



Colonización bacteriana de membranas de PTFE-e en regeneración tisular guiada

C.D. Betsaida Julieta Ortiz
Sánchez,* C.D. Jesús Villavicencio Pérez,** C.D. Javier Antonio Garzón Trinidad**

- * Especialista en Endoperiodontología. Profesor de la Carrera de Cirujano Dentista.
** Especialista en Endoperiodontología. Profesor de la Especialización en Endoperiodontología.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. División de Investigación y Posgrado. Especialización en Endoperiodontología.

Resumen

El objetivo de la presente investigación es determinar en qué superficie de las membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) existe mayor contaminación. Se obtuvieron 9 membranas de PTFE-e utilizadas en procedimientos de RTG en los pacientes de la Clínica de Endoperiodontología de la UNAM FES Iztacala durante el periodo de agosto de 2003 a enero de 2004. Después de la remoción las membranas fueron deshidratadas con etanol, y entonces embebidas en parafina e incluidas en paraplast y seccionadas a 5 μm en plano coronal-apical. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina básica (H-E) y Gram. La observación se realizó en microscopio óptico a $40 \times 60 \mu\text{m}^2$. Las células fueron analizadas semicuantitativamente a través de la densidad celular, clasificándolas por su presencia y tipos: células mononucleares, eritrocitos, fibroblastos, neutrófilos, células plasmáticas en los cortes teñidos con H-E. Las bacterias orales con tinción de Gram fueron analizadas semicuantitativamente a través de la densidad celular (número de células/ $40 \times 60 \mu\text{m}^2$) en las caras interna y externa en la zona más apical de cada membrana.

En el presente estudio todas las membranas mostraron la presencia de células inflamatorias y bacterias al momento de la remoción. En conclusión, los resultados demostraron diferencia significativa entre la cantidad de bacterias Gram positivas y negativas en la superficie externa, así como la presencia de bacterias, células inflamatorias e inclusive hongos que se adhieren e invaden las membranas, las cuales son capaces de atravesar la totalidad de las membranas de PTFE-e, y alcanzar su porción más apical tanto en las membranas expuestas como en las no expuestas y aun así, permitir la formación de tejido conectivo neoformado que puede osificarse.

Palabras clave: Regeneración tisular guiada, membranas, periodoncia, membranas de politetrafluoretileno expandido, PTFE-e.

Abstract

The purpose of this study was to determine on which surface of expanded polytetrafluoroethylene membranes (ePTFE) exist more contamination. Nine ePTFE membranes used in guided tissue regeneration (GTR) on patients of the Clínica de Endoperiodontología UNAM FES Iztacala in the period of August 2003 to January 2004. After retrieval the membranes were dehydrated and included in paraplast and sectioned serially at 5 μm in a coronal-apical plane. Sections were stained with basic hematoxylin-eosin (H-E) and Gram and observed by light microscopy. Cells were analyzed semiquantitatively by its presence and types: mononuclear cells, erythrocyte, fibroblast, neutrophil, plasma cell, lymphocytes and macrophages in H-E stained sections. Oral bacteria were analyzed semiquantitatively by cell density (cell number/ $40 \times 60 \mu\text{m}^2$) in the inner and outer surfaces in the apical portion in every membrane. In the present study all membranes showed the presence of inflammatory cells and bacteria

at the moment of removal. The results demonstrate a significant difference between the amount of gram positive and gram negative bacteria in the outer surface, as the presence of bacteria, inflammatory cells and fungi adhered to and invaded the membranes, which capable were to cross over the e-PTFE membranes, and reach the apical portion as much in the exposed membranes as in the non exposed membranes, and yet allow the growth of new connective tissue that can be transformed into bone.

Key words: Guided tissue regeneration, membranes, periodontics, expanded polytetrafluoroethylene membranes (e-PTFE).

Introducción

Regeneración se define como la reproducción o reconstrucción de la parte perdida o lesionada de forma que la estructura y función de los tejidos perdidos o lesionados quedan completamente restauradas.¹

En periodoncia la regeneración tisular guiada (RTG) se refiere a la reconstitución de cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar.²

La aplicación clínica de la RTG involucra la colocación de una barrera entre el epitelio y la superficie radicular para dar lugar a la repoblación por células provenientes del ligamento periodontal.^{3,4}

Algunos de los materiales de las membranas utilizadas como barreras fueron creados especialmente para la RTG, como el politetrafluoretileno expandido (PTFE-e).⁵

La molécula básica del PTFE-e consiste en una unión carbono-carbono con cuatro átomos de flúor incorporados para formar un polímero. Es inerte, no genera ninguna reacción tisular. Este tipo de membrana persiste después de la regeneración y debe ser extraído en una segunda operación.⁶

Algunos de los factores más importantes en la creación de un ambiente apropiado para la regeneración tisular guiada incluyen:⁷

- Prevención de infección
- Estabilidad mecánica en la resolución de la herida
- Formación y mantenimiento de un coágulo sanguíneo
- Aislamiento de un espacio regenerativo de células de tejidos no deseables

La exposición de las membranas permite que éstas se contaminen por bacterias, dicha contaminación se produce durante la cirugía o en la etapa de regeneración.

Además se produce la formación de un espacio entre la superficie externa de la membrana y el tejido gingival, debido a la migración apical del epitelio de la superficie interna del tejido gingival de recubrimiento, lo que permite que las bacterias colonicen el área subgingival.⁸

La contaminación ha sido asociada a la deficiente inserción en los defectos óseos, esto se relaciona con recuentos altos de bacterias y a la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomcomitans*.⁹

La biomasa puede tener un grosor variable, la cual contiene bacterias primarias con una matriz interbacteriana, células inflamatorias, células epiteliales y eritrocitos. Ocasionalmente pueden observarse islas de cálculo. En algunas porciones, la colonización ocurre como microcolonias reconocibles. Los datos indicaron que las bacterias colonizan la porción expuesta de la membrana inicialmente y crecen descendiendo hacia la porción no expuesta.¹⁰

En un estudio *in vitro* Hom-Lay-Wang,¹¹ 1994, así como Chen y cols.¹² 1997 en un estudio *in vivo* compararon la adhesión bacteriana de tres diferentes membranas de RTG, PTFE-e, poliglactina 910 y colágena.

Los resultados mostraron que el *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *P. melaninogenica*, y *Selenomonas sputigena* pueden colonizar todos los materiales seleccionados en 3 días.

La mayoría del aumento de la masa microbiana proviene de las bacterias provenientes de la superficie dentaria. También mostraron que el *S. mutans* tiene una fuerte adhesión en todos los puntos todo el tiempo.

Zucchelli y cols.¹³ 1998, demostraron que los diferentes materiales acumulan cantidades variables de bacterias debido a su textura y sus características de superficie estructural, comparando las membranas de PTFE-e, ácido poliláctico y poligáctica 910.

Se analizaron después de 4 y 24 h de exposición intraoral, se encontró una mayor proporción de bacterias en la membrana de PTFE-e comparada con otras dos membranas después de un periodo de 4 h, mientras que después de un periodo de 24 h la proporción bacteriana fue menor en la membrana de ácido poliláctico comparada con las otras dos.

Nowzari y cols.¹⁴ 1996, mostraron en un estudio sobre la colonización bacteriana de PTFE-e y el nivel de inserción, que las bacterias pueden colonizar las membranas a los 3 minutos de manipulación intraoral.

El grupo de pacientes tratados con cirugía ósea periodontal que mostraron los menores niveles de patógenos

periodontales en las membranas tuvieron una mayor ganancia en el nivel de inserción.

Planteamiento del problema

Las membranas utilizadas para separar el epitelio en procedimientos de cirugía regenerativa son susceptibles a la contaminación bacteriana, lo cual hace que el pronóstico sea menos favorable. Dicha contaminación puede suceder en la superficie interna de la membrana, en contacto con el defecto o la externa, en contacto con el epitelio.

Objetivo de la investigación

Determinar en qué superficie de las membranas de PTFE-e existe mayor contaminación.

Hipótesis

Existe mayor colonización bacteriana en la superficie externa de las membranas de PTFE-e que se utilizan en RTG.

Metodología

El presente es un estudio comparativo, con un diseño experimental de estudio de casos en una sola medición.¹⁵ Nuestra población de estudio fueron los pacientes de la Clínica de Endoperiodontología, durante el periodo de agosto de 2003 a enero de 2004. Pacientes que cumplieran los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

- Defectos óseos verticales
- Fase I terminada
- Índice personal de PDB de 10% o menor
- Aceptación de procedimientos de RTG con membrana de PTFE-e

Criterios de exclusión

- Defectos óseos horizontales
- Fase I incompleta o deficiente
- Índice personal de PDB mayor a 10%
- No aceptación de procedimientos de RTG con membrana de PTFE-e

Procedimiento experimental

Se obtuvieron 9 membranas de PTFE-e, las cuales se numeraron de acuerdo al orden como se recolectaron.

Las membranas fueron colocadas según indicaciones e instrucciones, y retiradas después de 4 a 6 semanas como indica la técnica (*Figura 1*).

Después de la remoción fueron enjuagadas en solución salina para remover la sangre y placa adheridas.

La superficie externa de cada membrana fue marcada con un bisturí, para identificar cuál superficie estuvo en contacto con el tejido regenerado. Fueron fijadas por inmersión en una solución neutra de formol al 10%. Las secciones que presentaron cambios de coloración fueron identificadas y medidas.¹⁶

Posteriormente fueron deshidratadas con etanol, y entonces embebidas en parafina e incluidas en paraplast** y seccionadas a 5 mm en plano corono-apical, colocadas en portaobjetos.

Los cortes fueron desparafinados con xilol, etanol graduado (100, 95, 75, 50 y 30%) e inmersos en agua destilada. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina básica (H-E) y Gram.¹⁷

Las células fueron analizadas semicuantitativamente a través de la densidad celular clasificándolas por su presencia como:

0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = abundante

de cada tipo celular con un microscopio óptico por sus tipos: células mononucleares, eritrocitos, fibroblastos, neutrófilos, células plasmáticas en los cortes teñidos con H-E (*Figura 2*).

Para la tinción de Gram, se dividió la membrana en tres porciones (cervical, media y apical) y se subdividió en externa, media e interna, se analizaron de estas porciones la apical externa e interna a detalle.

Las bacterias orales con tinción de Gram fueron analizadas semicuantitativamente a través de la densidad celular (número de células/40 x 60 μm^2) en las caras interna y externa en la zona más apical de cada membrana¹⁸ (*Figura 3*).

Resultados y análisis de resultados

• Superficie externa Gram positivas vs Gram negativas
 $t_c = 2.47032 \quad a = 0.05$ Probabilidad de diferencia significativa: 98.16%.

• Superficie interna Gram positivas vs Gram negativas
 $t_c = .784251 \quad a = 0.05$ Probabilidad de diferencia significativa: 56.20%.

• Gram positivas superficie externa vs interna
 $t_c = 1.06179 \quad a = 0.05$ Probabilidad de diferencia significativa: 70.46%.

** Merck Laboratories

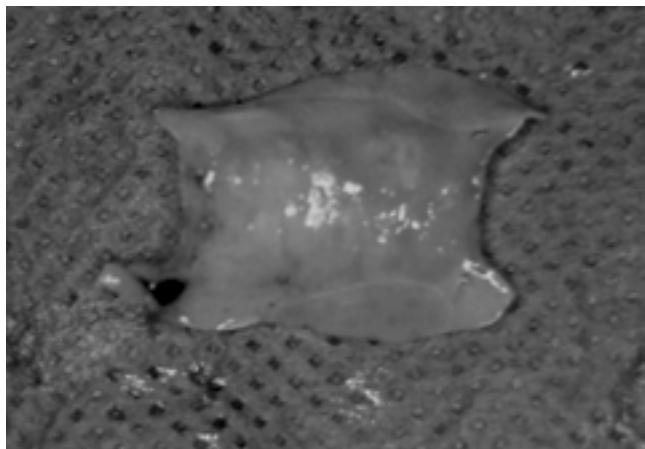


Figura 1. Membrana recién obtenida.

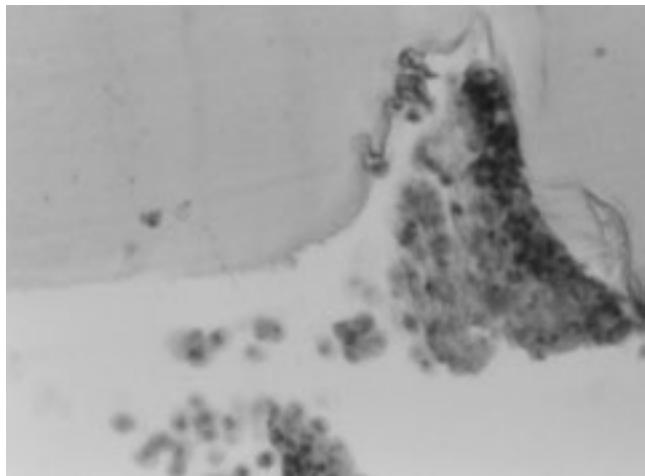


Figura 2. Tinción H-E.

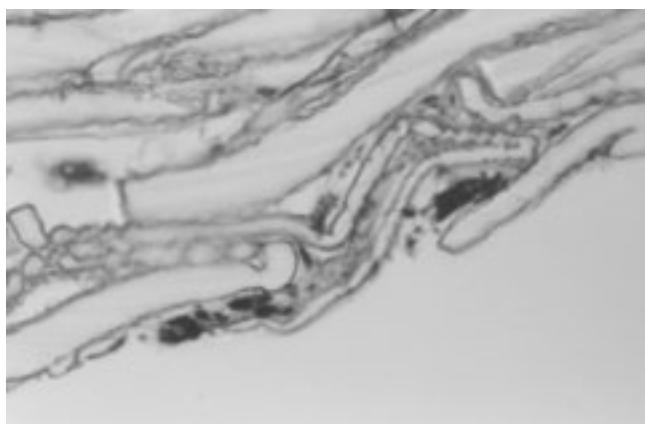


Figura 3. Tinción Gram.

- Gram negativas superficie externa vs interna
tc = .611503 a = 0.05 Probabilidad de diferencia significativa: 45.53%.
- Gram positivas, membranas expuestas vs membranas no expuestas
tc = .128216 a = 0.05 Probabilidad de diferencia significativa: 10.05%.
- Gram negativas, membranas expuestas vs membranas no expuestas
tc = 1.14088 a = 0.05 Probabilidad de diferencia significativa: 73.03%.
- Membranas expuestas vs membranas no expuestas
tc = .465140 a = 0.05 Probabilidad de diferencia significativa: 35.54%.

Cuadros I y II.

Discusión y conclusiones

Hay algunos estudios que reportan la presencia de células inflamatorias en las membranas de PTFE-e.^{10,13,21,19,20} Sin embargo, en estos estudios refieren una mínima presencia de células inflamatorias al contrario de lo que nosotros observamos, aunque en nuestro estudio, hubo diferencia significativa al comparar individualmente en la mayoría de las membranas, no hubo diferencia en la cantidad de bacterias y sus tipos entre las superficies interna y externa.

Con microscopía electrónica Selvig y cols. 1992^{10,21} examinaron membranas de PTFE-e y encontraron una pequeña cantidad de células adheridas al material. Payne y cols. 1996²¹ sugirió que la falta de adherencia era provocada por su baja capacidad de humedecerse, o por la superficie rugosa creada por el entramado de fibras del material. Pritchett-Carson y cols. 1994²² encontraron que las membranas podían establecer la proliferación de células mesenquimáticas. Yoshinari y cols.¹⁹ observaron bajo microscopía óptica e inmunohistoquímica la presencia de células principalmente mononucleares adheridas, similares en cantidad a las que nosotros observamos.

Varios estudios recientes con microscopía electrónica y de luz, así como por cultivos bacterianos han demostrado que la placa dentobacteriana, incluyendo microorganismos periopatogénicos, contaminan y colonizan membranas de PTFE-e colocadas sobre defectos periodontales.¹⁰⁻²² Passariello y cols. 1991²³ han mostrado qué sitios tratados con membranas muestran mayor colonización bacteriana. Mombelli y cols.³³ aislaron bacilos anaerobios Gram negativos de todas las membranas de RTG. Wang y cols. estudiaron la adherencia bacteriana en membranas de PTFE-e, reportaron presencia en gran cantidad de *Prevotella melaninogenica*, *Selomonas sputigena* y *Actinomyces viscosus*. Tempro y Nalbandian¹³ y Yoshinari¹⁹ repor-

Cuadro I. Cuantificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas por membrana por superficie en tercio apical.

Membrana	Código	Exposición	Gram positivo		Gram negativo	
			Interna	Externa	Interna	Externa
1	M1-M	Sí	35	62	115	62
	M1-D		70	67	140	35
2	M2-M	Sí	120	186	160	57
	M2-D		177	370	250	82
3	M3-M	Sí	150	365	77	62
	M3-D		61	145	60	76
4	M4-M	Sí	82	97	95	99
	M4-D		61	54	68	33
5	M5-M	No	25	78	44	53
	M5-D		30	252	33	116
6	M6-M	No	56	73	26	33
	M6-D		45	128	66	90
7	M7-M	No	68	50	88	46
	M7-D		77	32	58	30
8	M8-Int	Sí	44	84	26	86
9*	M9-MV	No	367	244	71	148
	M9-MP		293	106	86	53
	M9-DV		28	62	53	67
	M9-DP		192	170	95	200
	Total		1,981	2,625	1,611	1,428

* Debido al tamaño y a la presencia del refuerzo de titanio se dividió en dos porciones: mesial y distal.

Cuadro II. Cuantificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas por membrana y exposición.

Membrana	Código	Exposición	Gram positivo	Gram negativo
1	M1-M	Sí	97	177
	M1-D		137	175
2	M2-M	Sí	306	217
	M2-D		547	332
3	M3-M	Sí	515	139
	M3-D		206	136
4	M4-M	Sí	179	194
	M4-D		115	144
8	M8-Int	Sí	128	112
5	M5-M	No	103	97
	M5-D		282	149
6	M6-M	No	129	59
	M6-D		173	156
7	M7-M	No	118	134
	M7-D		109	88
9*	M9-MV	No	611	219
	M9-MP		399	139
	M9-DV		90	120
	M9-DP		362	295

* Debido al tamaño y a la presencia del refuerzo de titanio se dividió en dos porciones: mesial y distal.

taron una gran colonización de bacterias Gram positivas, Simion y cols. 1994²⁴ reportaron que los microorganismos pueden atravesar las membranas, De Sanctis y cols. 1996²⁵ observaron que se presentó inclusive en aquellas que no se habían expuesto; en el presente estudio, también la mayor cantidad de bacterias fueron Gram positivas, tanto en membranas que presentaron exposición como las que no, aunque la presencia fue mayor en las que presentaron exposición al medio oral.

La contaminación bacteriana puede deberse a la contaminación de las membranas durante el procedimiento quirúrgico ya sea en la colocación o en la remoción o debido a la exposición de la membrana durante el periodo de inclusión de la regeneración. Nowzari¹⁸ reportó que la colonización de las membranas de PTFE-e por microorganismos periodontopatógenos sucede después de 3 minutos de manipulación intraoral antes del procedimiento de RTG.

Guillemín y cols. 1993²⁶ sugirió que la presencia de PDB sobre las membranas no comprometía la recuperación clínica durante las primeras 4 a 6 semanas posteriores a la RTG. Crigger y cols. 1996²⁷ indicaron que en su estudio histológico el tejido de granulación formado debajo de la porción de membrana clínicamente expuesta podía convertirse en tejido conectivo de reparación en perros beagle.

Selving y cols. 1992²¹ reportaron que la extensión de la exposición oral de la membrana, así como su contaminación al momento de la remoción puede ser un indicador a largo plazo del éxito o fracaso de los procedimientos de regeneración. Aunque aún no es claro hasta qué punto la presencia de bacterias afecta al tejido neoformado en la RTG.

Es razonable suponer que las células inflamatorias se encuentran debido a la infección bacteriana, sin embargo, no encontramos estudios que observaran alguna relación entre la presencia de células inflamatorias con la presencia de bacterias.

Usualmente la microscopía electrónica se ha utilizado para la observación de células y colonización bacteriana en la superficie de membranas, por lo que se decidió utilizar la microscopía óptica para examinar el interior de las membranas de PTFE-e, se dividió la membrana en tres porciones (cervical, media y apical) y se subdividió en externa, media e interna, se analizaron de estas porciones la apical externa e interna a detalle.

En el presente estudio todas las membranas mostraron la presencia de células inflamatorias y bacterias al momento de la remoción. Ambas se encontraron en toda la superficie de las membranas tanto en la superficie interna como externa, así como en el interior (parte central) tanto en las membranas que presentaron exposición como en las que no la presentaron.

En cuanto a las bacterias, la mayor cantidad se presentó en la superficie externa con bacterias Gram positivas, las mem-

branas con mayor presencia fueron M2-D y M3-M que presentaron exposición y M5-D, M9-MV que no presentaron exposición, pero en cuanto a Gram negativas en la superficie interna, la más contaminada fue M2-D que presentó exposición.

Dentro de los hallazgos se encontró la presencia de colonias de hongos tanto en la superficie como en la zona central de una de las membranas M3 y M6, la presencia de estas células a todo lo largo y ancho de las membranas sugiere su capacidad para pasar a través del grosor de la parte central de las membranas.

Las células que más se presentaron fueron monocitos, neutrófilos y macrófagos, observándose la presencia de células gigantes y rosetas de neutrófilos a lo largo de la superficie M2-D, así como también se observó la presencia de fibroblastos, con zonas con inicios de osificación.

En el análisis estadístico para la superficie externa a la t de Student con $p = 0.05$ con una T_c de 2.47032 y una T_t de 1.7291 nos demuestra una diferencia significativa entre la cantidad de bacterias Gram positivas y negativas de dicha superficie.

Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar la cantidad de bacterias en la superficie interna, ni cuando se compararon las Gram positivas y Gram negativas de ambas superficies. Al comparar las bacterias Gram positivas de las membranas expuestas contra las no expuestas, así como las Gram negativas no se encontró diferencia, así como tampoco se encontró diferencia al comparar la contaminación de las membranas expuestas contra las no expuestas.

En conclusión, el presente estudio demostró la diferencia significativa entre la cantidad de bacterias Gram positivas y negativas en la superficie externa, así como la presencia de bacterias, células inflamatorias e inclusive hongos que se adhieren e invaden las membranas, las cuales son capaces de atravesar la totalidad de las membranas de PTFE-e, y alcanzar su porción más apical tanto en las membranas expuestas como en las no expuestas y aún así, permitir la formación de tejido conectivo neoformado que puede osificarse.

Bibliografía

1. Lynch SE. *J Periodontol* 1992; 63: 1085-92.
2. Caton J. *Periodontology* 2000; 1, 1993: 9-15.
3. Melcher AH. *J Periodontol* 1976; 47: 256-260.
4. Nyman S. *J Clinical Periodontal* 1982; 9: 290-296.
5. Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. 2000.
6. Becker W, Prichard JF. *J Periodontol* 1987; 58: 819-825.
7. Ross Hardwick. *J Periodontol* 1995; 66: 495-505.
8. Ross Hardwick. *J Periodontol* 1995; 66: 495-505.
9. Lundgren D. *J Periodontol* 1995; 66: 605-612.
10. Tempro PJ, Nalbandian J. *J Periodontol* 1993; 64: 162-168.
11. Wang HL. *J Periodontol* 1994; 65: 211-218.

12. Chen YT, Wang HL. *J Periodontol* 1997; 68: 172-179.
13. Zucchelli G, Cesaro C. *J Periodontol* 1998; 69: 1193-1202.
14. Nowzari H. *J Periodontol* 1996; 67: 694-702.
15. Hernández R. *Metodología de la investigación*. 2001.
16. Yoshinari N. *J Periodontol* 1998; 69: 460-469.
17. Martoja R. *Técnicas de histología animal*. 1970.
18. Lee GL. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 1968.
19. Mombelli A, Lang NP, Nyman S. Isolation of periodontal species after guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1993; 64: 1171-1175.
20. Salonen JI, Persson RG. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. *J Periodont Res* 1990; 25: 215-221.
21. Payne JM, Cobb CM Rapley JW, Killow WJ, Spencer P. Migration of human gingival fibroblast over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol* 1996; 67: 236-244.
22. Pritchett-Carson S, Palmer RM, Morgan PR, Floyd PD. Immunohistochemical analysis of cells attached to teflon membranes following guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1994; 55: 134-138.
23. Passariello C, Thaller MC, Selan L, Berlotti F, de Luca M, Renzini G. Periodontal regeneration procedures may induce colonization by glycocalyx-producing bacteria. *Med Microbiol Immunol* 1991; 180: 67-72.
24. Simion M, Trisi P, Maglione M, Piattelli A. A preliminary report on a method studying the permeability of expanded polytetrafluoroethylene membrane to bacteria *in vitro*: A scanning electron microscope analysis. *J Periodontol* 1994; 65: 755-761.
25. De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C. Bacterial colonization of barrier material and periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1039-1046.
26. Guillemin MR, Mellonig JT, Brunsvoold MA. Healing in periodontal defects treated by decalcified freeze-dried bone allografts in combination with ePTFE membranes. Clinical and scanning electron microscope analysis. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 528-536.
27. Crigger M, Bogle GC, Garrett S, Gantes BG. Repair following treatment of circumferential periodontal defects in dogs with collagen and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. *J Periodontol* 1996; 67: 403-413.

Reimpresos:

C.D. Betsaida J. Ortiz Sánchez
 Ricarte Núm. 352 Desp. 15 Col. Lindavista,
 México, D. F. 07300
 Tel. 55 86 97 41 044 55 14 76 06 94
 Este documento puede ser visto en:
www.medigraphic.com