del escaneo de la boca del minipig.

También se tomaron modelos físicos de la boca del *minipig*. En primer lugar, se tomaron unos modelos con silicona de vinilpolixilosano (Virtual®, Ivoclar™, Liechtenstein) con la técnica de la doble impresión, primero con masilla *putty* y posteriormente con silicona fluida, con la intención de obtener unos modelos que permitieran la confección de unas cubetas individuales que se pudieran utilizar para todas las impresiones que fuera necesario realizar a partir de este momento.

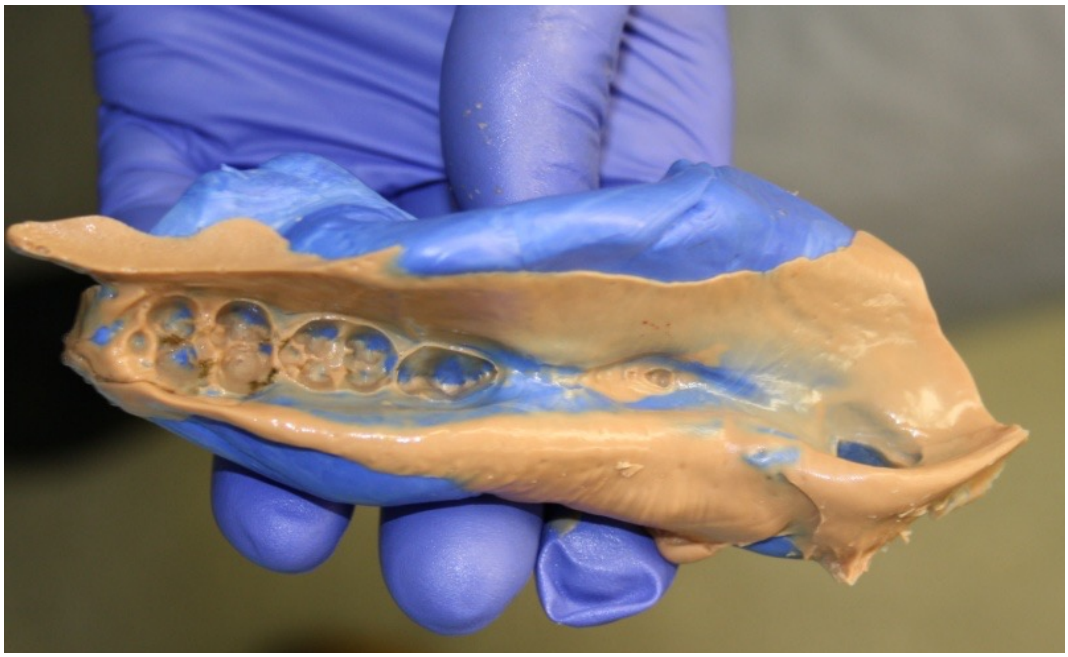

Figura 20. Impresión de polivinilsiloxano.

Las cubetas individuales fueron realizadas en resina fotopolimerizable de cubetas Triad® (Dentsply). Se hicieron cubetas de hemiarcada, lo que supone que de cada paso había que tomar dos impresiones, una derecha y otra izquierda. Se tomó la decisión de hacer impresiones de hemiarcada debido al enorme disparalelismo que se observa en los dientes del *minipig*, que hacen totalmente imposible tomar unas impresiones de arcada entera sin que se produzcan desgarros o arrastres del material. El material que se usó para tomar las medidas con las cubetas individuales fue siempre el alginato (Cavex CA37, Cavex Holland, Netherland), por considerar que es el material que mejor reproduce las partes blandas. Todas las impresiones son vaciadas a yeso piedra GC Fujirock® (GC Corporation, Japan), dentro de las 2 horas siguientes a haberse realizado.

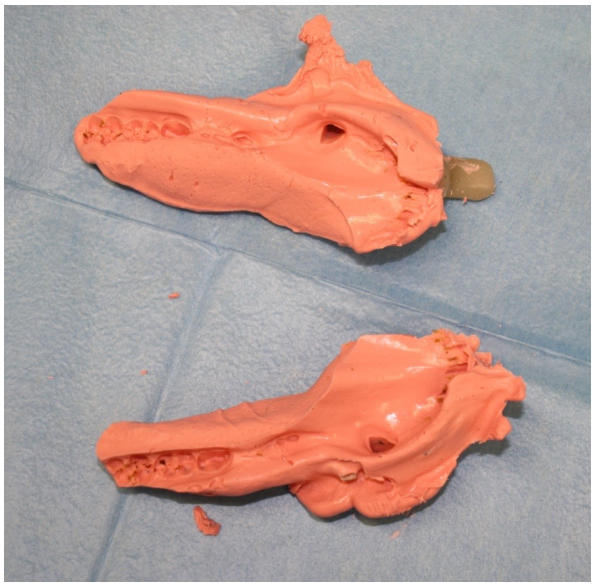

Figura 21. Impresiones de alginato

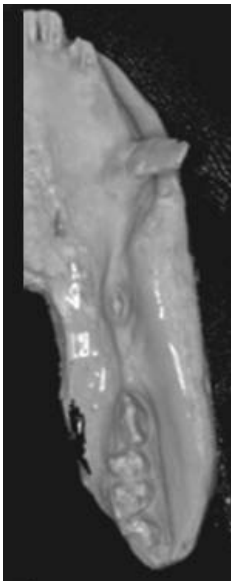

Figura 22. modelo de hemiarcada.

. En total se obtuvieron 8 modelos, 2 (uno derecho y uno izquierdo) para cada una de las 4 fases del estudio.

Todos estos modelos fueron escaneados con un escáner de laboratorio 3Shape 900L, Lab Scanner (3Shape A/S, Copenhagen, Denmark) obteniéndose 8 imágenes volumétricas en forma de archivos *stl*, de estructura de mallas. Mediante el software Ortho Viewer Scanning Program (3Shape A/S, Copenhagen, Denmark), los archivos obtenidos son cerrados por la base, mediante un zocalado virtual. De este modo se consiguió tener una estructura cerrada en 3 dimensiones que permitió ser analizada (Figura 23).

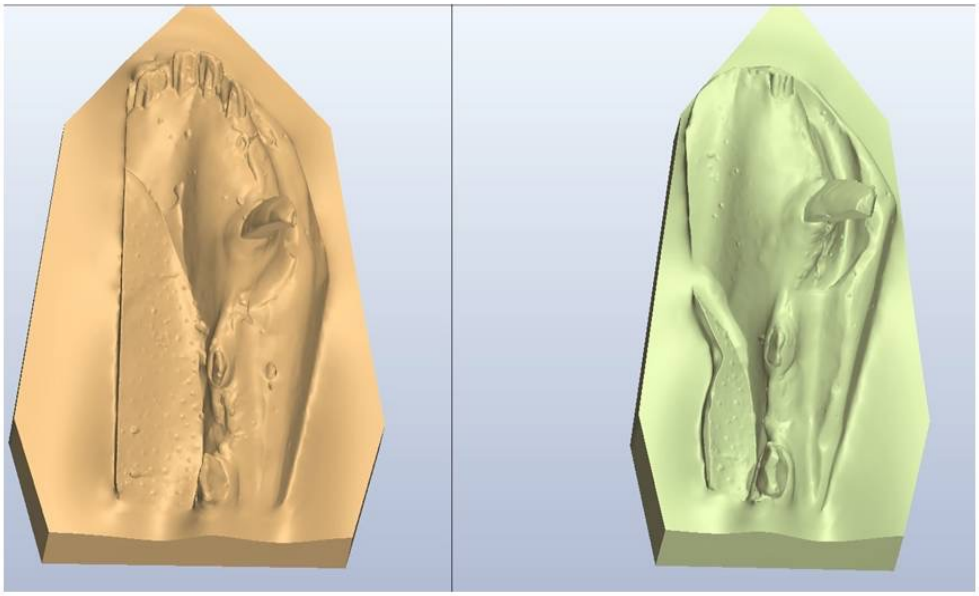

Figura 23. Dos archivos STL de hemiarcada, zocalados virtualmente, preparados para su superposición

Se fue estudiando la evolución de cada zona quirúrgica a lo largo de todo el estudio. El archivo tridimensional obtenido de cada zona quirúrgica se comparó con el archivo de la misma zona del periodo de observación inmediatamente posterior, de modo que el T0 se comparó con el T15, el T15 con el T45 y el T45 con el T90.

5.5.- Metodología para valorar la eficacia del injerto para aumentar el grosor del tejido gingival

Para valorar la eficacia de la Neofibrina® para el aumento de volumen del tejido gingival del *minipig* se valoraron los resultados tanto los cambios volumétricos como los resultados histológicos del nuevo tejido formado.

5.5.1.- Análisis volumétricos

Los 8 archivos obtenidos a partir del escaneado de las impresiones de las 2 hemiarcadas durante los 4 periodos de observación, fueron analizados con el software

Ortho Viewer Scanning Program (3Shape A/S, Copenhagen, Denmark) que permite la superposición de 2 archivos stl mediante la concordancia de puntos y/o de áreas.

El estudio de las superposiciones y las mediciones volumétricas se realizó a ciegas. El ingeniero informático responsable de las superposiciones y las mediciones no participó en el diseño del estudio, ni conocía los objetivos del trabajo ni el valor que podían suponer los resultados obtenidos.

Se realizaron las superposiciones de los archivos comparando T0 con T15, T15 con T45, y T45 con T90. Para conseguir una mejor superposición de los modelos, cada área de estudio fue superpuesta individualmente.

En la superposición de volúmenes se pueden dar resultados volumétricos y perfilométricos (Gonzalez-Martín y cols. 2104). En el estudio del *minipig* se detectaron dificultades, principalmente para poder cerrar el área concreta a estudiar. Las diferencias, principalmente en la zona de encía libre, entre una impresión y otra, hacían imposible que, al superponer los modelos, la diferencia de volumen fuera totalmente contenida y de este modo poder obtener una diferencia expresada en un archivo tridimensional que pudiera ser cuantificado en unidades de volumen.

Al no poder cerrar la malla en la superposición de los modelos no se pudieron obtener resultados en unidades volumétricas, por lo que solamente, se realizó el estudio perfilométrico. En cada área se buscaba la máxima concordancia de los modelos y se hacían mediciones en la zona del injerto. De cada zona se obtenían 2 valores, intentado que coincidieran en la zona media del injerto y si se observaba poca concordancia se añadía un tercer valor.

Las superposiciones se realizaron mediante la concordancia de puntos fijos que se buscaban en los dientes adyacentes y de áreas concordantes. Los puntos preferidos estaban en los dientes adyacentes y las áreas de referencia eran superficies dentales de los dientes adyacentes y zonas de encía adherida no influenciadas por el procedimiento quirúrgico. Una vez obtenida la mejor superposición posible en cada zona, se realizaba un corte perfilometrico que permitía ver un gráfico en el que se observaban los perfiles de ambos modelos. Para interpretar correctamente el gráfico era conveniente descartar las zonas de los extremos, influidas por la mejilla y la lengua y también del zocalado, y ceñirse solamente a la zona de encía adherida y de este modo poder observar la zona de concordancia de modelos y el efecto del injerto.

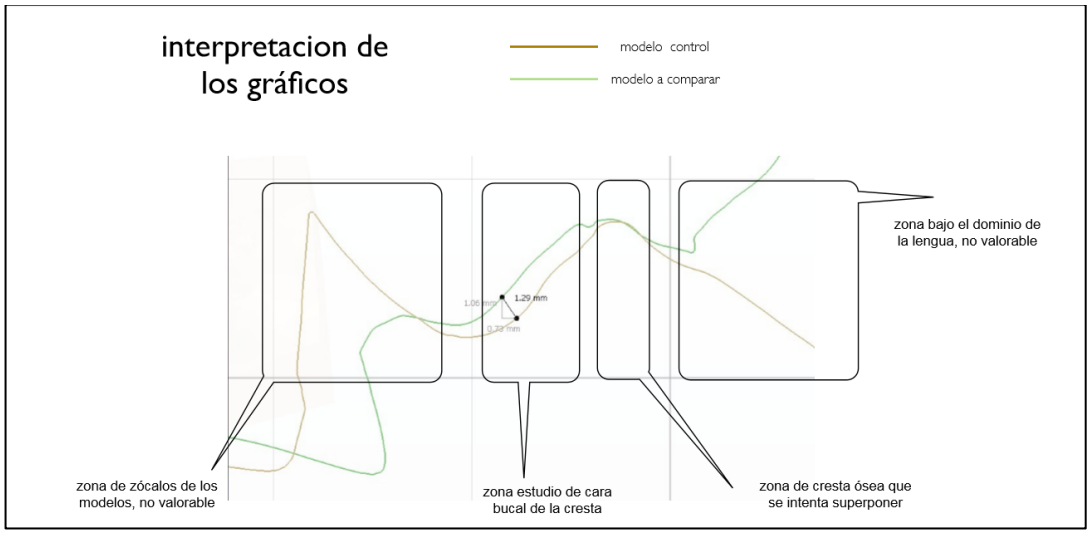

Figura 24. Esquema explicatorio de la interpretación de los gráficos perfilometricos.

A partir de cada una de estas superposiciones se analizaron las 6 áreas injertadas. De cada superposición se toman los valores en la misma zona en todas las mediciones, que se buscó que coincidiera con la zona media del defecto que era donde se había realizado el injerto.

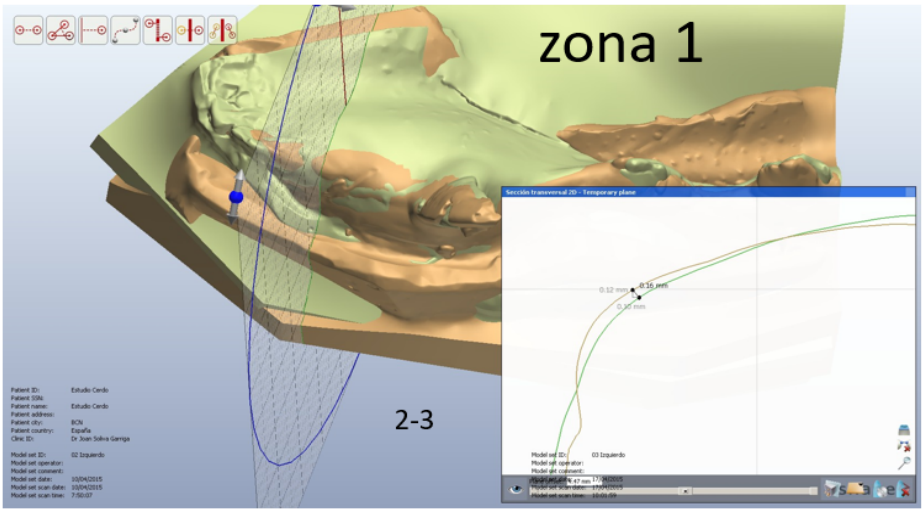

Figura 25. Esquema que sitúa el corte del perfil en la zona media del defecto.

De los resultados obtenidos en cada zona se realizó la media y la desviación estándar. También de cada periodo de tiempo que fue analizado, se realizó la media y la desviación estándar.

5.5.2.- Análisis histológico.

En la visita final se procedió a la extracción cuidadosa de unas muestras de tejido gingival de aproximadamente 2x1cm para su análisis histológico. Se tomaron muestras de todas las zonas quirúrgicas, así como de la zona control.

Las muestras fueron fijadas con formol al 10% y se incluyeron en parafina. Posteriomente se realizaron cortes de 4 µm y tinciones con hematoxilina-eosina para su evaluación.

Resultados

6.- Resultados

6.1. Resultados in vitro de la biomatriz.

La matriz de Neofibrina® fue sometida a un estudio *in vitro* para valorar su permeabilidad a los fibroblastos y su capacidad para ser o no colonizada por estas células. El objetivo que se pretendía era poder definir mejor las características de la matriz y el mecanismo de actuación de la membrana para conseguir aumentar el grosor del tejido conectivo.

6.1.1 Estudios de permeabilidad de la Neofibrina® a los fibroblastos.

Los fibroblastos obtenidos por digestión enzimática mostraron una viabilidad superior al 98%, obteniéndose una gran cantidad de células fusiformes y adheridas al fondo de la placa, como se puede observar en la figura 25.

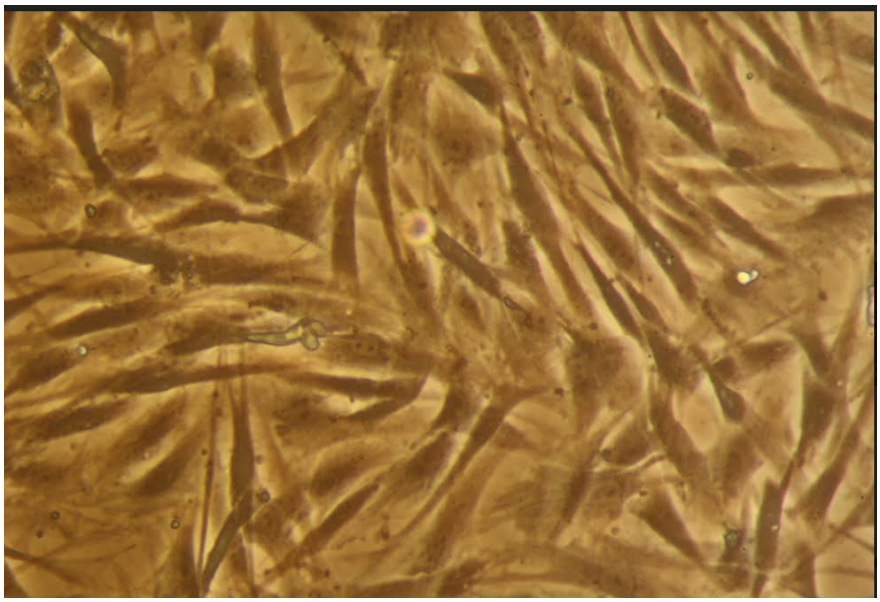

Figura 25. Imagen del cultivo de fibroblastos.

6.1.1.1. Resultados histológicos del estudio de la biomatriz de Neofibrina®

Histológicamente la biomatriz de Neofibrina® corresponde a una estructura macroporosa, intensamente eosinófila, que forma celdillas irregulares (fig 26).

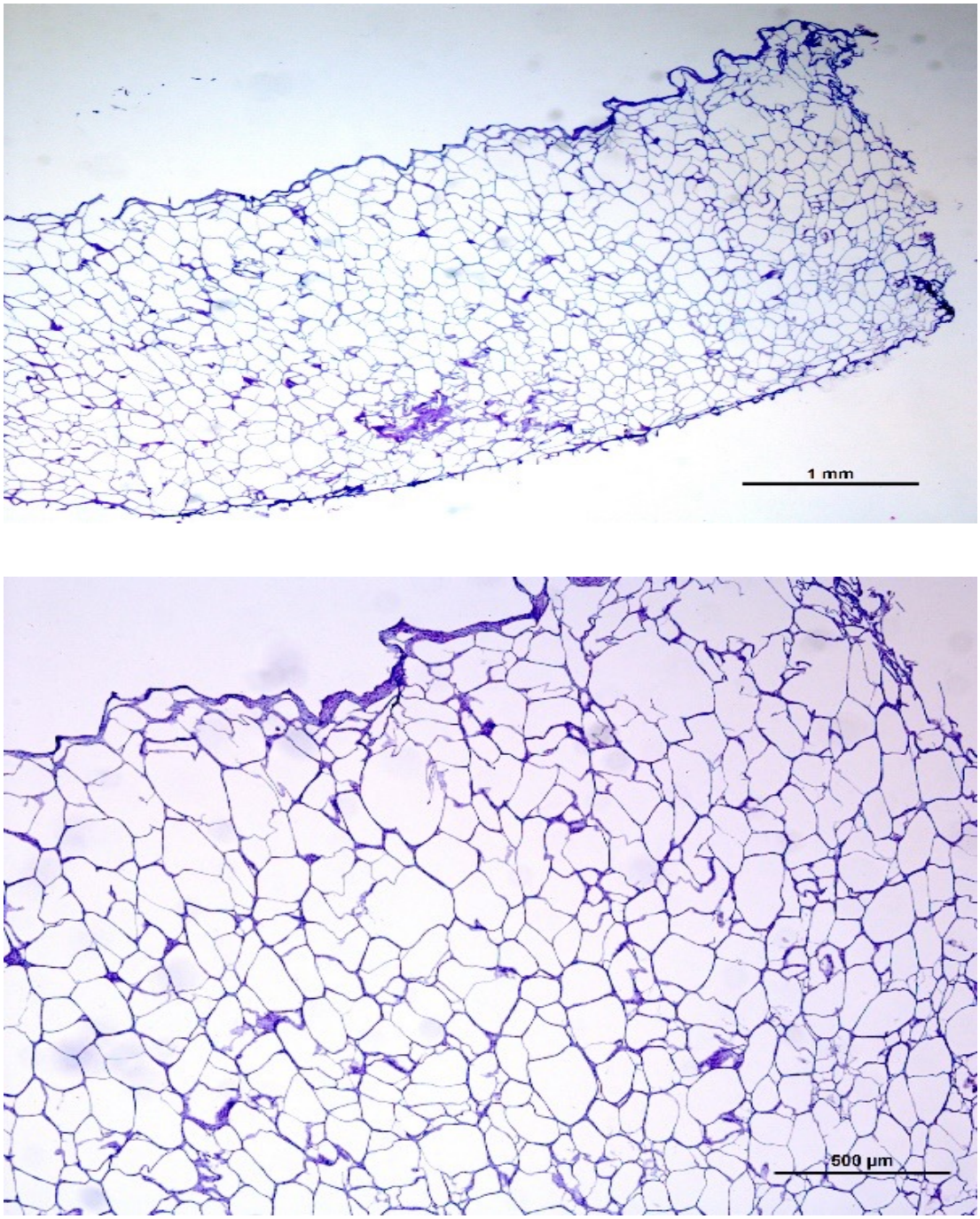

Figura 26. Neofribrina® 24h de cultivo. Estructura macroporosa (H&E).

En la periferia de todas las muestras de Neofibrina se observó una banda más densa con material de aspecto compacto (fig 27 y fig 28). Esta estructura macroporosa con condesación en la periferia mantenía el mismo aspecto histológico a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

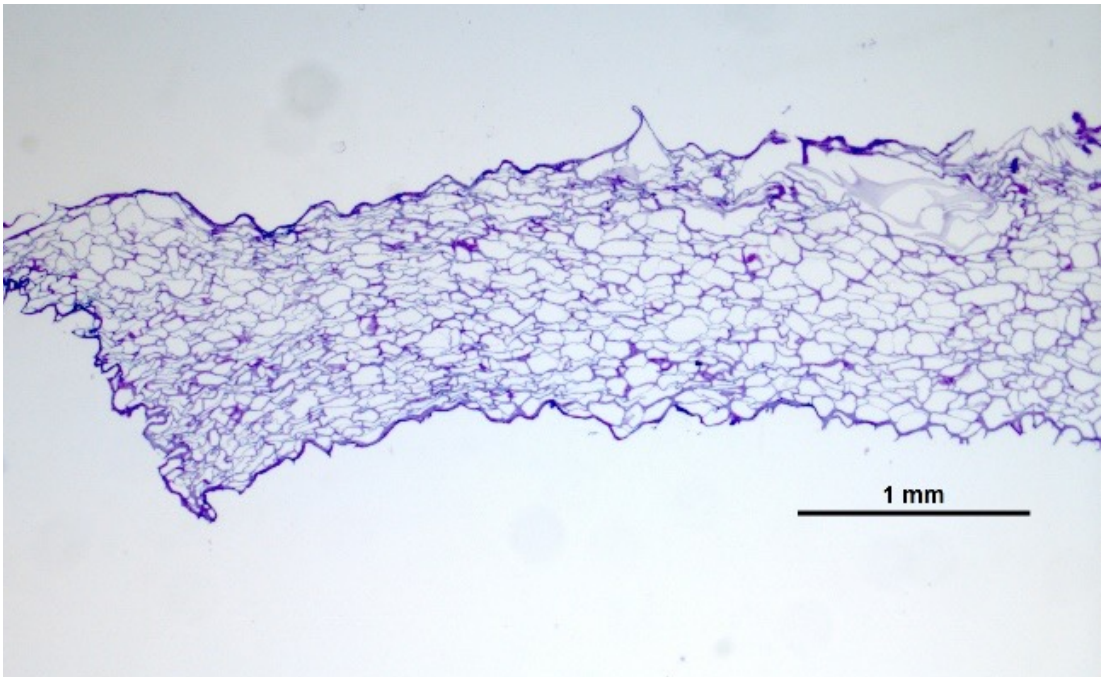

Figura 27. Neofribrina. Estructura macroporosa con una banda densa de material de aspecto compacto en la periferia (H&E).

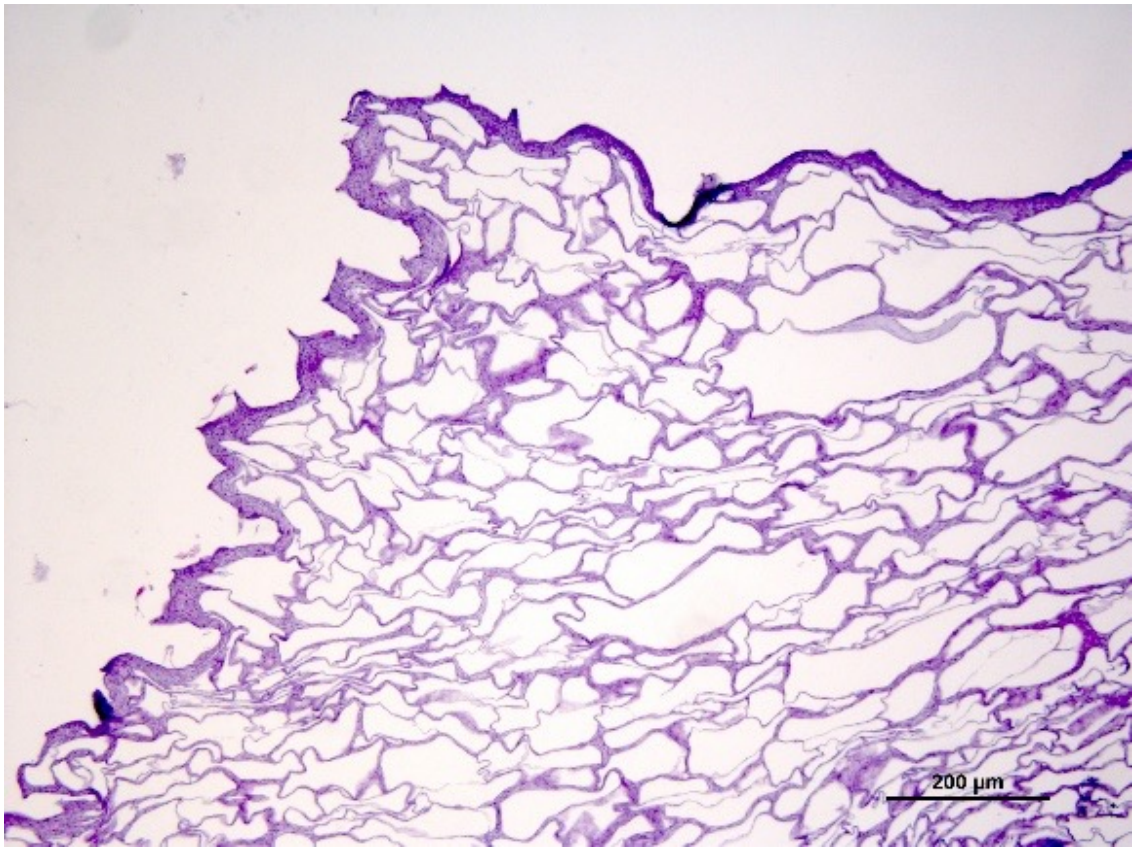

Figura 28. Neofribrina. Estructura macroporosa con una banda densa de material de aspecto compacto en la periferia (H&E).

6.1.1.2. Resultados histológicos de los cultivos de fibroblastos en la biomatriz de Neofibrina®.

En las muestras de Neofibrina® cultivadas con fibroblastos se observaron muy pocas células a las 24, 48 y 72 horas. En todos los casos estas células estaban en la periferia, y en ningún caso se observó crecimiento en las zonas centrales (fig 29 y fig 30). En las zonas que coincidía con los cortes efectuados a la matriz y en las que no estaba presente la zona periférica más compactada, tampoco se observaron fibroblastos en las zonas interiores.

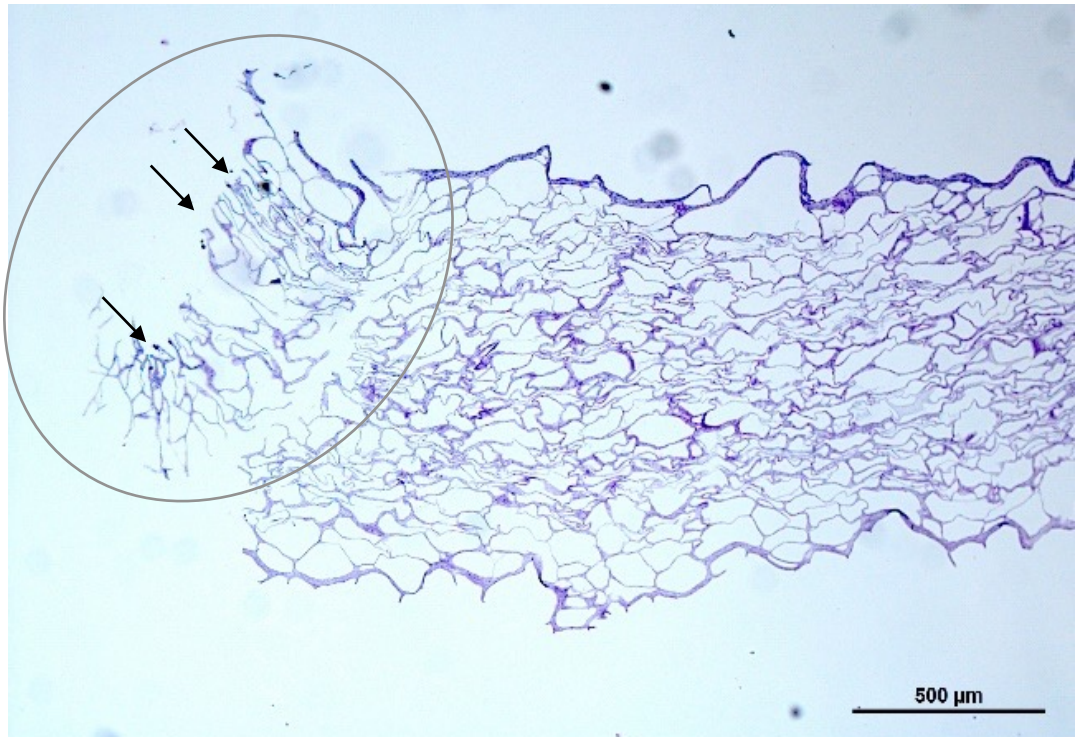

Figura 29. Neofribrina® 48h de cultivo. Estructura macroporosa con fibroblastos (→) en el margen izquierdo (H&E).

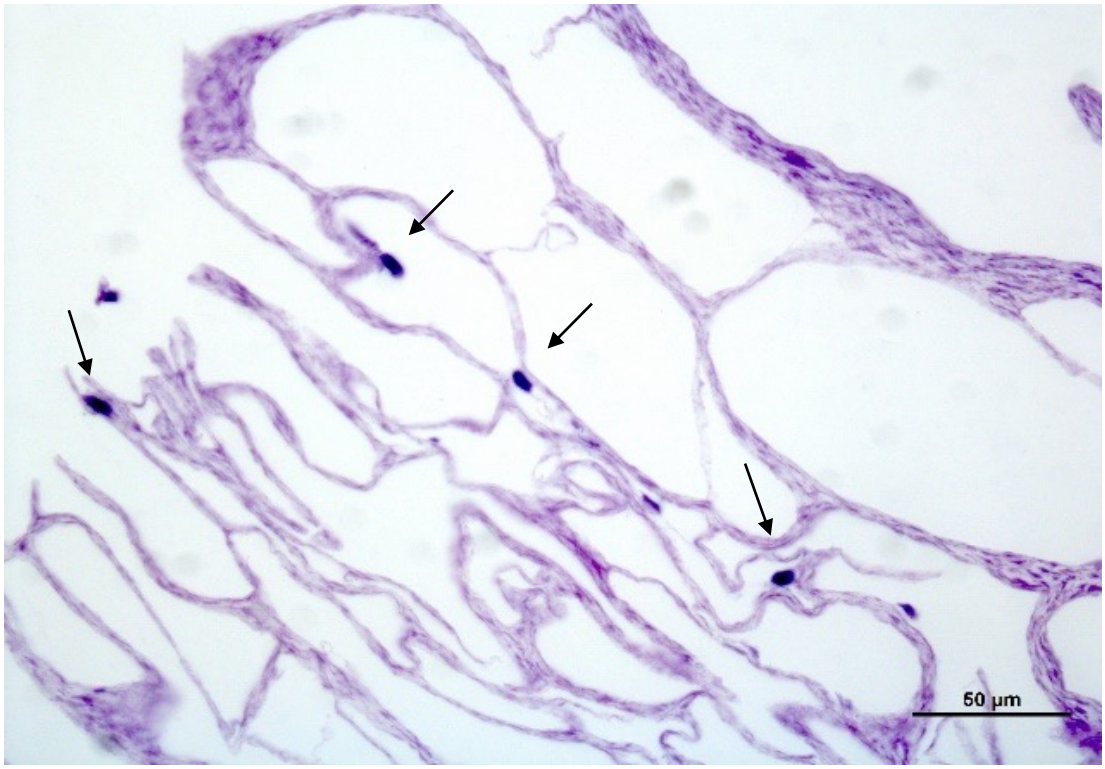

Figura 30. Neofribrina® 48h de cultivo. Fibroblastos (→) en los márgenes de la muestra, adheridos a los septos de la estructura macroporosa (H&E).

6.2 Resultados del procedimiento quirúrgico.

El *minipig* toleró perfectamente todas las intervenciones quirúrgicas y no hubo ninguna incidencia resaltable durante todo el estudio. Al limitar el estudio a una arcada la calidad de vida del animal quedó poco comprometida. El *minipig* no presentó ningún problema durante la cirugía de las extracciones y la de colocación de los injertos y aceptó perfectamente la dieta blanda tras ambos procedimientos.

La cirugía de inserción de la biomatriz fue realizada con una incisión a espesor parcial hasta encía libre para poder movilizar mejor el colgajo. Se decidió probar la MFA hidratada y sin hidratar y resultó mucho más fácil de manipular sin hidratar. La matriz hidratada perdía consistencia y era más friable y en el proceso de introducción en el sobre creado en la encía, se doblaba y retorcía, mientras que cuando era sin hidratar presentaba una consistencia adecuada que facilitaba la inserción.

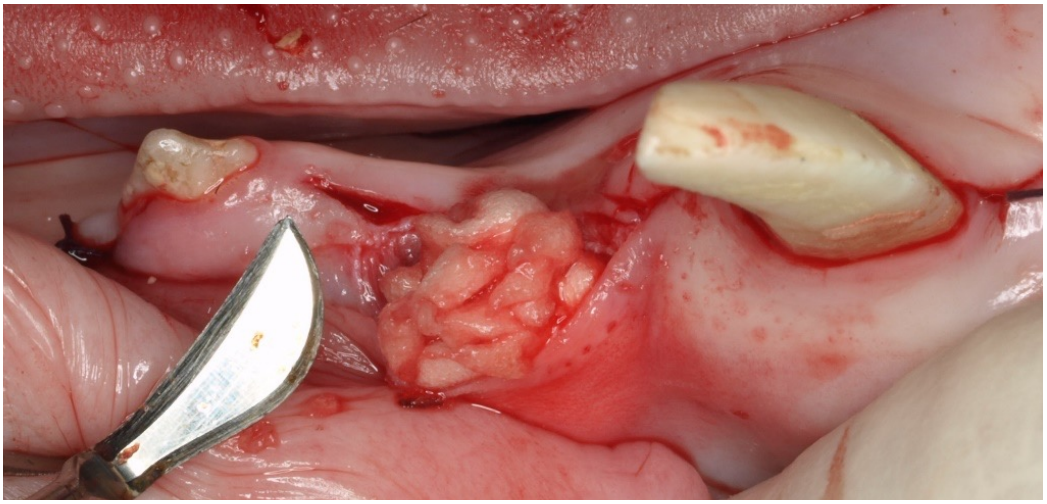

Figura 31.- Inserción de neofibrina hidratada donde puede observarse su fragilidad.

Se realizaron pruebas sobre la capacidad de sutura de la MFA. La Neofibrina® una vez hidratada se rompía más fácilmente y se perdía toda posibilidad de estabilizar o maniobrar el injerto mediante la sutura. Por su parte, la Neofibrina® sin hidratar presentaba una consistencia superior que facilitaba tanto su inserción, que no era

necesario traccionar con sutura. Una vez colocada en su sitio se podía estabilizar mediante sutura.

Después de la cirugía, la cicatrización fue perfecta en 4 de los 5 lechos quirúrgicos. En la zona 6 hubo una discreta falta de cierre primario de la herida por fallo de sutura durante el postoperatorio, pero la herida cerró por segunda intención, sin ningún problema.

A los 15 días se retiraron las suturas y se observó que el aspecto de las heridas era muy bueno, sin presencia macroscópica de ningún signo inflamatorio.

Figura 32. Fotografía del aspecto de la cicatrización de la zona 3, a los 15 días, antes de retirar los puntos de sutura.

6.3. Resultados volumétricos.

Los resultados volumétricos se obtuvieron a partir del tratamiento digital de la superposición de los archivos *stl* creados a partir del escaneo de modelos físicos.

De los intentos de realizar escaneos directos intraorales (figura 33) se observó que el software tenía prediseños específicos para bocas humanas que eran demasiado diferentes a los que presentaba el *minipig*. La forma de los dientes y en especial del canino, así como la longitud de la arcada eran tan diferentes a la arcada humana que dificultaban muchísimo una correcta integración de las imágenes obtenidas. Los resultados que se obtenían eran solo una parte de la arcada y con problemas para escanear correctamente el fondo de vestíbulo por lo que se decidió no seguir el estudio mediante imágenes de escaneo directo.

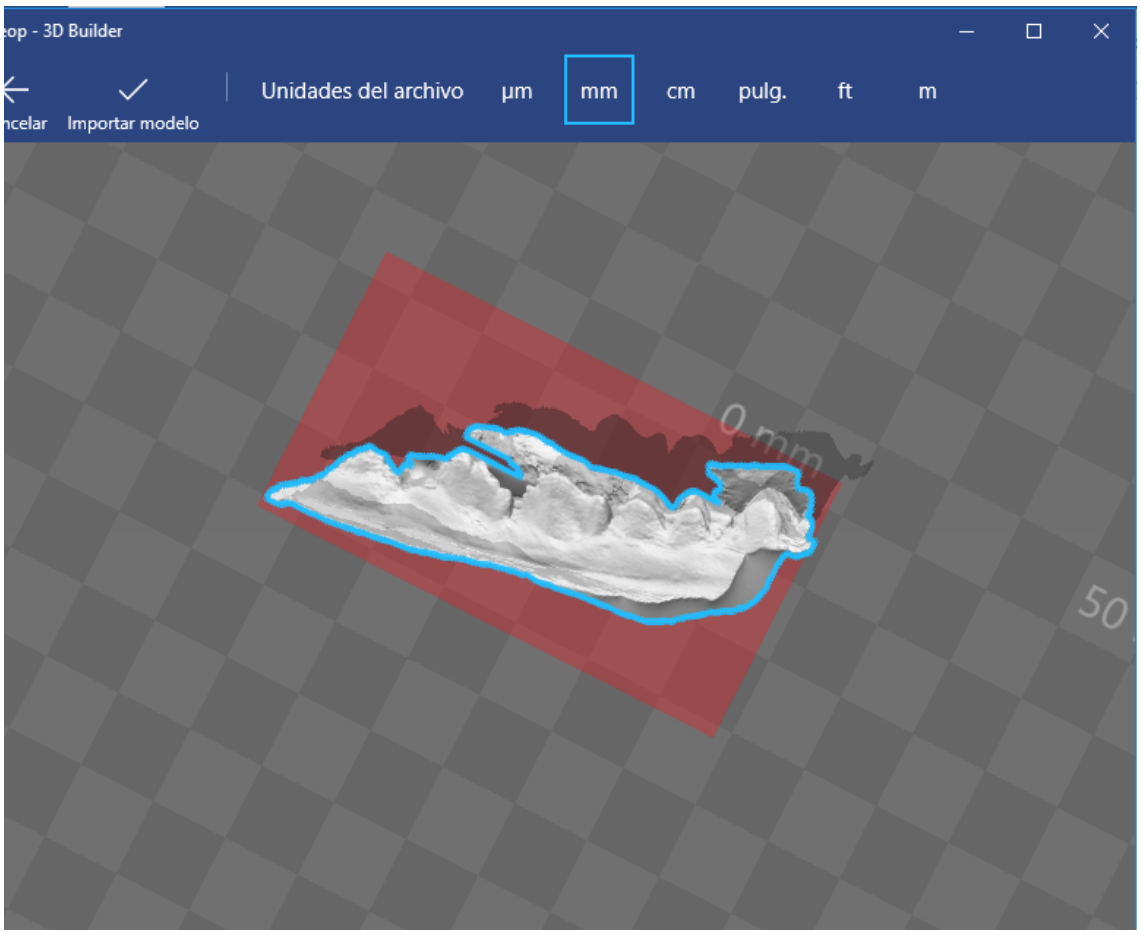

Figura 33.- Archivo stl obtenidos por escaneado directo de la boca del minipig.

Por este motivo, se decidió trabajar solo con modelos físicos obtenidos a partir de impresiones de ambas hemiarcadas inferiores. La boca del *minipig* presenta unas dificultades técnicas para poder obtener buenas impresiones: es una mandíbula muy estrecha, los dientes presentan una gran divergencia, la capacidad de apertura es limitada y la presencia de la lengua y del tubo de intubación anestésica también interfieren.

A pesar de las dificultades mencionadas, se obtuvieron 8 modelos de buena calidad, con un solo problema debido a una rotura accidental del yeso. Este hecho ocasionó una zona de falta de definición suficiente para poder realizar mediciones, en la Zona 1 del T0.

Figura 34.- Modelos en yeso (n=8) de las hemiarcadas inferiores.

A partir de los modelos se realizaron los escaneados obteniéndose modelos virtuales. Usando el mismo software que se utilizó posteriormente para las superposiciones, se procedió al zocalado virtual, cerrando de este modo la red de mallas y de este modo conseguir un modelo tridimensional en forma de archivo *stl.*

Con el software se fueron superponiendo los modelos intentando en todo momento corregir las dificultades técnicas y buscando la máxima correspondencia de áreas. Así, cada una de las 6 zonas estudiadas fue superpuesta individualmente y no toda la hemiarcada en bloque. De este modo se intentó minimizar las pequeñas

distorsiones volumétricas de las impresiones y de los vaciados en yeso de unos modelos que tenían una forma tan estrecha y larga.

6.3.1 Incremento de volumen entre T0 y T15

De la primera superposición de los modelos previos a la cirugía, a tiempo 0 (T0), y los obtenidos al cabo de 15 días (T15), se obtuvieron las siguientes mediciones:

Tabla 1. Incremento experimentado en el volumen gingival entre los días 0 y 15 tras la intervención quirúrgica en cada una de las áreas estudiadas.

INCREMENTO DE VOLUMEN ENTRE T0 Y T15				
Zona	**Material**	**Volumen (mm)**		**X ± SD**
Control	No	0,0	0,0	0,0
1	Neo 2H	----	----	----
2	Neo 1NH	1,29	1,02	1,16 ± 0,2
3	Neo 1H	0,47	1,19	0,83 ± 0,5
4	Neo 2NH	1,15	2,82	1,99 ± 1,2
5	Neo 1NH	1,16	1,35	1,26 ± 0,1

En la zona 1, un accidente con el modelo en yeso provocó que el resultado no fuera valorable. Como se observa en la Tabla 1 la zona control (Figura 35) no experimentó ningún cambio de volumen, como era esperable mientras que en todas las zonas en las que se injertó la matriz objeto de estudio, se pudo apreciar un aumento de volumen proporcional al grosor de la matriz injertada.

A los 15 días tras la intervención la zona 3 (Neo 2H) mostró el mayor incremento de volumen, seguida de las zonas 4 y 2 (Neo 1NH), mientras que la zona 3 mostró el incremento menor. El hecho de hidratar o no la matriz previamente no tuvo una influencia a la hora de incrementar el volumen del tejido.Sin embargo, en la zona 4, donde se injerto la matriz con el doble de grosor, el aumento de volumen fue evidente.

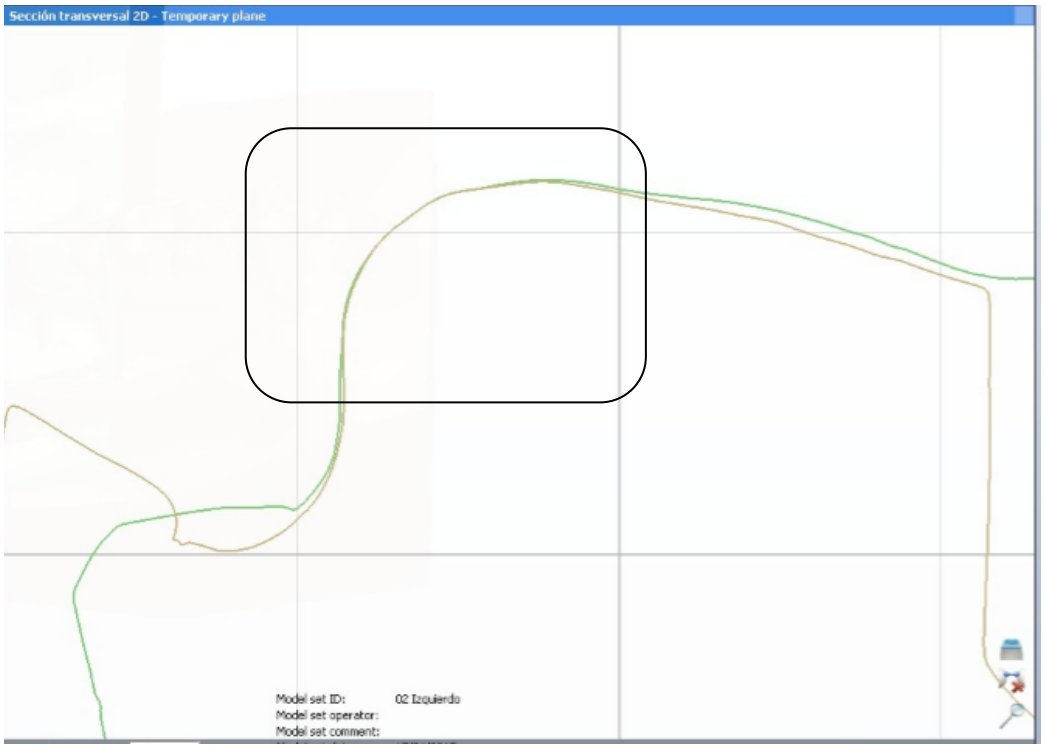

Figura 35. Superposición de la zona control, encuadrando la zona a estudiar. Se puede apreciar la concordancia entre T0 (trazo marrón) con T15 (trazo verde) de ambos modelos

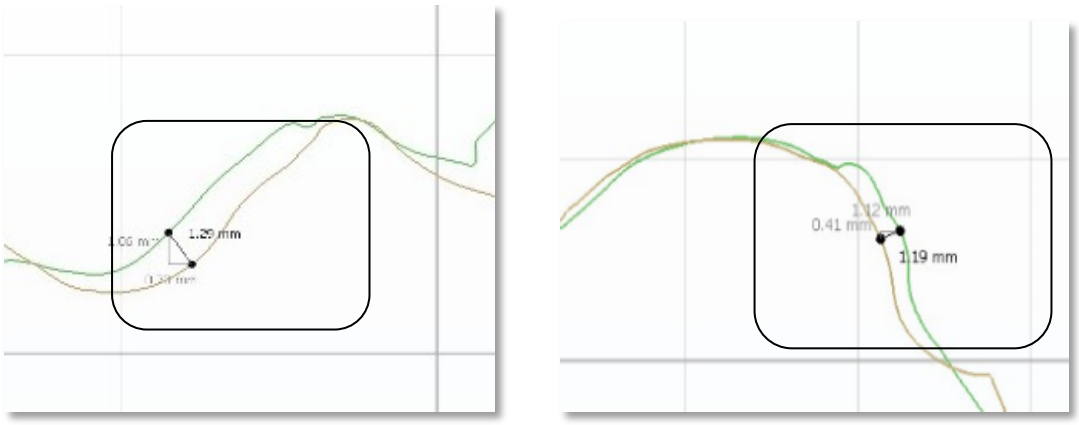

Figura 36. Resultado perfilométrico de las zona 2 y 3, comparando T0 (trazo marrón) con T15 (trazo verde). Encuadre de las zonas sometidas a estudio. Se muestra una gráfica por cada zona del estudio.

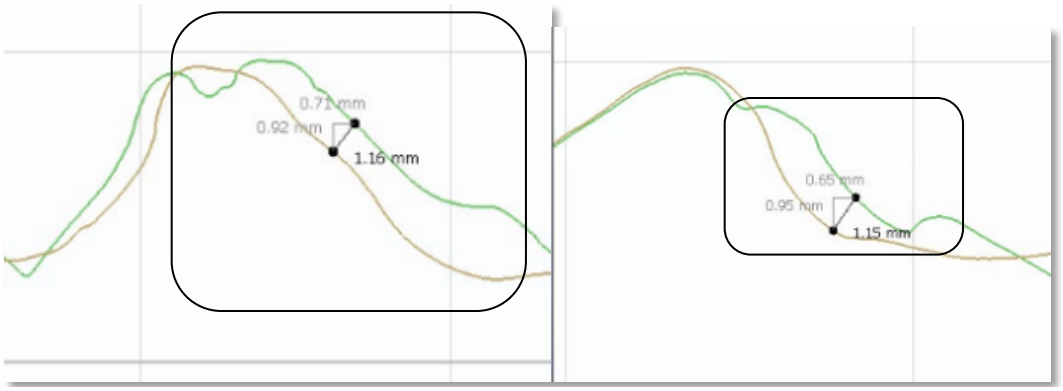

Figura 37. Resultados de la superposición T0 -T15 en zona 4 y 5. Encuadre de las zonas sometidas a estudio. Se muestra una gráfica por cada zona del estudio

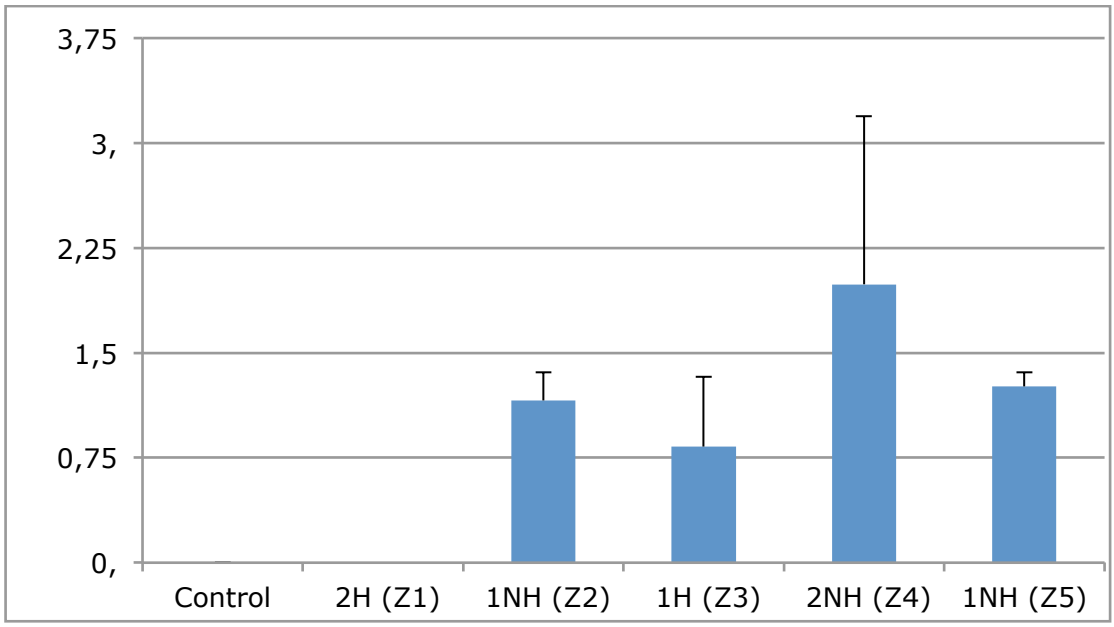

Figura 38. Representación gràfica de los valores obtenidos 15 días despues del injerto del biomaterial en las diferentes zonas de la mucosa oral del *minipig*.

En la figura 38, es fácilmente observable como en las 4 zonas valorables hay un incremento evidente de volumen que es más manifiesto en la zona 4, correspondiente a la zona que se injertó Neofibrina® de 2 mm no hidratada,

6.3.2. Incremento de volumen entre T15 y T45

La segunda superposición se llevó a cabo con los perfiles obtenidos 15 días después de la cirugía (T15) y un mes más tarde, a los 45 días (T45), a partir de la superposición y comparación de ambos resultados en las diferentes áreas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2.- Resultados de los cambios de volumen entre T15 y T45.

CAMBIOS DE VOLUMEN ENTRE T15 – T45					
Zona	Material		Volumen		X ± S.D.
Control	No	0,0	0,0		0,0
1	Neo 2H	-0,14	-0,16		-0,15 ± 0,01
2	Neo 1NH	-0,27	0,2	-0,31	-0,13 ± 0,3
3	Neo 1H	0,0	-0,14		-0,07 ± 0,1
4	Neo 2NH	-0,2	0,14		-0,03 ± 0,2
5	Neo 1NH	-0,68	0,5		-0,09 ± 0,8
Media					-0.10 ± 0.30

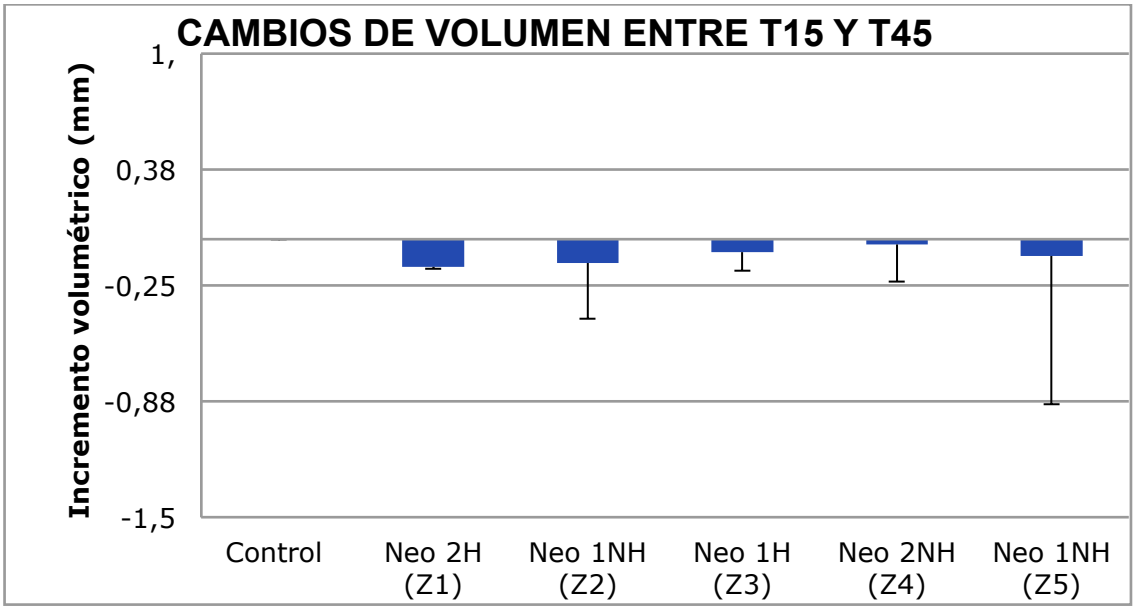

Figura 39. Resutados de los cambios de volumen entre T15 y T45 expresado en diagrama de barras. En esta gráfica se observa una ligera contracción en todas las zonas.

La media de todas las mediciones de esta segunda superposición reflejó una pérdida de -0.10 mm ± 0,30 con una n=11, descontado la zona control.

.

En el diagrama de barras (figura 39) se pudo constatar una ligera pérdida de volumen que se aprecia en todas las zonas estudiadas.

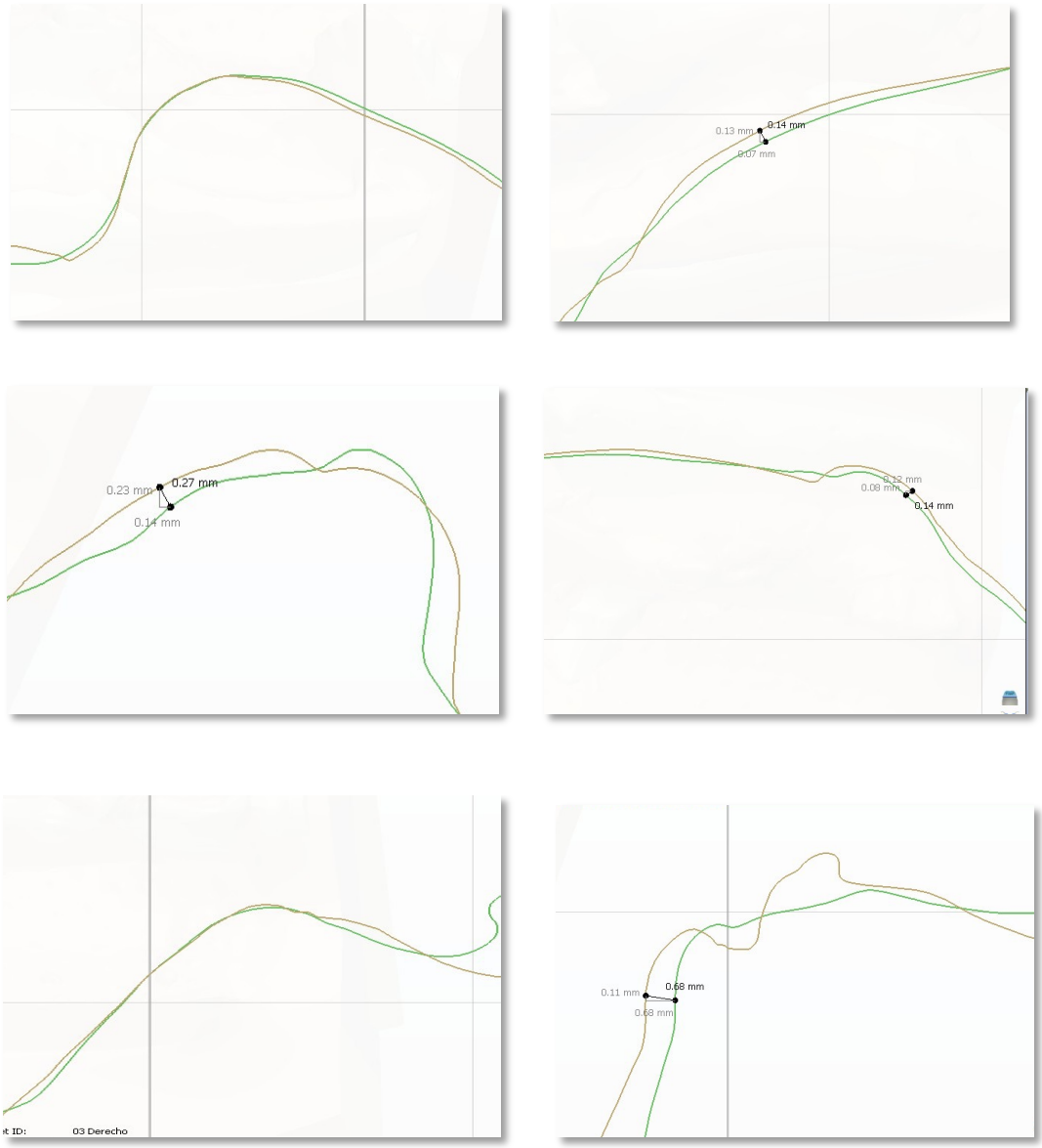

Figura 40. Imágenes de una superposición por zona de los perfiles de la zona control y de las zonas 1,2,3,4 y 5 respectivamente en las superposiciones entre T15 trazo marrón y T45 trazo verde. En la mayoría de las imágenes se observa un encogimiento de volumen.

6.3.3. Incremento de volumen entre T45 y T90

La tercera superposición se obtuvo comparando los modelos en T45 con T90, a los 3 meses de seguimiento, que fueron las mediciones que cerraron el estudio y se observaron los siguientes resultados que se exponen en la Tabla 3:

Tabla 3.- Resultados de las mediciones perfilométricas, de las diferentes zonas estudiadas, entre los 45 días de seguimiento y el control final del estudio a los 3 meses.

CAMBIOS DE VOLUMEN ENTRE T45 – T90				
Zona	**Material**	**Volumen**		**X ± SD**
Control	No	0.0	0.0	
1	Neo 2H	0.26	0.07	0.16 ± 0.13
2	Neo 1NH	-0.2	0.29	0,045 ± 0.35
3	Neo 1H	0.0	0.19	0.095 ± 0.13
4	Neo 2NH	-0.74	-0.12	-0.17 ± 0.54
5	Neo 1NH	0.14	-0.37	-0.11 ± 0.36
Media				**-0.01 ± 0.32**

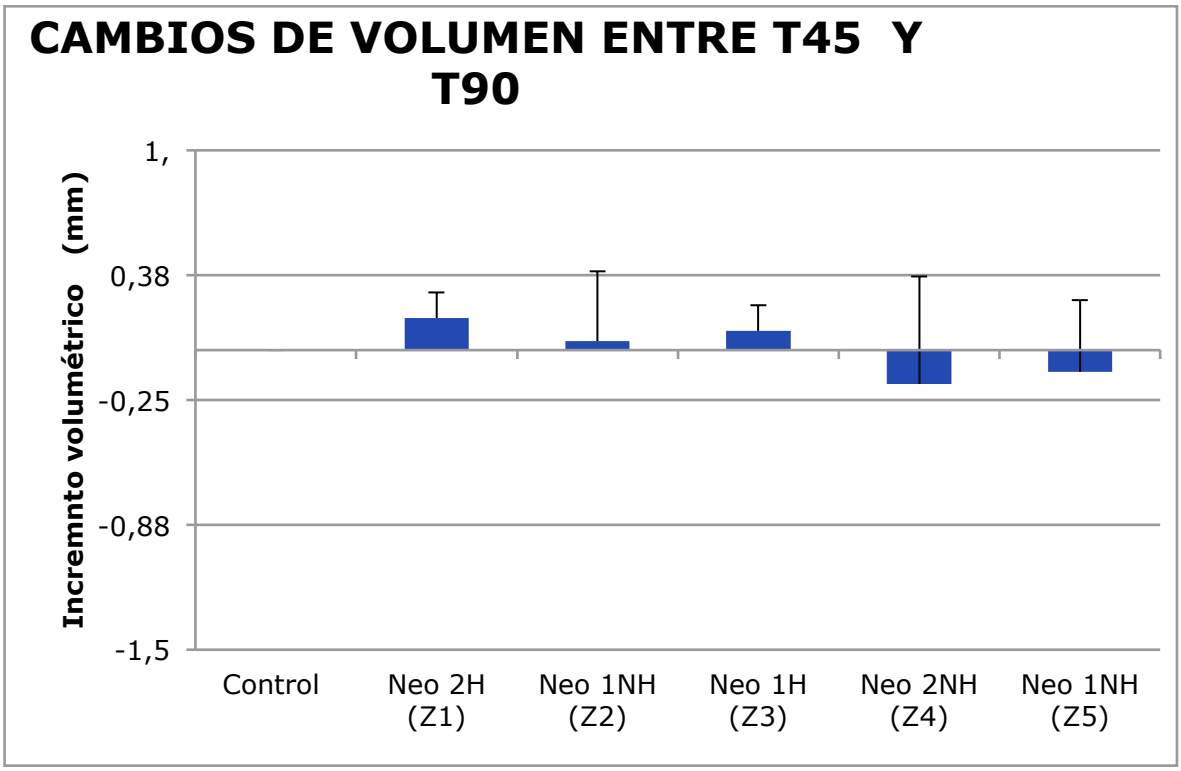

Figura 41. Resultados de los cambios de volumen entre T45 y T90 expresado en diagrama de barras. Se puede observar que durante este periodo los resultados permanecieron estables ya que no se observa ninguna barra que sobrepase los 0.2 mm y hay resultados positivos y negativos

La media de todos los valores de esta superposición de los resultados entre T45 y T90 fue de -0,01mm ±0,32, con una n=10, con 2 valores por zona excluyendo la zona control. Es destacable este resultado muy cercano a 0 que refleja una estabilidad importante de los resultados durante el control del mes y medio a los 3 meses de seguimiento, como puede observarse en la figura 41, expresado en diagrama de barras.

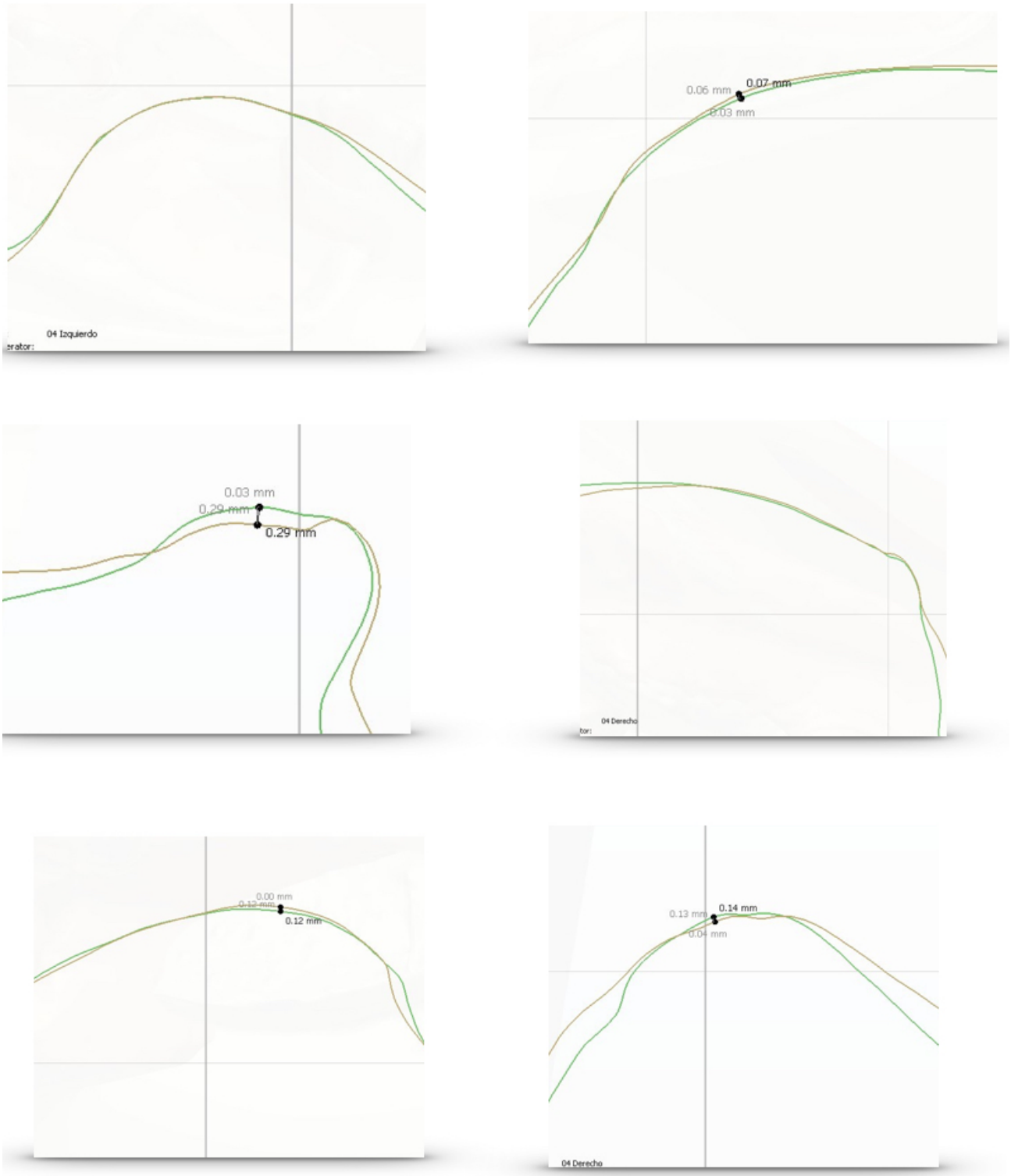

Figura 42.- Superposición de los valores de T45 trazo marrón, con T90 trazo verde, en zona control y zonas 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente

En las gráficas de superposición que se observan en la Figura 42 es fácil constatar una gran concordanciade los trazos en las zonas del estudio, que reflejan la estabilidad del tejido gingival durante este periodo de tiempo.

A continuación, realizamos una gráfica resumen de cada zona, poniendo el valor de la media de los resultados obtenidos y calculando matemáticamente los valores medios de cada zona y a cada tiempo (Tabla 4):

Tabla 4.- Valores promedio para cada área y en cada fase del estudio. Valor de incremento final para cada zona. Valores promedio para cada comparación y resultado final.

RESULTADOS PROMEDIOS DE CADA ZONA					
Zona	**Material**	**T-0/T-15**	**T-15 / T-45**	**T-45 / T-90**	**∑ final**
1	Neo 2H	N / A	-0.15	0,17	N / A
2	Neo 1NH	1.15	-0.13	0.05	1.07
3	Neo 1H	0.83	-0.07	0.1	0.86
4	Neo 2NH	1.98	-0.03	-0.18	1,77
5	Neo 1NH	1.25	-0.09	-0.12	1.04

De este modo es más fácil observar la evolución de cada zona:

En la zona control no se detectó ningún cambio volumétrico significante. Los resultados fueron de 0.0 mm en todas las superposiciones. No se había realizado ningún tipo de intervención para poder calibrar la fiabilidad de las mediciones obtenidas

En la zona 1 los resultados no fueron valorables por perderse la referencia inicial, pero sea lo que fuere que sucediese en el primer control, a partir de allí, los resultados se mantienen de una forma estable. La zona 2 hubo una ganancia inicial de 1.15 mm y luego una ligera contracción, con una ganancia de 1.07 mm al final del estudio. En la zona 3 presenta un aumento inicial de 0.83 mm que se mantiene perfectamente durante el periodo se siguimiento. En la zona 4, que fue la zona donde se colocó Neofibrina® de 2 mm, la ganancia inicial fue superior a las otras zonas, concretamente de 1.98mm, seguida de una contracción de 0.21 mm, algo por encima del 10 %. Finalmente, en la zona 5, la zona donde se realiza el injerto en silla de montar, la ganacia inicial fue de 1.25, seguida de una contraccion total durante los 3 meses de 0,21 mm que en esta zona representa un porcentaje del 16.8%.

Calculando matemáticamente, la contracción total del estudio a los 3 meses de seguimiento, en relación a los resultados del incremento de volumen obtenido a los 15 días fue del 8.5%.

.

6.4.- Resultados histológicos.

En el estudio microscópico se valoró la mucosa, la unión mucosa-submucosa y en la submucosa las características histológicas del tejido de granulación y la presencia de material.

6.4.1. Histologia zona control

En las muestras de la la zona control microscópicamente se observó la preenica de un epitelio maduro (Fig.43). En la unión con la submucosa se observó un discreto

acúmulo de material de aspecto mucinoso y un discreto infiltrado de linfocitos. El colágeno de la submucosa mostraba haces compactos y homogéneos con discretos infiltrados perivasculares de linfocitos y alguna célula plasmática (fig.44).

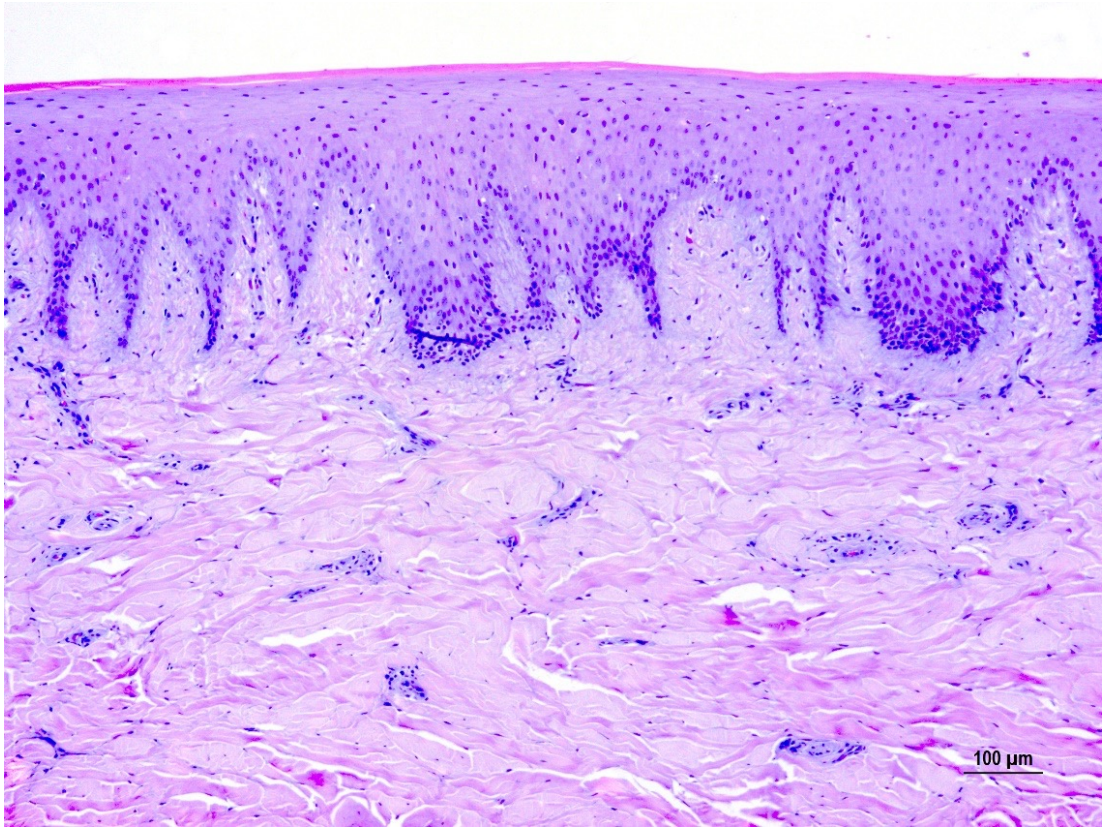

Figura 43. Zona control. Mucosa y submucosa (H&E).

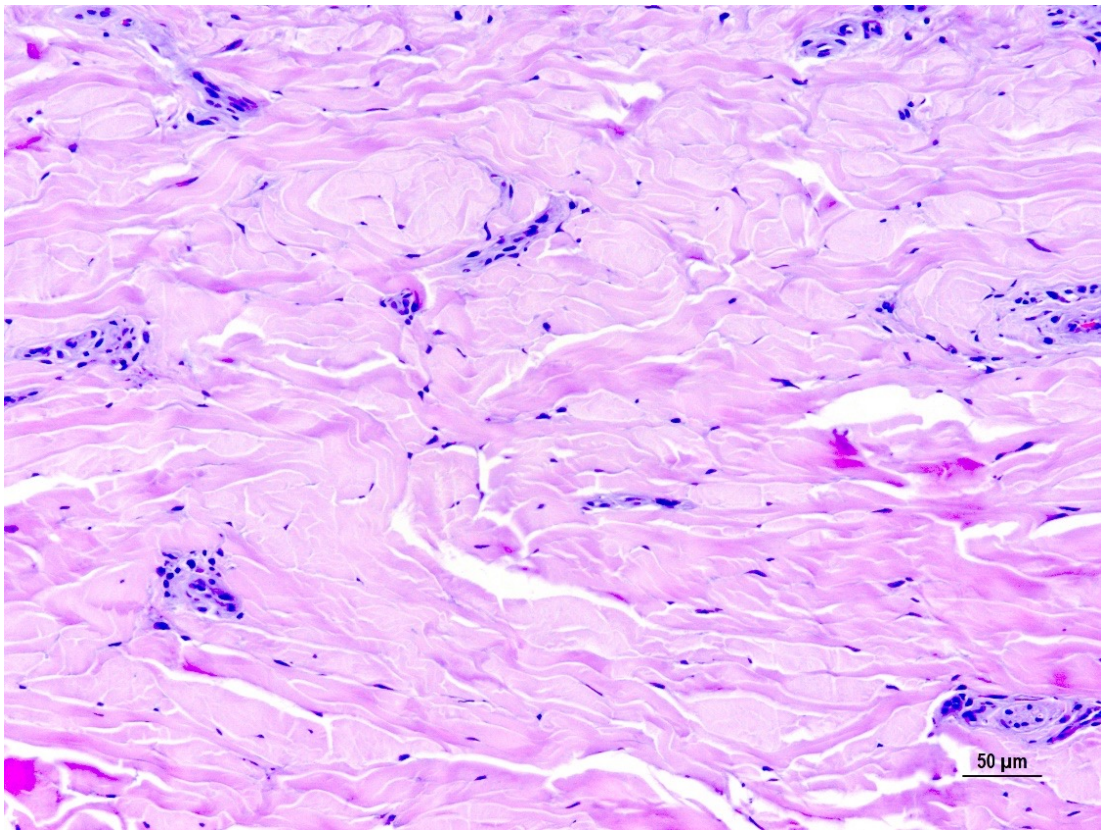

Figura 44. Zona control. Submucosa, haces de colágeno maduro con infiltrado perivascular de linfocitos (H&E).

6.4.2. Histología de la zona 1.

Microscópicamente, en la zona 1, donde se injertaron 2 capas de Neofibrina® hidratada, la reepitelización, diferenciación y maduración del epitelio era completa y la submucosa tenía colágeno maduro (Fig. 45). En la parte más superficial se observaron proyecciones profundas de la mucosa hacia la submucosa (Fig. 46). La zona de la membrana basal era homogénea. En la submucosa el tejido de granulación era totalmente maduro con haces de colágeno compactos y homogéneos y escasos infiltrados perivasculares de linfocitos (Fig.47). De todas las secciones procesadas, sólo en una se observó en la parte profunda de la submucosa un granuloma constituido por macrófagos con el citoplasma distendido y vacuolizado con presencia de un material exógeno fagocitado, de color discretamente basófilo (Fig.48).

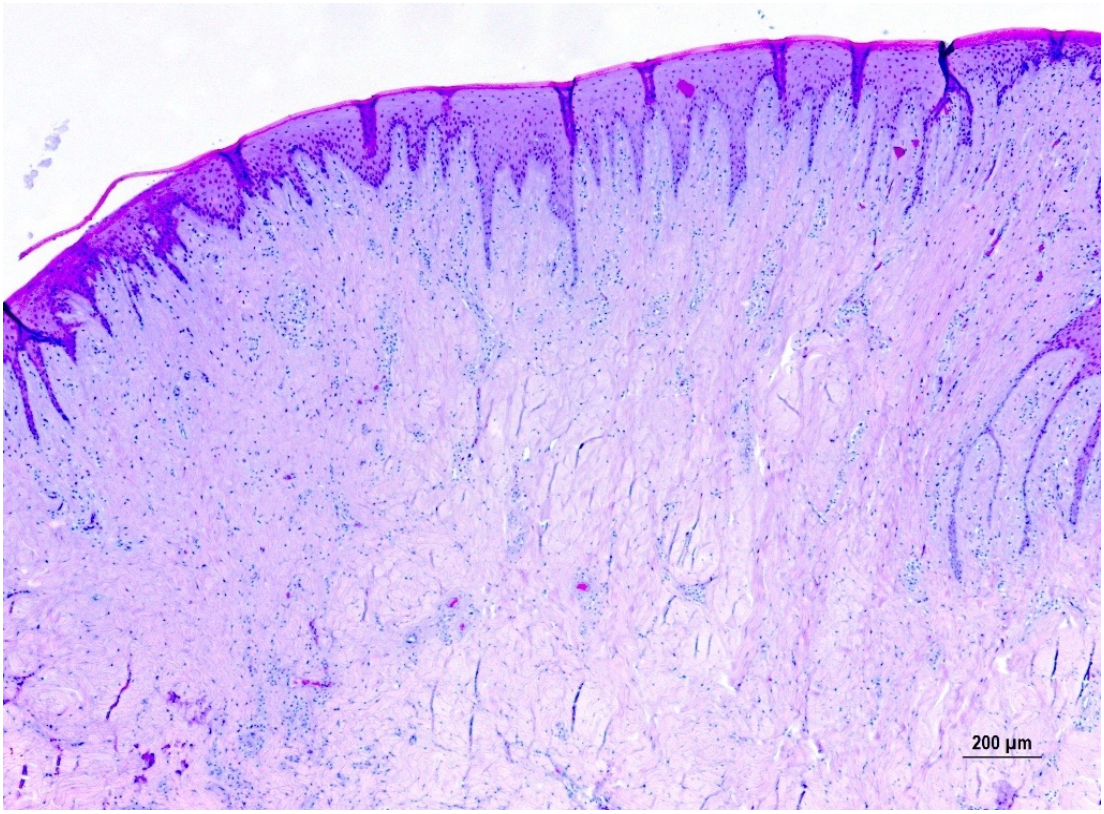

Figura 45. Zona 1. Mucosa y submucosa. (H&E)

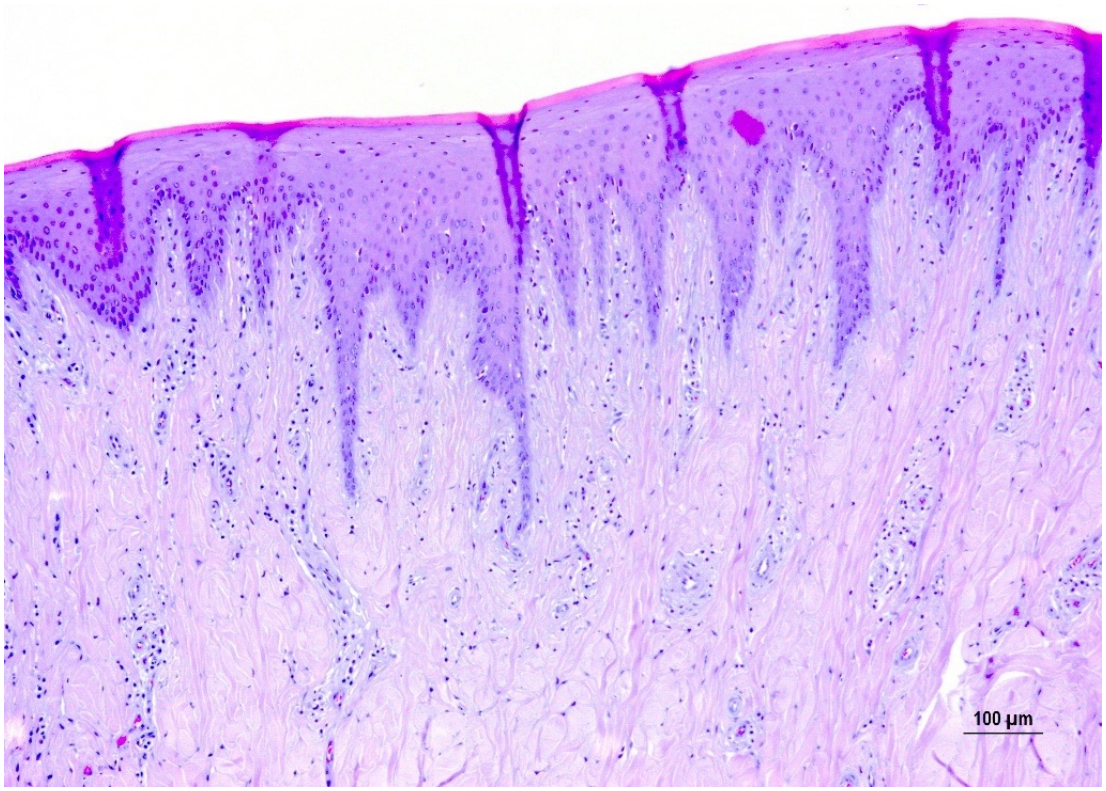

Figura 46. Zona 1. Mucosa y submucosa. Proyecciones digitiformes irregulares y profundas de la mucosa hacia la submucosa (H&E).

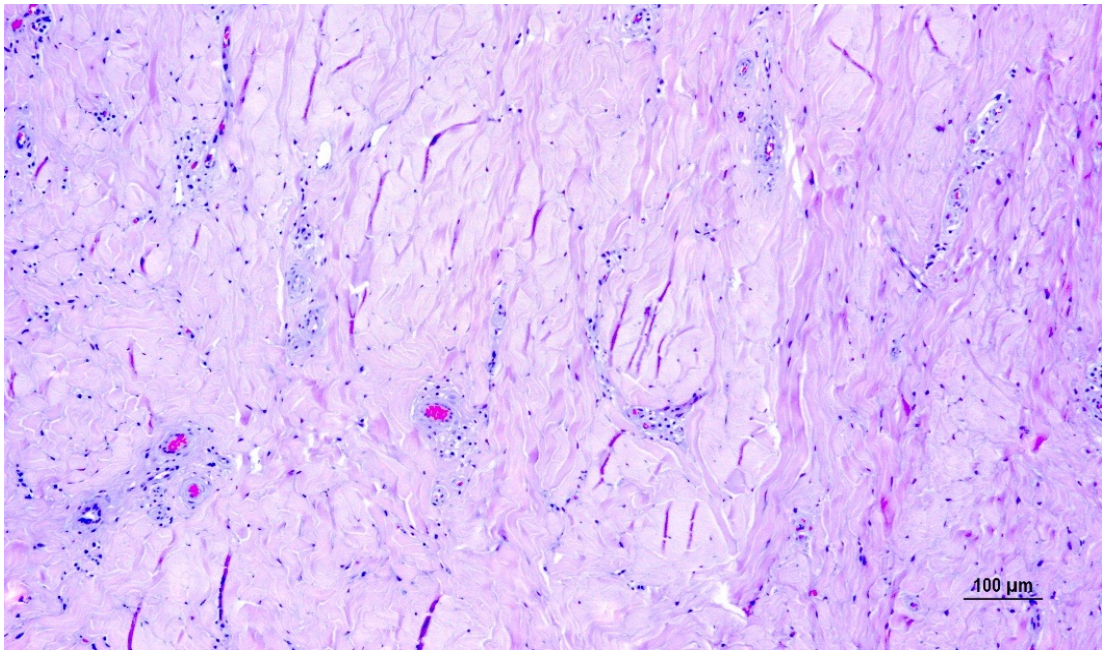

Figura 47. Zona 1. Submucosa. Colágeno maduro con haces orientados y discreto infiltrado perivascular de linfocitos (H&E).

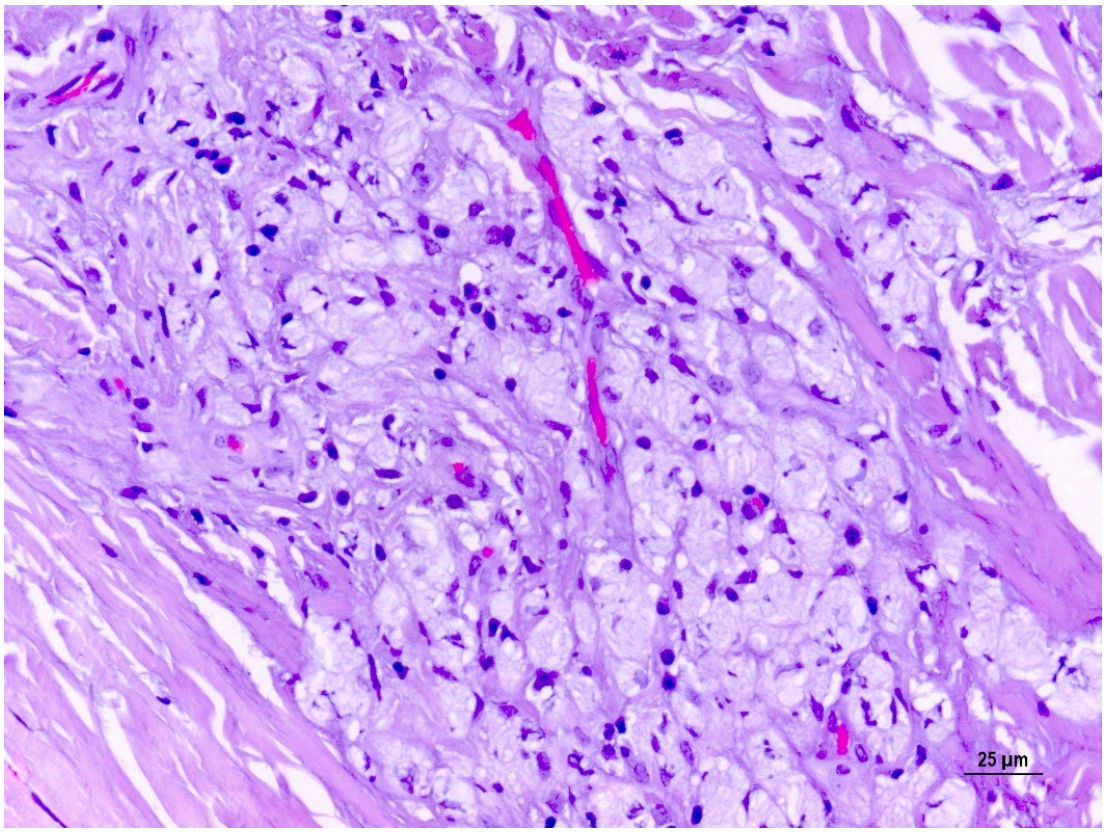

Figura 48. Zona 1. Submucosa. Granuloma constituido por macrófagos con material exógeno de color discretamente basófilo.

6.4.3. Histología de la zona 2.

Microscópicamente, las muestras de la zona 2, donde se había injertado Neofibrina® de 1 mm de grosor no hidratada, mostraron una reepitelización, diferenciación y maduración epitelial completa, con presencia de colágeno maduro en la submucosa (fig 49 y fig 50). En la submucosa los haces de colágeno son compactos y muestra un escaso infiltrado perivascular de linfocitos (fig.51).

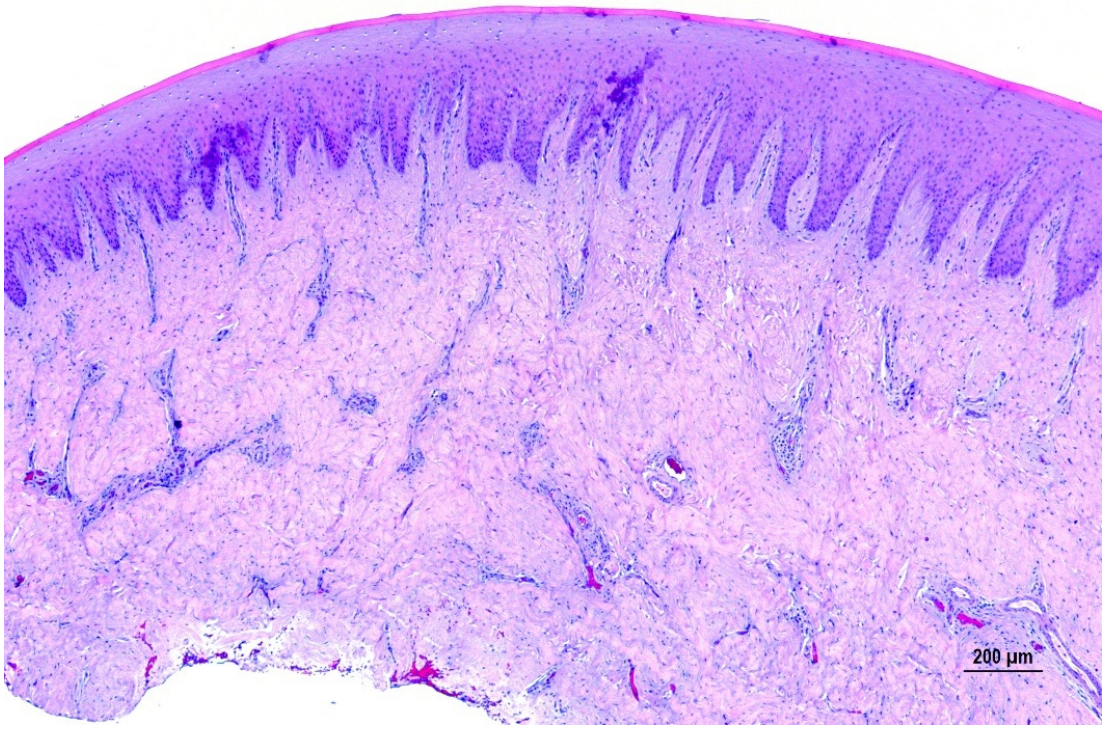

Figura 49. Zona 2. Mucosa y submucosa (H&E).

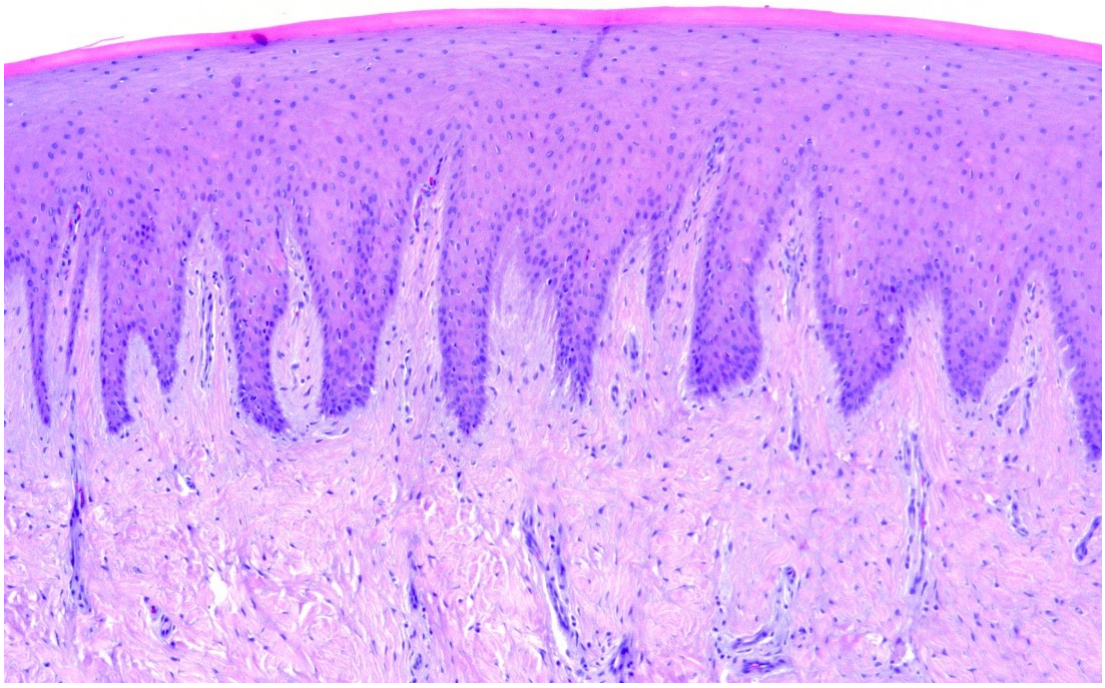

Figura 50. Zona 2. Mucosa y submucosa, con el epitelio y el colágeno maduros.

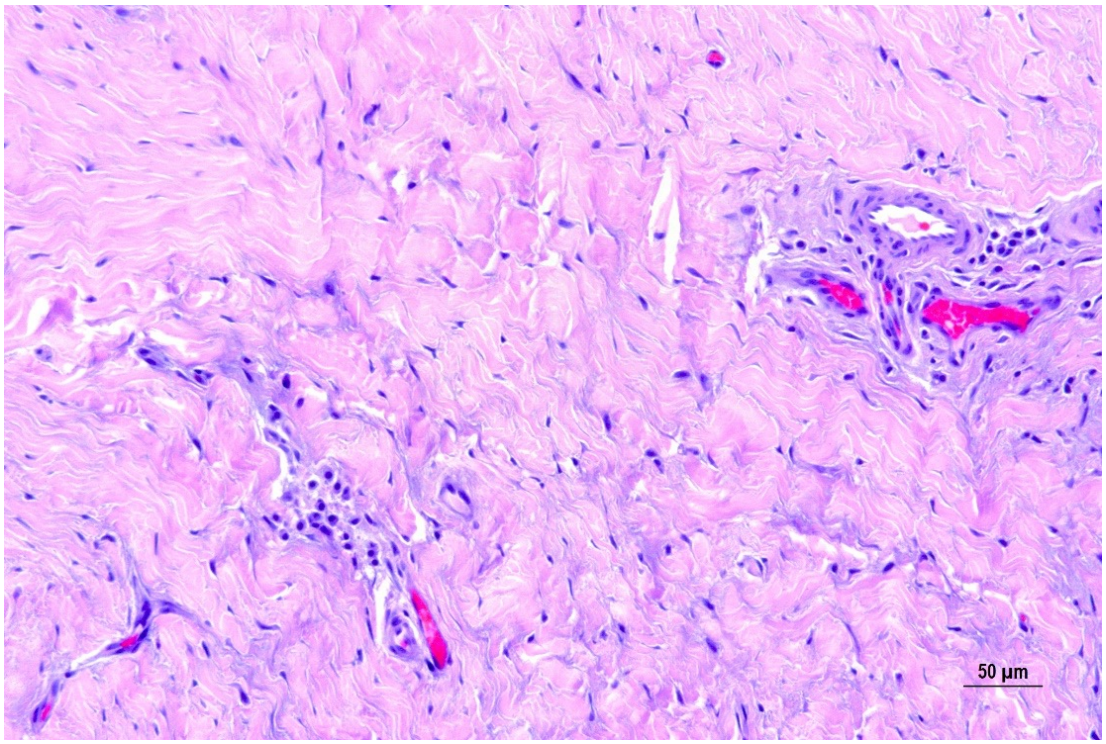

Figura 51. Submucosa. Colágeno maduro con discreto infiltrado perivascular de linfocitos (H&E).

6.4.4. Histología de la zona 3

Microscópicamente, las muestras de la zona 3, en la que se injertó Neofibrina 1® hidratada, mostraron una reepitelización, diferenciación y maduración epitelial completa, con presencia de colágeno maduro en la submucosa (fig 52 y fig 53). En algunas zonas de la submucosa los haces de colágeno aparentemente tienen menor grosor y el aspecto es menos compacto. La densidad de vasos es mayor y en el colágeno laxo de la periferia se observó material discretamente basófilo y un discreto infiltrado linfocitario (Fig. 54 y fig. 55).

Figura 52. Zona 3. Mucosa y submucosa (H&E).

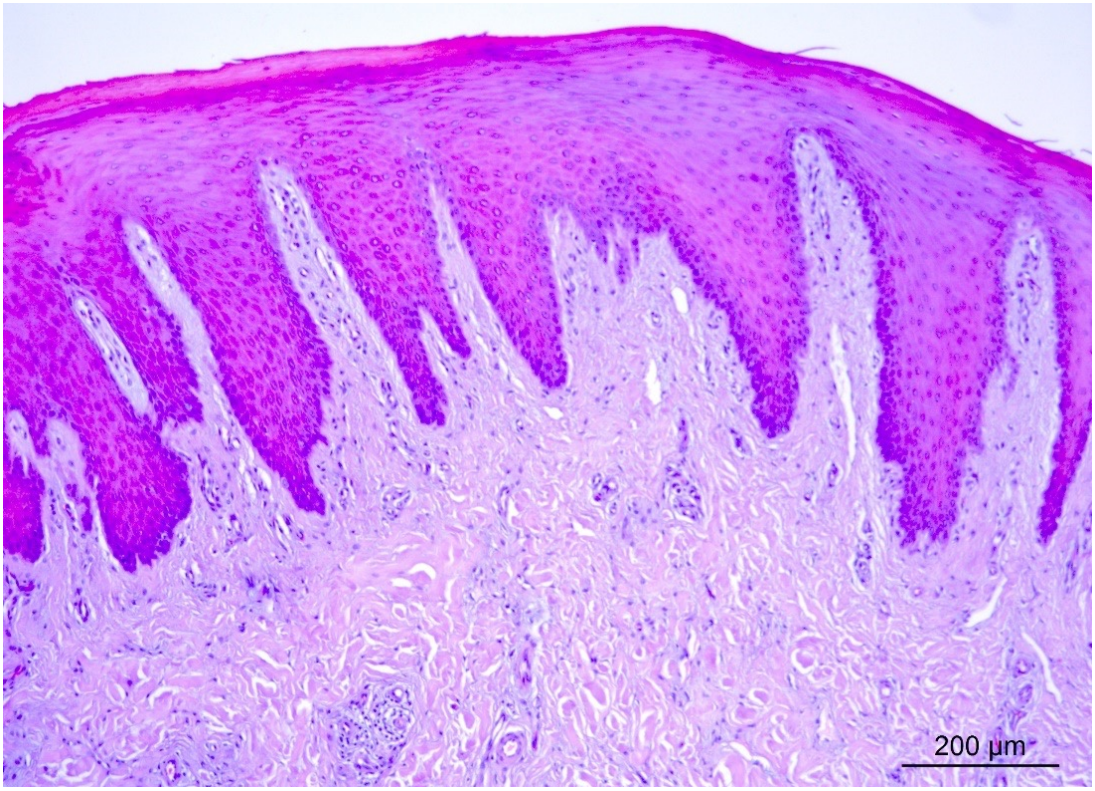

Figura 53. Zona 3. Mucosa y submucosa, con reepitelización completa y epitelio maduro (H&E).

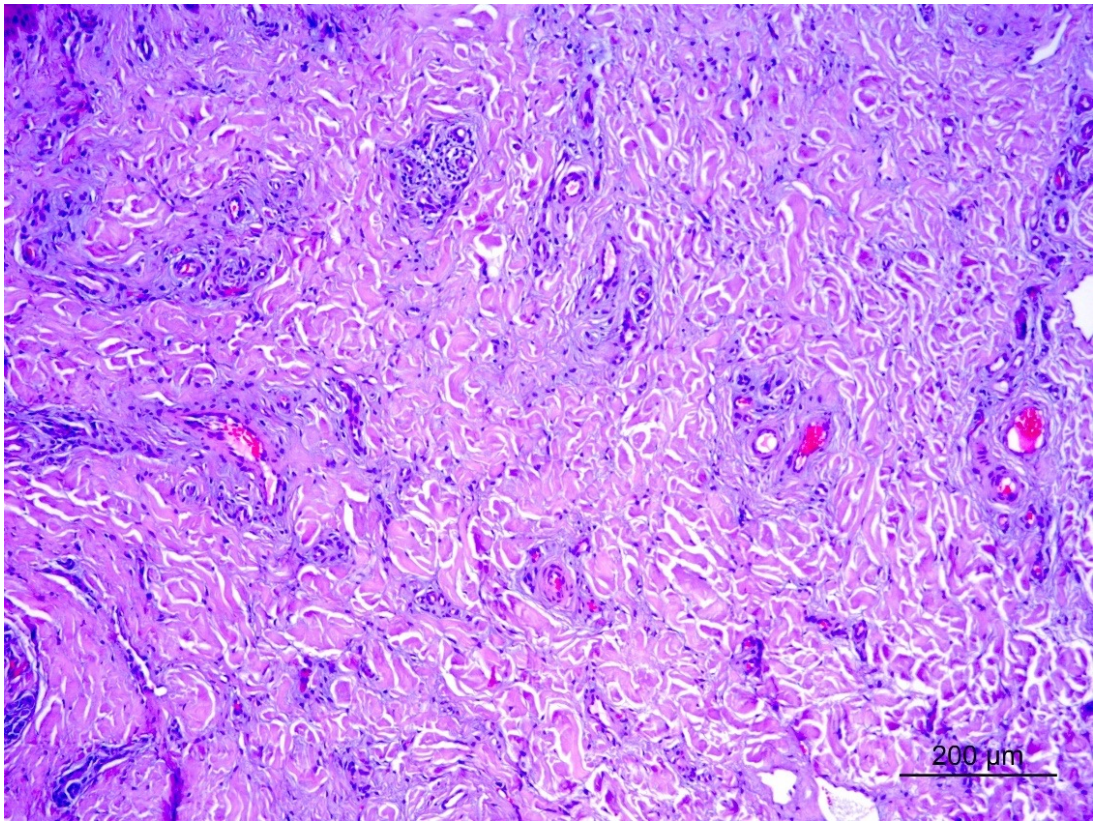

Figura 54. Zona 3. Submucosa con colágeno de aspecto menos compacto y mayor densidad de vasos (H&E).

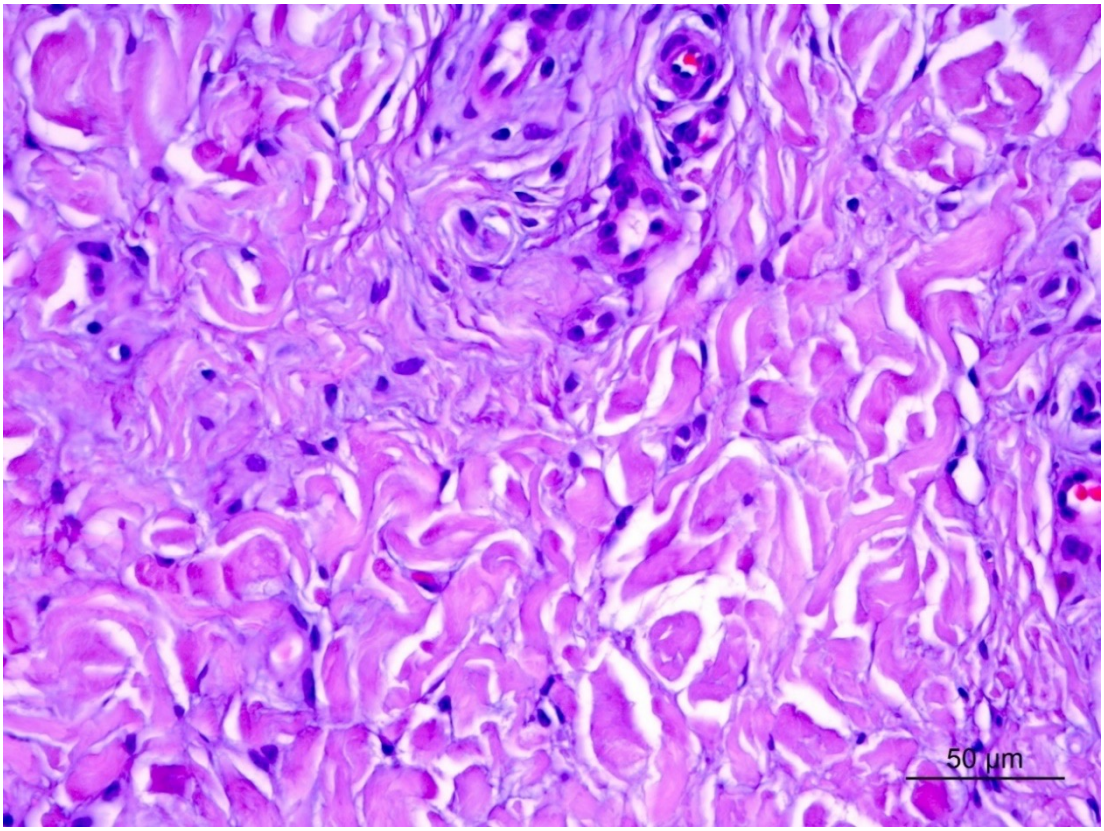

Figura 55. Zona 3. Submucosa. Tejido conectivo laxo perivascular con material discretamente basófilo y discreto infiltrado linfocitario (H&E).

6.4.5. Histología de la zona 4.

Microscópicamente, las muestras de la zona 4 en las que se había injertado Neofibrina® de doble grosor y no hidratada, mostraron una reepitelización, diferenciación y maduración epitelial completa, con presencia de colágeno maduro en la submucosa (fig. 56), con haces de colágeno compactos y densos (Fig.57).

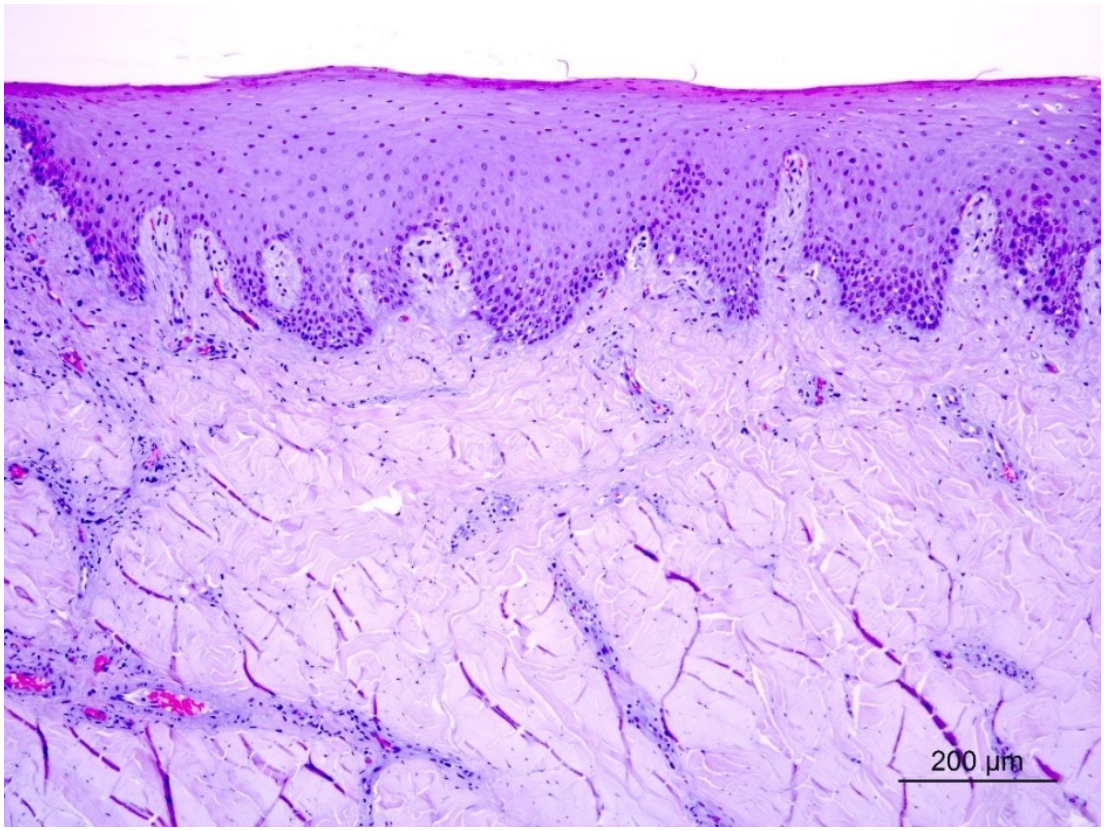

Figura 56. Zona 4. Mucosa y submucosa (H&E).

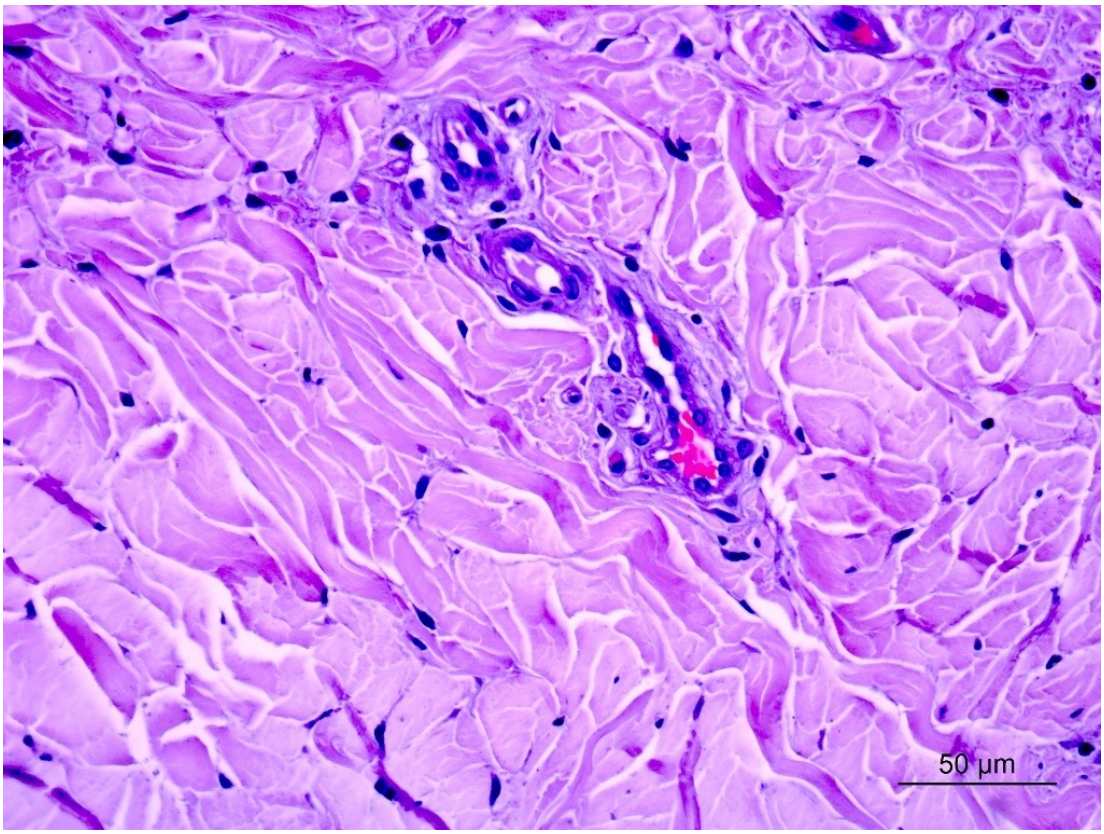

Figura 57. Zona 4. Submucosa. Haces de colágeno maduro, denso y compacto (H&E).

6.4.6. Histología de la zona 5.

En la zona 5 el injerto de Neofibrina® se había colocado en silla de montar, cubriendo a vestibular y a lingual, y la cicatrización fue por segunda intención. Microscópicamente, se observó una reepitelización, diferenciación y maduración epitelial completa, y en la submucosa el colágeno era maduro (fig 58), con haces compactos y densos. En la submucosa se observan zonas con vasos dilatados y acúmulo de material de aspecto mucinoso en zonas subepiteliales (fig 59). Los fibroblastos, aunque no parece haber una densidad superior al resto de muestras procesadas, si parecen más inmaduros (Fig. 60).

Figura 58. Zona 5. Mucosa y submucosa (H&E).

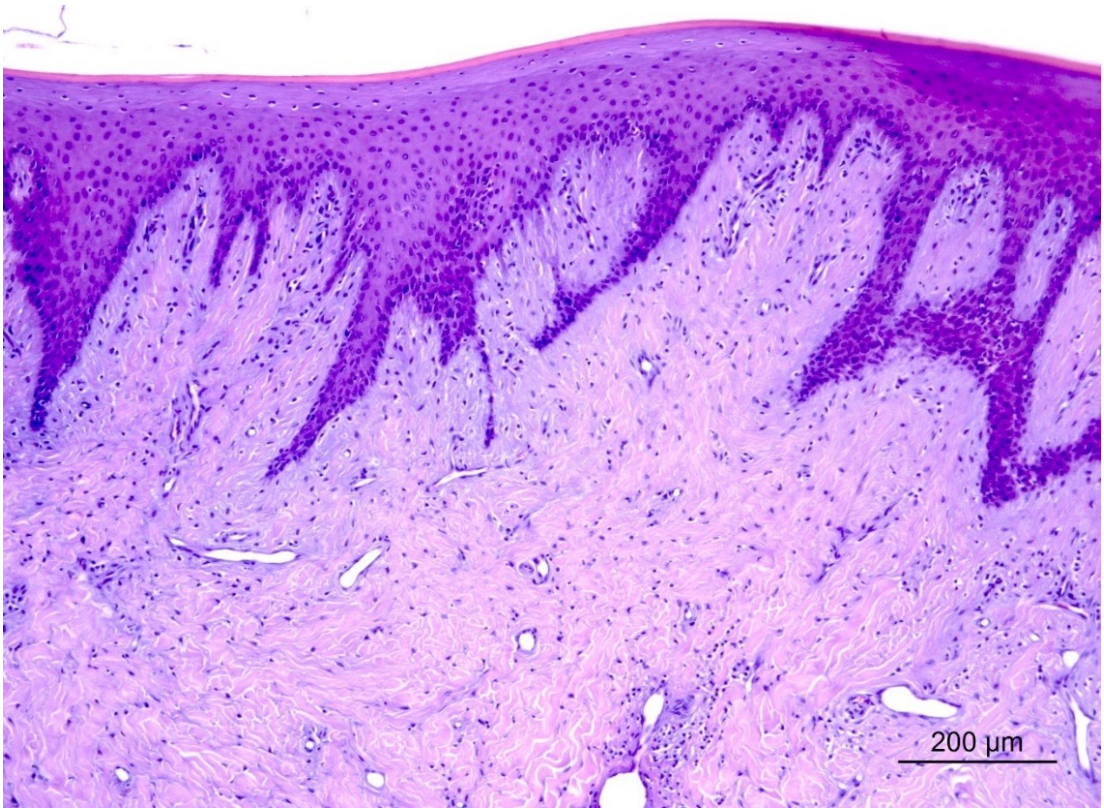

Figura 59. Zona 5. Mucosa y submucosa con tejido de granulación maduro, que muestra vasos dilatados y acúmulo de material de aspecto mucinoso en zonas subepiteliales (H&E).

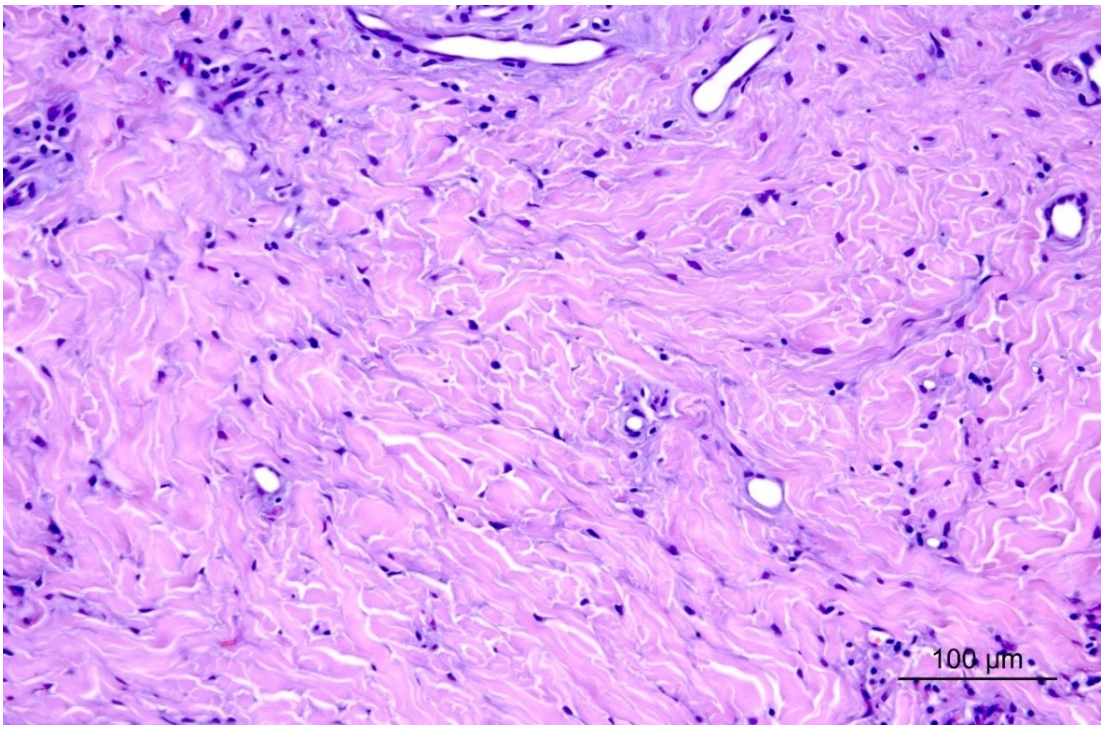

Figura 60. Zona 5. Submucosa dilatación vascular y fibroblastos inmaduros.

Microscópicamente se puede concluir que en todas las muestras el proceso de cicatrización ha sido similar y completo, sin observarse diferencias entre la muestra control y las que se ha realizado el injerto de Neofibrina®. En la mucosa la reepitelización ha sido completa, el epitelio está bien diferenciado y es maduro. La unión muscosa-submucosa es continua y compacta. En la submucosa el tejido conectivo neoformado tiene fibroblastos maduros, los vasos que quedan son capilares de pequeño calibre, y los haces de colágeno están bien organizados. Tan sólo en una muestra se ha observado un granuloma con restos de material exógeno fagocitado que no ha generado reacción inflamatoria de cuerpo extraño.

Discusión

7.- Discusión

7.1.- Selección de la biomatriz

Los resultados del estudio se deben valorar en conjunto, teniendo en cuenta los resultados in vitro, con los resultados volumétricos y los resultados histológicos.

En estudios previos se ha demostrado que la matriz de fibrina-agarosa puede ser un buen *scaffold* para la reconstrucción de tejido gingival (Sánchez-Quevedo y cols. 2007, Llames y cols. 2014 y Martín Piedra y cols. 2017). El objetivo de este estudio era poner a punto un modelo experimental para demostrar que la MFA también puede ser una buena opción para incrementar el volumen del tejido conectivo presente en la zona gingival y de este modo favorecer el restablecimiento del volumen que se pierde en las extracciones dentales y que dificulta el tratamiento posterior de reponer el diente ausente mediante una prótesis implanto retenida

Los resultados in vitro nos muestran que la MFA mantiene su estructura al ser introducida en un cultivo de fibroblastos y que éstos no colonizan su interior, manteniendo una estructura porosa, con unas celdillas claramente definidas y una zona externa más densa. El mantenimiento de esta estructura sugiere que al ponerla en contacto con tejido vivo puede ser fácilmente inundada por el coágulo, con la red de fibrina y plaquetas característica. Si lo que se pretende es rellenar la membrana con células mesenquimales deberían realizarse unas perforaciones como describen Gamal y cols. (2017) para la membrana de colágeno bovino, pero como se ha observado, este procedimiento no es necesario para alcanzar los objetivos del estudio.

Una vez la membrana entra en contacto con tejido vivo y se rellena con una red de fibrina y plaquetas se pone en marcha todo el proceso de reparación tisular. La posterior desgranulación de las plaquetas y la liberación de los factores plaquetarios, en especial el PDGF, favorece la reparación tisular y la angiogénesis. De este modo, cuando los fibroblastos van penetrando en la membrana, lo hacen acompañados de vasos de nueva formación y así se consigue que el tejido conectivo de reparación vaya sustituyendo a la Neofibrina®. Posteriormente, el tejido va madurando, los fibroblastos segregan colágeno y otras proteínas hasta obtener un tejido conectivo totalmente maduro. Este mecanismo es similar al reportado por Thoma y cols. (2011) para la matriz de colágeno.

Era necesario poner a punto un modelo experimental en animal adulto, para demostrar si todo este proceso de cicatrización y sustitución que facilita la matriz, conlleva un aumento de grosor del tejido gingival, objetivo final del procedimiento realizado.

7.2.- Valoración de la selección del animal de experimentación

Se decidió realizar el modelo experimental en un *minipig* adulto de 35 Kg, ya que tiene un tamaño que facilita su manejo y además es el animal que mejor reproduce los procesos que tienen lugar en la cavidad oral (Wang y cols. 2007).

En primer lugar, se debe valorar que las dimensiones de la cavidad oral sean similares a las humanas, lo que facilita los procedimientos quirúrgicos y permite realizar las mismas técnicas y con el mismo material que se utiliza en cirugía humana. Además permite extrapolar fácilmente la lectura de los resultados , aunque siempre deberemos asumir las limitaciones y las reservas con las que se deben tratar los resultados obtenidos a partir de un modelo experimental animal.

Otro factor fundamental para poder valorar resultados volumétricos es que el animal haya completado la fase de recambio de la dentición temporal y ya presente toda su dentición definitiva. La duración de este tipo de estudios varía desde los 6 meses hasta el año o más y la presencia de recambio dental o de gérmenes dentarios desplazándose dentro del hueso puede alterar los resultados.

También deben valorarse aspectos como el coste del animal, la facilidad de estabulación, la resistencia a posibles enfermedades o procesos patológicos debidos a los procedimientos necesarios para la realización del protocolo.

Todas estas circunstancias han conducido a diseñar el protocolo de experimentación en un *minipig* adulto. De este modo coincidimos con el estudio de Wang y cols. (2007) donde los autores opinan que el *minipig* es el animal de experimentación que mejor se adapta a la investigación oral y maxilofacial.

7.3.- Valoración de los resultados quirúrgicos

Al establecer un modelo animal de experimentación es importante conocer, a parte de su anatomía bucal, su capacidad de cicatrización de las lesiones en la cavidad oral y las complicaciones que puedan aparecer en el animal al ser sometido a los procedimientos quirúrgicos que se deban realizar. De este modo, se debe diseñar un protocolo con en el que el animal pueda mantener una calidad de vida aceptable durante los 6 meses que aproximadamente va a durar un estudio como el que hemos planteado. Además, es conveniente evitar al máximo situaciones de estrés que puedan alterar al animal, dificultando la finalización del estudio e incluso pudiendo llegar, en el *minipig*, a causarle la muerte por estrés.

La primera cirugía planteada trata de reproducir las situaciones de pérdida de volumen que generan las exodoncias. Por este motivo se realizaron las extracciones a colgajo abierto y con expresa intención de generar defectos. Estos defectos son los que van a dificultar el resultado estético final de nuestras restauraciones protésicas.

La segunda cirugía trata de reproducir el procedimiento que se efectuaría para la corrección del defecto creado. Por esto se plantea hacer cirugías en las que se realice un sobre que contenga totalmente el injerto y reposicionar el colgajo para que la sutura pueda realizarse sin tensión, con la técnica descrita por Raetzke (1985) y que posteriormente se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas y con mejores resultados para el aumento de tejidos blandos alrededor de los implantes dentales para optimizar los resultados estéticos (Ioannou y cols., 2015). Sin embargo, si lo que se pretende, es el recubrimiento de una superficie del implante expuesta a la cavidad oral, la técnica del injerto en sobre con una incisión a espesor parcial no sería la técnica de elección, sino que sería más recomendable realizar un colgajo de avance vestibular con injerto libre de encía o injerto de tejido conectivo o el injerto de una biomatriz (Bassetti y cols. 2017).

Con el procedimiento quirúrgico realizado en este protocolo se han obtenido unos buenos resultados en el animal estudiado. Al limitar el procedimiento a una arcada el animal pudo alimentarse correctamente con una dieta blanda y mantuvo durante todo el estudio una calidad de vida satisfactoria. La evolución de las heridas se puede considerar muy buena y la zona donde se produjo el fallo de sutura coincide con la zona en que se realizó una técnica diferente con injerto en silla de montar que es una técnica quirúrgica que puede producir más tensión en la sutura.

El estudio que se plantea es el desarrollo de un modelo experimental para demostrar la eficacia de la MFA y disponer de un modelo útil para abrir nuevas líneas de investigación con otras posibles matrices. Un tema importante es valorar las propiedades de la matriz en lo que se refiere a su manipulación. La forma, el grosor y la manejabilidad eran aspectos fundamentales en los que era necesario ser crítico para, en un futuro, poder diseñar las características organolépticas idóneas que debería tener una biomatriz para ser utilizada para engrosar el volumen del tejido gingival. La forma se tiene que adaptar al defecto, pero el material utilizado es muy fácil de recortar y de este modo circunscribirlo a la zona del modo que sea necesario. Por lo que respecta al grosor, se han utilizado matrices de Neofibrina® de 1 mm o de 2 mm de grosor y no hubo diferencias en cuanto a la manejabilidad y la facilidad para realizar la intervención. Por este motivo, en futuros estudios, se puede experimentar con grosores incluso superiores, siempre y cuando no se comprometa la sutura. La falta de tensión en el momento de la sutura es siempre un factor determinante en el resultado de la cirugía gingival.

Los resultados obtenidos en el manejo de Neofibrina® hidratada y sin hidratar mostraron que en cirugía gingival el material que puede ser manipulado con mucha más facilidad si se utiliza sin hidratar. La hidratación previa le confiere una falta de consistencia y una fragilidad que dificulta su manipulación. Sconti y cols. (2014) demostraron que la hidratación de las matrices de fibrina-agarosa mejoraba sus propiedades biomecánicas. Sin embargo, en cirugía gingival, esto no es así y el manejo de la matriz hidratada era muy dificultoso. En cambio, la matriz sin hidratar presenta una dureza idónea para su penetración en el lecho en forma de sobre, que se había creado. Además, al realizar una técnica en sobre, en la que todo el injerto queda dentro de un lecho sangrante, no es fundamental la hidratación previa, ya que ésta se realiza espontáneamente a los pocos segundos de introducirla dentro de la zona receptora y ponerse en contacto con los tejidos y la sangre del huésped.

Por lo que se refiere a la resistencia a la tracción mediante sutura es conveniente decir que la consistencia que presenta la Neofibrina® sin hidratar, permite su introducción en el lecho quirúrgico sin necesidad de tracción mediante un hilo de sutura. Una vez dentro del lecho la matriz permite ser estabilizada y fijada mediante sutura. Esta propiedad facilita la cirugía de engrosamiento del tejido gingival, pues solo es necesario preparar el sobre, introducir el material y suturar.

Esta técnica quirúrgica podría simplificar mucho las intervenciones de aumento de volumen en el tejido conectivo. Principalmente si lo comparamos con la cirugía de

referencia para estas indicaciones que es el injerto autólogo de tejido conectivo. Esta cirugía comporta una zona donante en el paladar del propio paciente cuya extracción aumenta el tiempo operatorio y la morbilidad (Wolff y cols. 2016)

.7.4.- Valoración de los resultados volumétricos

Windisch y cols. (2007) demostraron en su publicación que el escáner óptico era una herramienta excelente para la realización de estudios sobre los incrementos de volumen. Desde entonces se han sucedido los estudios sobre archivos volumétricos.

No obstante, la tecnología de que se disponía no permitió la obtención de escaneados directos fiables de la boca del animal. Se trata de un problema de software con prediseños que facilitan la lectura de bocas humanas, pero que se vuelven un obstáculo cuando pretendemos escanear la boca de un animal. Este inconveniente no debe resultar difícil de superar técnicamente y para posibles futuros estudios de experimentación animal, el escaneo directo puede resultar la mejor forma de obtención de registros. Para experimentación humana ya disponemos de instrumentación para obtener registros intraorales con excelente definición y alta fiabilidad.

En nuestro estudio se tuvo que recurrir a modelos físicos a partir de impresiones. Las impresiones en la boca de un *minipig* no son sencillas de realizar. La lengua, el tubo de intubación endotraqueal que se requiere para la anestesia, el poco fondo de vestíbulo existente y el enorme disparalelismo entre sus dientes, son factores que dificultan mucho la toma de impresiones y pueden alterar el resultado. Toda esta problemática se puede minimizada trabajando con cubetas individuales de hemiarcada, como se ha hecho en este protocolo.

A partir de las impresiones se pueden realizar modelos en yeso, finos y alargados. El yeso, al fraguar, presenta una expansión térmica que puede variar de una zona a otra dependiendo del grosor y tamaño del yeso. Al ser modelos finos y alargados, estas pequeñas variaciones pueden modificar el resultado final. Para intentar minimizar las posibles variaciones volumétricas que presentan los modelos se decidió trabajar cada zona por separado, dividiendo el modelo de cada hemiarcada en

3 submodelos y de esta manera reducir la exposición de las posibles variaciones que puede presentar un modelo de principio a final.

Los archivos volumétricos obtenidos del escaneado de los modelos reflejan de una forma muy fidedigna la realidad de dichos modelos ya que se dispone de una tecnología altamente fiable y contrastada. Posteriormente, al realizar las superposiciones de los archivos de hemiarcadas enteras se observaban diferencias sustanciales, que dificultaban la coordinación de los archivos y la lectura de resultados. Por este motivo se decidió trabajar superponiendo cada zona por separado, y de este modo el resultado de las superposiciones se facilitó ostensiblemente.

Pero las dudas que nos planteaba esta metodología se vieron disipadas en el momento que realizamos las mediciones en la zona de control. En esta zona no se realizó ningún tipo de intervención con la finalidad de poder valorar la fiabilidad de las lecturas obtenidas. Las gráficas de las superposiciónes de las líneas fueron prácticamente idénticas y en ninguna lectura se obtuvieron valores que no fueran 0,0 mm. Conviene recordar que las mediciones las realizó un ingeniero informático (a ciegas) y debía buscar en cada caso la máxima concordancia de áreas, pero desconocía el objetivo del estudio y cuál era la intervención llevada a cabo en cada zona.

La valoración de los resultados de la superposición de archivos volumétricos que se obtuvieron se realizó en primer lugar con los resultados obtenidos en cada zona:

En la zona control no ha sufrido ningún cambio apreciable durante todo el tratamiento, con valores siempre de 0. En este zona no se había realizado ninguna intervención para poder calibrar el método utilizado. Este resultado, al ser tan exacto y repetitivo, confiere fiabilidad al resto de mediciones obtenidas.

En la zona 1 que realizamos injerto de Neofibrina 2 hidratada, un problema técnico no nos permitió obtener la referencia inicial para valorar el incremento de volumen. Pero el volumen conseguido con la primera intervención, que no pudimos cuantificar, solo sufrió una ligera contracción (-0,15mm) en el control a los 45 días para obtener una ligera ganancia (0,17 mm) en el control realizado a los 3 meses, por lo que podemos afirmar que el volumen se mantuvo bastante estable durante todo el tiempo de seguimiento.

La zona 2, que recibió Neofibrina 1 no hidratada, presentó un incremento medio en el primer control de 1.15 mm, que se contrajo 0,13 mm que representa una contracción algo superior al 10 %.

La zona 3, que corresponde a la zona incisiva derecha, donde se había colocado Neofibrina 1 hidratada, ha resultado ser la zona donde los resultados fueron más pobres en lo relativo a aumento de volumen y solo se ganó 0’83 mm de promedio. Es muy díficil valorar el porqué de este resultado debido a que la muestra es muy pequeña. Los motivos que pudieran explicar este resultado son varios. Pueden existir variantes anatómicas y que la zona incisiva, que es una zona curva donde la encía es más gruesa y tensa, ofrezca mayor resistencia a los incrementos de volumen. No disponemos de información contralateral para apoyar esta posibilidad. Otro factor puede ser que la Neofibrina hidratada se desestructura mucho al introducirla en el lecho quirúrgico y esto implique un menor aumento de volumen.

La zona 4, que corresponde a la zona del primer premolar derecho y que fue donde se colocó Neofibrina 2 no hidratada, es donde los resultados obtienen valores más altos. La ganancia media de esta área fue de 1.98 mm, muy superior a las otras zonas donde solo había Neofibrina 1, para contraerse posteriormente 0.09 mm a los 45 días y 0.12 mm a los 90 días. La contracción total fue de 0.21 mm que también supone un valor algo superior al 10%.

En la zona 5 fue donde se colocó la biomatriz de Neofibrina 1 en forma de silla de montar y hubo un pequeño fallo de sutura y una cicatrización por segunda intención. En esta zona el incremento inicial fue de 1.25 mm, seguido de una contracción de 0.9mm a los 45 días y de 0.12 mm a los 90 días, lo que suma una contracción total en términos porcentuales de 16.8%, resultando la zona donde la contracción fue más alta. La inflamación que puede provocar un fallo de sutura pudiera alterar la primera lectura y aumentar algo la ganacia volumétrica. La posterior desinflamación y el cierre de la herida por segunda intención pudieran condicionar esta mayor pérdida de volumen que se observa en esta zona.

Si se comparan los resultados al utilizar Neofibrina hidratada y sin hidratar, resulta díficil de valorar, principalmente al no tener resultado en el primer control de la zona 1 que se utilizaba Neofibrina 2 hidratada. De todas formas, en la zona 3, que es donde injertamos Neofibrina 1 hidratada, fue la zona en la que se obtuvo un menor incremento de volumen, pero ya se ha comentado que se puede deber a

circunstancias locales o a la dificultad de manipulación que conlleva el empleo de la Neofibrina hidratada previamente.

Sin embargo, si valoramos los resultados comparando la utilización de Neofibrina 2 con la utiliación de Neofibrina 1 y a pesar de que la muestra es muy pequeña, se observan resultados que son interesantes y se deben destacar. En la zona 4 que se usó Neofibrina 2 sin hidratar puede observarse un incremento volumétrico promedio de 1.98 mm, que dobla practicamente a los resultados de las zonas que habían recibido Neofibrina de 1 mm con resultados menores, con un un rango que oscila enter entre 0.83 y 1.25 mm. De esta observación se puede concluir que la utilización de matrices de mayor grosor provoca incrementos de volumen también mayores, con resultados que son prácticamente proporcionales.

Si valoramos los resultados de todo el estudio de forma conjunta se observa un evidente aumento de volumen de la encía en las zonas injertadas respecto a la zona control. La media entre antes de la cirugía y a los 15 días después es de 1,3± 0.49 mm. Estos resultados son bastante estables durante todo el estudio. En la comparativa entre T15 y T45 se observa una ligera reducción de volumen de -0.10± 0.30 mm, que puede ser atribuido en parte al proceso de desinflamación habitual que existe secundario a las cirugías. Entre T45 y T90 los resultados se mantienen prácticamente estables, con una variación media de 0.01±0.33 mm. En resultado final, comparando la situación inicial y el resultado a los 3 meses resulta un incremento de 1.19±0,47 mm. A pesar del tamaño de la muestra, se puede observar una gran uniformidad de los resultados que nos permiten afirmar que hemos conseguido incrementar el grosor de la encía vestibular del *minipig* mediante el injerto de Neofibrina®.

Estos resultados son parecidos a los que obtienen Thoma y cols. (2010) en perros beagle. Los resultados entre antes de la cirugía y al cabo de un mes dan un incremento para la matriz de colágeno de 1.6 ± 0.9 mm y para el injerto de conectivo autologo de 1.5 ± 0.1mm. En las medidas realizadas a los 3 meses el incremento es de 1.4 ± 1.1 mm para la matriz de colágeno y de 1.4 ± 0.4 mm par el injerto de conectivo.

Si se analiza la contracción de volumen, que se ha observado en el control de T15 y T45, ha sido de aproximadamente un 8.5% . Esta contracción volumétrica es superior a la observada por Thoma y cols. (2010) que fue del 5.7 %, pero inferior a la que obtuvieron Studer y cols. (2000) que fue del 15%.

El resultado final de este estudio piloto confirma que la biomatriz de fibrina agarosa provoca un aumento en el grosor del tejido gingival. Otras biomatrices han demostrado su capacidad en este aspecto. Sin embargo, en el estudio clínico que presentaron Batista y cols. (2001) injertaron matriz dérmica acelular y también consiguieron buenos aumentos de grosor, pero en los resultados a los 6 meses se observó una contracción del 41,4% de los resultados obtenidos. Esta contracción tan importante ha provocado que prácticamente no se realizaran más estudios sobre la matriz dérmica acelular con la indicación única del incremento de grosor.

Este estudio se plantea como un estudio piloto para definir y sugerir futuras líneas de investigación. Un solo animal no nos permite sacar conclusiones de si la Neofibrina hidratada o sin hidratar nos ofrece resultados diferentes o si el comportamiento de las diferentes zonas de la boca del *minipig* afecta el resultado, pero a pesar del tamaño de la muestra, se puede constatar un incremento claro de volumen y una metodología útil para los estudios experimentales de incrementos de volumen. El modelo experimental desarrollado ha permitido valorar los incrementos y las contracciones volumétricas que ha causado el injerto de esta biomatriz.

7.5.- Valoración de los resultados histológicos

En prácticamente todas las zonas se ha observado la sustitución de la matriz por un tejido conectivo con un aspecto normal, con presencia de fibras de colágeno y una vascularización muy parecida a la de la zona control. En ninguna preparación se ha observado la presencia de un infiltrado inflamatorio ni de ninguna reacción a cuerpo extraño. Este hecho constata la gran biocompatibilidad de la matriz que no ha generado en ningún caso una respuesta inflamatoria digna de ser significada.

La sustitución de la matriz de fibrina-agarosa por tejido conectivo es parecida a la descrita por Schwars y cols. (2006) para las membranas de colágeno y por Thoma y cols. (2011) para la matriz de colágeno. La neovascularización se inicia por los bordes de la membrana y van apareciendo nuevos vasos en toda la zona que ocupaba la matriz hasta ser sustituida por un tejido conectivo normal, con fibras de colágeno que van madurando y orientándose progresivamente.

Por otra parte, cuando se realiza un injerto de tejido conectivo autólogo la integración al nuevo tejido es más lenta, ya que primero se produce una encapsulación del mismo, mientras que en el caso de la matriz de colágeno (Thoma y

cols., 2011*)* se produce una sustitución. En la matriz de fibrina-agarosa también se observa el mecanismo de sustitución del injerto por un tejido conectivo de nueva formación sin que se evidencie ningún proceso de encapsulación intermedio.

Thoma y cols. (2011) describen que al introducir matriz de colágeno en el tejido conectivo se induce de forma concomitante a la formación de nuevo hueso por interacción íntima entre la membrana y el hueso subyacente. Esta neoformación ósea no se observa en los injertos de tejido conectivo autólogo.

En definitiva, de la observación de nuestros resultados histológicos, se puede afirmar que la matriz de fibrina-agarosa es un material altamente biocompatible y que induce a la formación de un tejido conectivo que va sustituyendo progresivamente a la matriz injertada creando un espacio adicional

7.6.- Valoración global de los resultados

La valoración final de la eficacia de la Neofibrina® para el aumento de volumen gingival debe realizarse a partir de todos los resultados obtenidos en las diferentes partes del estudio. Se puede decir que disponemos de una matriz se integra perfectamente en el tejido dérmico, como hemos visto en los resultados histológicos, pero que durante esta integración mantiene un volumen que al final se traduce en un incremento de grosor, como hemos observados en los estudios volumétricos.

Por lo tanto, nos encontramos frente a un material biocompatible que induce aumentos de grosor en el tejido conectivo y que estos aumentos se mantienen a lo largo del tiempo con una pérdida mínima. Esta capacidad puede resultar muy interesante para que pueda ser utilizada en sustitución de los injertos de tejido conectivo autólogo que precisan una zona donante y conllevan un aumento de la morbilidad y del tiempo operatorio, (Thoma y cols., 2014).

Esta propiedad también puede resultar muy interesante en la cirugía de partes blandas alrededor de los implantes. La estabilidad y el aumento de grosor del tejido conectivo son considerados unos factores que contribuyen de una forma decisiva al éxito del tratamiento con implantes y facilita también la elección y el resultado final del tratamiento protésico rehabilitador (Brito y cols., 2014). Son necesarios grosores de tejido conectivo de ≤ 2 mm para conseguir un buen resultado en el tratamiento con implantes, para evitar que pueda observarse una descoloración grisácea de la mucosa

por transparencia con los pilares metálicos (Jung y cols., 2008) o para evitar la pérdida marginal ósea periimplantaria (Galindo-Moreno y cols., 2015). También alcanzar un buen resultado estético depende de que se pueda conseguir un contorno gingival adecuado que compense la contracción de los tejidos blandos secundaria a la extracción dental (Ueli Grunder., 2011). El injerto de conectivo autólogo sigue siendo el estándar de referencia para el tratamiento de incrementos de volumen del tejido conectivo alrededor de los implantes (Ioannou y cols., 2015), sin embargo, Thoma y cols. (2017) consiguen resultados similares utilizando matrices de colágeno.

Los resultados obtenidos con la MFA abren la posibilidad de poder disponer de un nuevo material, de fácil obtención y utilización, de fácil manipulación, totalmente biocompatible, que puede provocar aumentos de volumen en el tejido gingival y de este modo ser un tratamiento coadyuvante para el éxito del tratamiento con implantes dentales.

Limitaciones del estudio

8.- Limitaciones del estudio

El planteamiento de este trabajo fue desarrollar un modelo experimental que pudiera ser utilizado para el estudio de materiales, como la Neofibrina®, susceptibles de provocar incrementos de volumen en el tejido gingival. El modelo implementado ha servido para valorar los incrementos de volumen que provoca la matriz de fibrina-agarosa produce al ser injertada en el tejido gingival. No obstante, y a pesar de que el modelo ha demostrado su utilidad, los resultados obtenidos para la matriz, al tratarse de una muestra demasiado pequeña deben ser tratados como indicativos. No obstante, el modelo que se ha desarrollado ha permitido constatar que la Neofibrina® puede provocar aumentos de grosor en el tejido gingival del *minipig.*

Además, los resultados que se obtienen de la experimentación animal deben ser extrapolados con precaución, por las diferencias que existentes entre los animales y los seres humanos. Aunque entre el *minipig* y la especie humana hay muchísimas similitudes a nivel de la cavidad oral y, por tanto, lo convierten en un buen modelo.

Si nos referimos a los resultados que obtiene la Neofibrina® como matriz, las limitaciones que pueden apreciarse al valorar los resultados de este trabajo son varias. En primer lugar, el número de animales fue demasiado pequeño para la obtención de resultados significativos y se valoraron diferentes zonas y diferentes condiciones experimentales. Debido a este hecho, factores como la variabilidad de respuesta individual o la diferencia de respuesta en cada zona operatoria pueden alterar los resultados. No es lo mismo actuar en zona incisiva que en zona molar y estas variaciones pueden tener su relevancia en la valoración de los resultados, principalmente si se quieren analizar diferentes condiciones, como la hidratación previa o el grosor. La obtención de resultados significativos sobre la influencia del grosor, de la hidratación previa o de otras variables, precisan de estudios con un número de zonas a evaluar superior al del presente trabajo.

Otra limitación se encuentra en el hecho de no conseguir escanear directamente de la boca del *minipig*. Al trabajar con modelos físicos se aumenta la cantidad de variables que pueden inducir a error. La toma de impresiones, el posterior vaciado a yeso y el fraguado de yeso son procesos que tienen algo de inexactitud en su procesamiento, hecho que puede conducir a un posible error. Si se consiguiera un *software* que permitiera escanear con seguridad la boca del animal, se limitaría la posibilidad de un error y se dispondría de unos archivos más fáciles de superponer y

esto podría favorecer que se pudieran tener resultados no solo perfilométricos sino también en unidades de volumen.

La duración del estudio a 3 meses parece indicada porque en los resultados histológicos se observa que el material ya está totalmente reabsorbido y el tejido gingival resultante bastante maduro, con sus fibras de colágeno bien estructuradas. De todas maneras, un seguimiento más largo permitiría observar la presencia o no de futuras remodelaciones tisulares.

También, al tener solo resultados del final del tratamiento, implica que no se disponga de información más detallada del proceso de sustitución de la matriz por tejido conectivo. Las muestras obtenidas al final del estudio ya muestran una total sustitución de la matriz por tejido conectivo, pero no aporta información de las fases previas por las que atraviesa este proceso.

Perspectivas de futuro

9.- Perspectivas de futuro.

El hecho de desarrollar un modelo experimental para demostrar la eficacia de la MFA en engrosar el tejido conectivo nos ha permitido constatar que se obtienen incrementos de volumen al injertar dicha matriz. Parece evidente que el primer estudio futuro que se debería realizar, utilizando la misma metodología que se ha desarrollado, debería ser un estudio con una muestra suficientemente grande para extraer resultados con evidencia científica.

Pero las perspectivas de futuro que se abren cuando se trabaja en el campo de las biomatrices puede ir mucho más allá. En lo que se refiere al desarrollo biotecnológico hay muchas posibilidades. Se puede alterar su estructura para intentar conseguir aumentos de volumen superiores. Se puede fabricar Neofibrina® de mayor grosor y de este modo realizar injertos de 3 o 4 mm o incluso superiores. También se puede provocar que la capa más densa que rodea la matriz sea más ancha y compacta y ver si este hecho pudiera modificar los resultados. En el laboratorio se puede alterar su composición, añadiéndole células y/o proteínas u otros factores que colaboren en la obtención de incrementos de volumen superiores. O bien, alterar su estructura obteniendo una malla *cross-link* como obtuvieron Campos y cols. (2016). Todas estas modificaciones tendrían que ser probadas en modelos experimentales parecidos al que se desarrolla en este trabajo, con la intención de que pudieran demostrar que mejoran la respuesta tisular, y actúan aumentando el crecimiento del volumen gingival o disminuyendo su contracción y de este modo, poder obtener mejores resultados finales. Cualquier variación en el laboratorio va a precisar de una experimentación posterior para demostrar su eficacia. De la misma manera que en odontología se utilizan injertos de tejido conectivo del paladar anterior o del posterior o incluso de la tuberosidad retromolar que presentan tejidos de composiciones diferentes y con indicaciones diferentes, es factible desarrollar en el laboratorio diferentes tipos de biomatrices que se comporten de forma diferente y que sean adecuados para cada indicación concreta.

Macroscópicamente, también se pueden realizar matrices con formas específicas para cada defecto, que condujeran mejor la cicatrización hacia el objetivo estético deseado. Se debería obtener un archivo volumétrico que nos mostrara el volumen y la forma del defecto que se debe rellenar. Este archivo se debería obtener mediante la superposición entre el archivo del resultado final deseado y él de la situación actual. Una vez obtenido este archivo, y con la tecnología necesaria, se podrían fabricar biomatrices individualizadas, con la forma concreta para cada defecto. Este modo de actuar cambiaría la planificación habitual previa de cada caso ya que sería preciso un estudio más

detallado, y un escaneado de la situación actual y de la situación final deseada, pero simplificaría la cirugía y el resultado final debería ser más adecuado al objetivo que se persigue. Incluso se podría compensar la posible contracción realizando biomatrices proporcionalmente de un tamaño superior que, descontando la contracción, el volumen final fuera el deseado.

Para poder comprobar la eficacia de estos campos se deben realizar más estudios en animales y para mejorar el protocolo, como ya se ha comentado, sería interesante disponer una tecnología fiable para poder realizar escaneados de la boca del animal en el que se efectúa el estudio.

Finalmente, es la experimentación humana, con modelos experimentales similares al presentado en este trabajo, la que puede aportar toda la evidencia necesaria para que la matriz de fibrina-agarosa sea considerada un material que, al ser injertado en la encía, pueda provocar unos aumentos de volumen del tejido gingival que puedan mejorar los resultados que tenemos actualmente al reponer las ausencias dentales mediante prótesis dentales retenidas por implantes osteointegrados.

Conclusiones

10.- Conclusiones.

1.- El modelo experimental que se ha desarrollado ha permitido evaluar la eficacia de la MFA para aumentar el volumen gingival.

2.- La inmersión de Neofibrina® en un cultivo de fibroblastos ha sugerido que el mecanismo de acción de esta matriz se debe a un efecto membrana, ya que los fibroblastos permanecen en la periferia y no colonizan el interior de la MFA.

3.- El protocolo diseñado para realizar un estudio en el minipig ha permitido evaluar el comportamiento de la MFA en el tejido gingival. Limitando el estudio a una sola arcada y con la técnica quirúrgica descrita, se ha consegiuido un protocolo que es muy bien tolerado desde el punto de vista veterinario y permite reproducir y valorar las situaciones en las que se utilizan injertos de matrices en tejido gingival para su posterior evaluación.

4.- La superposición de archivos volumétricos es la forma más eficaz y fiable de valorar y cuantificar los cambios de volumen que pueden suceder en el tejido gingival. Con la superposición de los archivos volumétricos que hemos obtenido se ha observado que los injertos de Neobrina provocan incrementos de volumen a nivel del tejido gingival del *minipig* proporcionales al grosor de la matriz injertada,

6.- El incremento de volumen obtenido presenta una contracción baja, del 8.5 % en el control a los 45 días y se mantiene estable hasta el final del estudio.

7.- La matriz de fibrina-agarosa es altamente biocompatible y no induce reacciones inflamatorias al ser injertada. El tejido conectivo resultante es un tejido maduro, con sus haces de colágeno bien organizados.

8.- Los resultados obtenidos en este estudio permiten diseñar nuevas líneas de investigación y desarrollo de matrices para incrementar el volumen del tejido gingival.

Bibliografía

11. - Bibliografía

Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JL., Serrano D., Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47: 3311-3317.

Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1(5): 350-359

Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J.. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. Int J Periodontics Restorative Dent 2008; 28(2): 123-135.

Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. Clin Oral Implants Res. 2009; 20(1): 1-6.

Araujo MG and Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in dog. J Clin Periodontol 2005; 32: 212-218.

Araujo MG, Costa da Silva JC, Furtado de Mendoça A, Lindhe J, Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial. Clin Oral Impl Res 2015; 26: 407-412.

Araujo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen in the bucal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. Clin Oral Impl Res 2011; 22: 1-9.

Atieh MA, Alsabeeha N, Tawse-Smith A, Payne AG. Xenogeneic collagen matrix for periodontal plastic surgery procedures: a systematic review and meta-analysis. J Periodontal Res 2016; 51 (4): 438-452.

Avila-Ortiz G, Elangovan S, Kramer KWO, Blanchette D. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction. A systematic review and meta-analysis. J Dent Res 2014; 93(10): 950-958.

Bassetti RG, Stähli A, Bassetti MA, Sculean A. Soft tissue augmentation around osseointegrated and uncovered dental implants: a systematic review. Clin Oral Investig 2017; 21(1): 53-70.

Batista EL, Batista FC, Novaes AB. Manegement of soft tissue rigde deformations with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. J Periodontol, 2001; 72 (2): 265-273.

Barone A, Toti P, Marconcini S, Derchi G, Saverio M, Covani U. Esthetic outcome of implants placed in fresh extraction sockets by clinicians with or without experience: a medium-term retrospective evaluation. Int J Oral Maxillofac Implants 2016; 31(6): 1397- 1406.

Botticcelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard tissue alteratons following immediate implant placement in extraction sites. J Clin Periodontol 2004; 31: 820-828.

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseus anchorage of dental prostheses. Scand J Plast Reconstr Surg, 1969; 3(2): 81-100.

Brito C, Tenenbaum HC, Wong BK, Schmitt C, Nogueira-Filho G. Is keratinized mucosa indispensable to maintain peri-implant health? A systematic review of the literature. J Biomed Mat Res. Part B, Applied Biomaterials. 2014; 102: 643-650

Burkhardt R, Ruiz Magaz V, Hämmerle CH, Lang NP. Interposition of a connective tissue graft or a collagen matrix to enhance wound stability – an experimental study in dogs. J Clin Periodontol 2016; 43(4): 366-373.

Cabello G, Rioboo M, Fábrega JG. Immediate placement and restoration of implants in the aesthetic zone with a trimodal approach: soft tissue alterations and its relation to gingival biotype. Clin Oral Impl Res 2012; 0: 1-7.

Cabello G, Gonzalez D, Calzavara D, Fabrega JG. Colocación y restauración inmediata de implantes en la zona estética: opciones terapéuticas del Trimodal Approach (abordaje trimodal) Int J Esthetic Dent 2015; 8(2): 148-169.

Campos F, Bonhome-Espinosa AB, García-Martínez L, López-López MT, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Carriel V. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarosa hydrogel for tissue engineering applications. Biomed Mater 2016; 11(5): 055004.

Caneva M, Botticelli D, Viganò P, Morelli F, Rea M, Lang NP. Connective tissue grafts in conjunction with implants installed into extraction sockets. An experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res 2013; 24(1): 50-56.

Cardaropoli D, Tamagnone L, Roffredo A, Gaveglio L. Coronally advanced flap with or without xenogenic collagen matrix in the treatment of multiple recessions: A randomized controlled clinical study. Int J Periodontics Restorative Dent 2014; 34(Suppl 3): 97-102.

Cardaropoli G, Araujo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. J Clin Periodontol 2005; 32(5): 435-440.

Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol 2003; 30 (9): 809-818.

Carriel V, Garzón I, Jiménez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. Cells Tissues Organs 2012; 196 (1): 1-12.

Carriel V, Scionti G., Campos F., Roda O., Castro B., Cornelissen M., Garzón I., Alaminos M. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. J Tissue Eng Regen Med 2015.Doi: 10.1002/term.2039.

Chen ST, Buser D. Clinical and esthetic outcomes of implants placed in extraction sockets. Int J Oral Maxillofac Implants 2009; 24(Suppl): 186-217.

Chen ST, Buser D. Esthetic outcome folowing immediate and early placement in the anterior maxilla- a systematic review. Int J Oral Maxillofac Implants 2014; 29(Suppl): 186-215

Cooper LF, Raes F, Reside GJ, Soliva Garriga J, Tarrida LG, Wiltfang J, Kern M, De Bruyn H. Comparison of radiographic and clinical outcomes following immediate provisionalization of single tooth dental implants in healed alveolar ridges and extraction sockets. Int J Oral Maxillofac Implants 2010; 25(6): 1222-1232.

Cooper LF, Reside GJ, Raes F, Soliva Garriga J, Tarrida LG, Wilftang J, Kern M, De Bruyn H. Immediate provisionalization of dental placed in healed alveolar ridges and extraction sockets: a 5-year prospective evaluation. Int J Oral Maxillofac Implants 2014; 29(3): 709-717.

Covani U, Bortolaia C, Barone A, Sbodorne L. Bucco-lingual changes after immediate and delayed implant placement. J Periodontol 2004; 75: 1605-1612.

De Bruyn H, Cooper L, Raes F, Soliva Garriga J, Giner Tarrida L, Wiltfang J, Kern M, Three-years clinical outcome of immediate provisionalization od single Osseospeed implants in extraction sockets and healed ridges. Clin Oral Impl Res 2013; 24(2): 217-223.

Eghbaki A, De Bruyn H, Cosyn J, Kerckaert I, Van Hoof T. Ultrasonic assessment of mucosal thickness around implants: Validaty, reproducibility and satability of connective tissue grafts al the buccal aspect. Clin Implant Dent Relat Res. 2016; 18(1): 51-61.

Farina V, Zaffe D. Changes in Thickness of mucosa adjacent to implants using tissue matrix allograft: A clinical and histologic evaluation. Int J Oral Maxillofac Implants 2015; 30: 909-917.

Fu JH, Lee A, Wang HL. Inflence of tissue biotype on implant esthetics. Int J Oral Maxillofac Implants 2011; 26(3): 499-508.

Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, Suárez F, O'Valle F, Spinato S, Catena A. Prosthetic abutment height is a key factor in peri-implant marginal bone loss. J Dent Res 2014; 93(Suppl 7): 80-85.

Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, O'Valle F, Catena A. Marginal bone loss as success criterion in implant dentistry: beyond 2 mm. Clin Oral Impl Res 2015; 26(4): 28-34.

Gamal AY, Al-Berry NN, Hassan AA, Rashed LA, Iacono VJ. In vitro evaluation of the human gingival fibroblast/ gingival mesenchymal stem cell dynamics through perforated guided tissue membranes: cell migration, proliferation and membrane stiffness assay. J Periodontal Res 2017; 8, doi 10.1111/ jre 12431.

Gapski R, Parks CA, Wang HL. Acellular dermal matrix for mucogingival surgery: a meta-analysis. J Periodontol 2005; 76(11): 1814-1822.

Gerritsen AE, Allen PF Witer DJ, Bronkhorst EM, Creugers NH. Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. Health Qual Life Outcomes 2010; 8: 126-126.

Gonzalez-Martin O, Veltri M, Moráguez O, Belser UC. Quantitative three-dimensional methodology to assess volumetric and profilometric outcome of subepithelial connective tissue grafting at pontic sites: a prospective pilot study. Int J Periodontics Restorative Dent 2014; 34 (5): 673-679.

Grunder U. Crestal ridge width changes when placing implants at the time of tooth extraction with and without soft tissue augmentation after a healing period of 6 month: report a 24 consecutive cases. Int J Periodontics Restorative Dent 2011; 31: 9-17

Hämmerle CH, Araujo MG, Simion M. Osteology consensus Group 2011. Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets. Clin Oral Impl Res 2012; 23(Suppl 5): 80-82.

Hämmerle CH, Chen ST, Wilson TG Jr. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding the placement of implants in extraction sockets. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19(Suppl): 26-28.

Hsu YT, ShiehCH, Wang HL. Using soft tissue graft to prevent mid-facial mucosal recession following immediate implant placement. J Int Acad Periodontol 2012; 14(3): 76-82.

Huynh-Ba G, Pjetursson BE, Sanz M, Cecchinato D, Ferrus J, Lindhe J, Lang NP. Analysis of the socket bone Wall dimensions in the upper maxilla in relation to immediate implant placement.Clin Oral Impl Res 2010; 21: 37-42.

Ioannou AL, Kotsakis GA, McHale M, Lareau DE, Hinrichs JE, Romanos GE. Soft tissue surgical procedures for optimizing anterior implants esthetics. Int J Dent 2015; 2015: 740764.

Jung RE, Holderegger C, Sailer I, Khraisat A, Suter A, Hämmerle C. The effect of all-ceramic and porcelain-fused-to-metal restorations on marginal peri-implant soft tissue color: a randomized controlled clinical trial. Int J Periodontics Rest Dent. 2008; 28: 357-365

Kan JYK, Rungcharassaeng K, Lozada J, Immediate placement and provisionalization of maxillary anterior single implants: 1-year prospective study. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18: 31-39.

Kan JY; Rungcharassaeng K, Lozada JL, Zimmerman G, Facial gingival tissue stability following immediate implants placement and provisionalization of maxillary anterior single implants: a 2 -to 8- year follow-up. Int J Maxillofac Implants 2011; 26(1): 315-318.

Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. Infection and Immunity 2007;75(4): 1704-1712.

Langer B, Calagna N. The subepithelial connective tissue graft. J Prosth Dent. 1980; 44: 363-367.

Lauer G, Schimming R. (2001). Tissue-Engineered mucusa graft for reconstructionof the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. J Oral Maxillofac Surg 2001; 59: 169-177.

Llames S., Recuero I., Romance A., García E., Peña I., Férnandez del Valle A., Meana A., Larcher F., Del Río M. (2013) Tissue-engineered oral mucosal reconstruction in a pediatric patient with hemifacial microsomia and ankyloglossia. Cleft Palate Craniofac J. 2014; 51(2): 246-251.

Martín-Piedra MA, Alaminos M, Fernández-Valadés-Gámez R, España-Lopez A, Liceras-liceras E, Sánchez-Montesinos I, Martínez-Plaza A, Sánchez-Quevedo MC, Fernández-Valadés R, Garzón I. Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. Histochem Cell Biol 2017; 147: 377

Mc Guire MK, Schever ET. Randomized, controlled clinical trial to evaluate a xenogeneic collagen matrix as an alternative to free gingival grafting for oral soft tissue augmentation. J Periodontol 2014; 85(10): 1333-1341.

Nart J, Carbonell JM, Sanz J, Ruiz V, Pascual A. Matriz de colágeno en cubrimiento radicular. Revisión y caso clínico. Periodoncia y Osteointegración 2011; 21(3): 163-8.

Nuñez J, Caffesse R. Vignoletti F, Guerra F, San Roman F, Sanz M. Clinical and histological evaluation of an acellular dermal matrix allograft in combination with the coronally advanced flap in the treatment of Miller Class I recession defects: an experimental study in the mini-pig. JClin Periodontol 2009; 36(6): 523-531.

Oz HS, Puleo DA. Animals Models for Periodontal disease. J Biomedicine Biotechnology. 2011; 2011(article ID 754857): 1-8.

Oz HS, Ebersole JL. A novel murine model for chronic inflammatory alveolar bone loss. J Periodontal Res 2010; 45(1): 94-99.

Peña I., Junquera LM., Meana A, García E., García V., De Vicente JC. In vitro engineering of complete autologous oral mucosa equivalents: characterization of a novel scaffold. J Periodont Res 2010; 45: 375 -380.

Raetzke PB. Covering localized areas of root exposure employing the “envelope” technique. J Periodontol 1985; 56(7): 397-402

San Martín S, Alaminos M, Zorn TM, Sánchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodríguez IA, Campos A. The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracelular matrix profile of bioengineered oral mucosa. J Tissue Eng Regen Med 2013; 7(1): 10-19.

Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzón I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evauation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. Histol Histopathol 2007; 22(6): 631-640.

Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhace the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. J Clin Periodontol 2009; 36: 868-876

Sanz-Martin I, Sailer I, Hämmerle CH, Thoma DS. Soft tissue stability and volumetric changes after 5 years in pontic sites with or without soft tissue grafting: a retrospective cohort study. Clin Oral Impl Res 2016; 00: 1-6.

Sauerbier S., Gutwald R., Wiedmann-Al-Ahmad M, Lauer G., Schmelzeisen R. Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. Clin Oral Impl Res 2006; 17: 625-632.

Schwars F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Bercker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: and immunohistochemical study in the rat. Clin Oral Impl Res 2006; 17: 403-409.

Schmitt CM, Matta RE, Moest T, Humann J, Gammel L, Neukan FW, Schlegel KA. Soft tissue volumen alterations after connective tissue grafting at teeth. The subepithelial autologous connective tissue graft (STCG) vs. a porcine collagen matrix (MC). A preclinical volumetric analysis. J Clin Periodontol 2016; 43(7): 609-17

Schneider D, Grunder U, Ender A, Hämmerle CH, Jung RE 2011. Volume gain and stability of peri-implant tissue following bone and soft tissue augmentation: 1-year results from a prospective cohort study. Clin Oral Implants Res 2011, 22(1): 28-37.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. Int J Periodontics Restorative Dent 2003; 23: 313-323.

Scionti G., Moral M, Toledano M., Osorio R., Duran JDG., Alaminos M., Campos A., López-López M T. Effect on the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. J Biomed Res Part A 2014; 102A: 2573-2582.

Studer SP, Lehner C, Bucher A, Scharer P. Soft tissue correction of a single tooth pontic space: a comparative quantitative volumen assessment. J Prosth Dentistry 2000; 83: 402-411.

Tan WL, Wong TL, Wong MC, Lang NP. A systematic review of post-extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. Clin Oral Implants Res 2012; 23 (Suppl 5): 1-21.

Tatakis DN. Chambrone L, Allen EP, Langer B, Mc Guire MK, Richarson CR, Zabalegui I, Zadeh HH. Periodontal soft tissue root coverage procedures: a consesus report from de AAP Regeneration Workshop, J Periodontol 2015; 86(Suppl 2): 52-55.

Thoma DS, Benic GI, Zwahlen M, Hämmerle C, Jung RE. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. Clin Oral Implant Res 2009; 20 (Suppl 4): 146-165.

Thoma DS, Buranawat B, Hämmerle CH, Held U, Jung RE. Efficacy of soft tissue augmentation around dental implants and in partially edentulous áreas: a systematic review. J Clin Periodontol 2014; 41(Suppl 15): 77-91.

Thoma DS, Hämmerle CH, Cochran DL, Jones AA, Görlach C, Uebersax L, Mathes S, Graf-Hausner U, Jung RE. Soft tissue volumen augmentation by the use of collagen based matrices in dogs mandible- a histological analysis. J Clin Periodontol 2011; 38(11): 1063-1070.

Thoma DS, Jung RE, Schneider D, Cochran DL, Ender A, Jones AA, Görlach C, Uebersax L, Graf-Hausner U, Hämmerle CH. Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices: a volumetric analysis. J Clin Periodontol 2010; 37;659- 666.

Thoma DS, Naenni N, Benic GI, Hämmerle CH, Jung RE. Soft tissue volumen augmentation at dental implant sites using a volumen stable three-dimensional collagen matrix – histologic outcomes of a preclinical study. J Clin Periodontol 2017; 42(2): 185-194

Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post extraction sockets in humans: a systematic review. J Clin Periodontol 2009; 36(12): 1048-1058.

Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocol for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. Clin Oral Impl Res 2012; 23(Suppl 5): 22-38.

Vignoletti F, Nuñez J. Discepoli N, De Sanctis F, Caffesse R, Muñoz F, Lopez M; Sanz M. Clinical and histological healing of a new collagen matrix in combination with the coronally advenced flap for the treatment of Miller Class-I recession defects: an experimental study in the minipig. J Clin Periodontol 2011; 38: 847-855.

Viñuela-Prieto JM, Sánchez-Quevedo MC, Alfonso-Rodríguez CA, Oliveira AC, Scionti G, Martín-Piedra MA, Moreu G, Campos A, Alaminos M. Garzón I. Sequential keratinocytic differentation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. J Periodontol Res 2015; 50 (5): 658-665.

Vittorini Orgeas G, Clementine M, De Risi V, De Sanctis M. Surgical techniques for alveolar socket preservation: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Implants 2013; 28(4): 1049-1061.

Wang S, Liu Y, Fang D, Shi S. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. Oral Diseases 2007; 13(6): 530-537.

Windish SI, Jung RE, Sailer I. Studer SP, Ender A, Hämmerle CH. A new optical method to evaluate three-dimensional volume changes of alveolar contour: a methodologic in vitro study. Clin Oral Impl Res 2007; 18: 545-551.

Wolff J. Farré-Guasch E, Sándor GK, Gibbs S, Jager DJ, Forouzanfar T. Soft tissue augmentation tecniques and materials used in the oral cavity: an overview. Implant Dent 2016; 25(3): 427-434.